

Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos

Albert Soler Hernández

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Universitat Politècnica de València

Departamento de Biotecnología

Tesis Doctoral



**BIODIVERSIDAD DE ACTINOMICETOS AISLADOS
DE PLANTAS DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES.
ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN
DE COMPUESTOS TÓXICOS**

Memoria presentada por **Albert Soler Hernández** para
optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València

Directores
Gonzalo Cuesta Amat
José Luis Alonso Molina

Valencia, Febrero 2012



Esta editorial es miembro de la UNE, lo que garantiza la difusión y comercialización de sus publicaciones a nivel nacional e internacional.

© Albert Soler Hernández, 2012

Primera edición, 2012

© de la presente edición:
Editorial Universitat Politècnica de València
www.editorial.upv.es

ISBN: 978-84-8363-840-8 (versión impresa)

Ref. editorial: 5530 (versión impresa)

5531 (versión electrónica)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

D. **Gonzalo Cuesta Amat**, Profesor Contratado Doctor perteneciente al Departamento de Biotecnología (Área de Microbiología) de la Universitat Politècnica de València y D. **José Luis Alonso Molina**, Responsable del Grupo de Química y Microbiología del Agua perteneciente al Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente de la Universitat Politècnica de València,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “**BIODIVERSIDAD DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE PLANTAS DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS**”, que presenta D. **Albert Soler Hernández** para optar al grado de **Doctor por la Universitat Politècnica de València**, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos adecuados para ser presentada como tesis doctoral ante el tribunal correspondiente para su lectura y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado,

Valencia, 23 de Enero de 2012

Fdo.: D. Gonzalo Cuesta Amat

Fdo.: D. José Luis Alonso Molina

A mi madre, a Luis y a mi padre

Agradecimientos

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades, como el desarrollo de esta Tesis Doctoral, es inevitable que te asalte un muy humano egocentrismo que te lleva a concentrar la mayor parte del mérito en la tarea que has realizado. Sin embargo, el análisis objetivo te muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de muchas personas que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos. Como se suele decir, es de bien nacido el ser agradecido.

A mi madre y a Luis por su apoyo, colaboración y cariño. No solamente en la realización de este trabajo ya que son muchos los malos momentos que hemos vivido pero que, por suerte, ya han pasado y nos han hecho más fuertes.

A mi padre que, pese a no estar a mi lado físicamente, me ha alentado en todo momento a continuar con mis estudios y metas. Sus sabios consejos han hecho que, en momentos de flaqueza, aprenda a tomarme las cosas con filosofía y entereza.

Gracias a mis directores, Gonzalo y José Luis. El apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte valioso, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Les agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de este trabajo. Una mención especial para Gonzalo que, pese a los malos momentos por los que ha pasado, siempre ha estado ahí. Ánimo Gon, ya queda menos!!!!

Un fuerte abrazo a todas las personas que forman parte, de una manera o de otra, del laboratorio de Microbiología de la Escuela de Agrónomos: M^a Antonia, M^a Ángeles, Manolo, Ana J., Yolanda, Javier, Salut, Rafa, Ana G., Rosa y Nancy. Mi cariño también para mis compañeros de laboratorio: Paula, Jorge, Claudia, Javi y tantos otros. Sin vuestra ayuda esto tampoco hubiera sido posible.

A todos mis amigos, en especial a los del Bajo, los de la facultad, los del máster y los de Agustinos. A todos aquellos que han pasado por mi vida y me han aportado muchas alegrías y, sobretodo, su amistad. Gracias, de corazón.

Por supuesto a mi familia que siempre me ha apoyado en todas las decisiones tomadas. Muchas gracias a mis padres y a Luis.

A Carolina, con la que tengo por delante el mayor proyecto de mi vida. Gracias por todos esos momentos que hemos vivido, tu paciencia, tus consejos, tus ánimos.....

Gracias a todos

“La suerte favorece a la mente preparada”

Louis Pasteur (1822 - 1895)

ÍNDICES Y RESÚMENES

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Diversidad microbiana.....	3
2.- <i>Phylum Actinobacteria</i>	6
2.1.- Orden <i>Actinomycetales</i>	7
2.1.1. Suborden <i>Corynebacterineae</i>	10
2.1.1.1.- Familia <i>Corynebacterineae</i>	10
2.1.1.1.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	11
2.1.1.2.- Familia <i>Dietziaceae</i>	11
2.1.1.2.1.- Género <i>Dietzia</i>	11
2.1.1.3.- Familia <i>Mycobacteriaceae</i>	12
2.1.1.3.1.- Género <i>Amycolobicoccus</i>	12
2.1.1.3.2.- Género <i>Mycobacterium</i>	12
2.1.1.4.- Familia <i>Nocardiaceae</i>	13
2.1.1.4.1.- Género <i>Gordonia</i>	13
2.1.1.4.2.- Género <i>Millisia</i>	14
2.1.1.4.3.- Género <i>Nocardia</i>	15
2.1.1.4.4.- Género <i>Rhodococcus</i>	16
2.1.1.4.5.- Género <i>Skermania</i>	16
2.1.1.4.6.- Género <i>Williamsia</i>	17
2.1.1.5.- Familia <i>Segniliparaceae</i>	17
2.1.1.5.1.- Género <i>Segniliparus</i>	17
2.1.1.6.- Familia <i>Tsukamurellaceae</i>	18
2.1.1.6.1.- Género <i>Tsukamurella</i>	18
2.1.2.- Suborden <i>Pseudonocardineae</i>	18
2.1.2.1.- Familia <i>Pseudonocardiaceae</i>	18
2.1.2.1.1.- Género <i>Pseudonocardia</i>	19
2.1.3.- Suborden <i>Micrococcineae</i>	19
2.1.3.1.- Familia <i>Microbacteriaceae</i>	19
2.1.3.1.1.- Género <i>Microbacterium</i>	19
3.- Detección e identificación de actinomicetos nocardioformes en fangos activos.....	20
3.1.- Aislamiento y recuento.....	20
3.2.- Identificación y caracterización.....	21

Índice

3.2.1.- Métodos clásicos.....	21
3.2.1.1.- Caracteres morfológicos.....	21
3.2.1.2.- Quimiotaxonomía.....	22
3.2.2.- Métodos genotípicos.....	24
3.2.2.1.- Análisis de las secuencias del 16S rDNA.....	25
3.2.2.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
3.2.3.- Métodos fenotípicos.....	29
4.- Aguas residuales.....	30
4.1.- Depuración aguas residuales.....	32
4.1.1.- Antecedentes.....	32
4.1.2.- Clasificación de los métodos de tratamiento de aguas residuales.....	32
4.2.- Aguas residuales urbanas.....	36
4.3.- Aguas residuales en la industria petroquímica.....	37
4.4.- Sistema de fangos activos.....	40
4.4.1.- El flóculo.....	40
4.4.2.- Composición de la microbiota.....	41
4.4.3.- Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos.....	42
4.4.3.1.- Tasa de crecimiento.....	42
4.4.3.2.- Tolerancia a factores abióticos y toxinas.....	42
4.4.3.3.- Capacidad para contribuir a la formación del flóculos.....	43
4.5.- Problemas producidos por microorganismos en sistemas de fangos activos.....	43
4.5.1.- Aumento del volumen de los sólidos sedimentables o “Bulking”.....	43
4.5.2.- Formación de espumas biológicas o “Foaming”.....	43
4.5.3.- Microorganismos productores de espumas.....	46
4.5.4.- Principales factores que influyen en la formación de espumas.....	49
4.5.4.1.- Burbujas de aire.....	49
4.5.4.2.- Partículas hidrofóbicas.....	50
4.5.4.3.- Tensoactivos.....	51
4.5.5.- Factores que afectan al crecimiento de los microorganismos productores de espumas.....	51
4.5.5.1.- Requisitos nutricionales.....	51
4.5.5.2.- Requisitos de oxígeno.....	52
4.5.5.3.- Temperatura.....	52

4.5.5.4.- pH.....	53
4.5.6.- Métodos de control.....	53
4.5.6.1- Manipulación de la edad del fango.....	53
4.5.6.2.- Cloración.....	53
4.5.6.3.- Empleo de selectores.....	54
4.5.6.4.- Eliminación física.....	54
4.5.6.5.- Otros métodos.....	54
4.6.- Identificación de microorganismos filamentosos en fangos activos.....	55
4.6.1.- Método clásico de identificación de microorganismos filamentosos.....	55
5.- Biodegradación.....	57
5.1.- Antecedentes.....	57
5.2.- Contaminación por hidrocarburos.....	58
5.2.1.- Composición del crudo del petróleo.....	59
5.2.1.1.- Hidrocarburos monoaromáticos.....	61
5.2.1.2.- Hidrocarburos poliaromáticos.....	61
5.2.2.- Fuentes de contaminación.....	62
5.3.- Biorremediación.....	63
5.3.1.- Factores condicionantes de la biorremediación microbiana.....	65
5.3.1.1.- Nutrientes.....	66
5.3.1.2.- Variables ambientales.....	66
5.3.1.2.1.- Oxígeno.....	67
5.3.1.2.2.- Salinidad.....	67
5.3.1.2.3.- Temperatura.....	68
5.3.1.2.4.- pH.....	68
5.3.1.2.5.- Concentración de sustancias contaminantes.....	69
5.3.1.3.- Características del producto petrolífero.....	69
5.3.1.4.- Factores relacionados con los microorganismos.....	69
5.3.2.- Microorganismos degradadores.....	70
5.4.- Biodegradación de fenol y naftaleno.....	74
5.4.1.- Fenol.....	74
5.4.2.- Naftaleno.....	76
5.5.- Gen de la catecol 1,2-dioxigenasa.....	78

Índice

OBJETIVOS.....	81
MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
1.- Cepas bacterianas de referencia.....	87
2.- Caracterización de muestras de fangos activos.....	88
2.1.- Toma de muestras y aislamiento.....	88
2.2.- Caracterización fenotípica basada en características morfológicas.....	90
2.3.- Caracterización quimiotaxonómica.....	90
2.3.1.- Extracción y análisis de ácidos micólicos.....	91
2.3.1.1.- Materiales.....	91
2.3.1.2.- Metodología.....	91
2.3.2.- Determinación de los isómeros del ácido diaminopimélico (DAP).....	92
2.3.2.1.- Materiales.....	92
2.3.2.2.- Metodología.....	92
2.3.3.- Extracción y análisis de los azúcares predominantes de la pared celular.....	93
2.3.3.1.- Materiales.....	93
2.3.3.2.- Metodología.....	94
2.4.- Caracterización genotípica.....	95
2.4.1.- Extracción de DNA. Protocolo del CTAB.....	95
2.4.2.- Electroforesis en gel de agarosa.....	96
2.4.3.- Amplificación por PCR.....	97
2.4.4.- Purificación del DNA.....	97
2.4.5.- Obtención y análisis de las secuencias del 16S rDNA.....	98
2.4.6.- Árboles filogenéticos.....	98
2.4.7.- Matrices de similaridad.....	99
2.5.- Caracterización fenotípica basada en características metabólicas.....	99
2.5.1.- Crecimiento a diferentes temperaturas.....	99
2.5.2.- Pigmentación de colonias.....	100
2.5.3.- Actividades metabólicas.....	100
2.5.3.1.- Esculina.....	100
2.5.3.2.- L-Tirosina.....	100
2.5.3.3.- Nitratos.....	100

2.5.3.4.- Urea.....	101
2.5.4.- Uso de fuentes de carbono (1%): azúcares.....	101
2.5.4.1.- D+Lactosa.....	101
2.5.4.2.- D+Maltosa.....	101
2.5.4.3.- D-Arabinosa.....	101
2.5.4.4.- D+Fructosa.....	102
2.5.4.5.- D-Galactosa.....	102
2.5.4.6.- D-Glucosa.....	102
2.5.4.7.- D-Manitol.....	102
2.5.4.8.- meso-inositol.....	103
2.5.5.- Uso de fuentes de carbono y nitrógeno (0.1%): aminoácidos.....	103
2.5.5.1.- L-Alanina.....	103
2.5.5.2.- L-Histidina.....	103
2.5.5.3.- L-Prolina.....	103
3.- Biodegradación de compuestos derivados del petróleo.....	104
3.1.- Ensayos biodegradación.....	104
3.2.- Detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa.....	105
3.2.1.- Purificación del DNA.....	106
3.2.2.- Obtención y análisis de las secuencias del gen <i>catA</i>	106
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
1.- Caracterización de muestras de fangos activos.....	111
1.1.- Aislamiento.....	111
1.2.- Caracterización fenotípica basada en características morfológicas.....	112
1.3.- Caracterización quimiotaxonómica.....	114
1.4.- Caracterización genotípica.....	120
1.4.1.- Árboles filogenéticos y matrices de similaridad.....	121
1.4.1.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	127
1.4.1.2.- Género <i>Dietzia</i>	129
1.4.1.3.- Género <i>Gordonia</i>	131
1.4.1.4.- Género <i>Microbacterium</i>	138
1.4.1.5.- Género <i>Mycobacterium</i>	139

Índice

1.4.1.6.- Género <i>Pseudonocardia</i>	141
1.4.1.7.- Género <i>Rhodococcus</i>	143
1.4.1.8.- Género <i>Tsukamurella</i>	145
1.4.1.9.- Género <i>Williamsia</i>	146
1.5.- Caracterización fenotípica basada en características metabólicas.....	148
1.5.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	149
1.5.2.- Género <i>Dietzia</i>	150
1.5.3.- Género <i>Gordonia</i>	151
1.5.4.- Género <i>Microbacterium</i>	156
1.5.5.- Género <i>Mycobacterium</i>	156
1.5.6.- Género <i>Pseudonocardia</i>	158
1.5.7.- Género <i>Rhodococcus</i>	160
1.5.8.- Género <i>Tsukamurella</i>	161
1.5.9.- Género <i>Williamsia</i>	163
2.- Biodegradación de compuestos derivados del petróleo.....	164
2.1.- Ensayos de biodegradación.....	164
2.2.- Detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa.....	169
2.2.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	171
2.2.2.- Género <i>Dietzia</i>	171
2.2.3.- Género <i>Gordonia</i>	171
2.2.4.- Género <i>Microbacterium</i>	173
2.2.5.- Género <i>Mycobacterium</i>	173
2.2.6.- Género <i>Pseudonocardia</i>	173
2.2.7.- Género <i>Rhodococcus</i>	173
2.2.8.- Género <i>Tsukamurella</i>	174
2.2.9.- Género <i>Williamsia</i>	174
2.2.10.- Obtención y análisis de las secuencias del gen <i>catA</i>	174
3.- Consideraciones finales.....	176
CONCLUSIONES.....	183
PROPUESTA DE NUEVA ESPECIE.....	187
1.- <i>Pseudonocardia hispalensis</i>	189

BIBLIOGRAFÍA.....	191
ANEXOS.....	215
Anexo 1: Medios de cultivo empleados.....	217
Anexo 2: Soluciones, reactivos y material de identificación para PCR.....	220
Anexo 3: Términos y Abreviaturas empleadas.....	221
Anexo 4: Árbol filogenético completo género <i>Corynebacterium</i>	223
Anexo 5: Árbol filogenético completo género <i>Dietzia</i>	225
Anexo 6: Árbol filogenético completo género <i>Gordonia</i>	227
Anexo 7: Árbol filogenético completo género <i>Microbacterium</i>	229
Anexo 8: Árbol filogenético completo género <i>Mycobacterium</i>	231
Anexo 9: Árbol filogenético completo género <i>Pseudonocardia</i>	233
Anexo 10: Árbol filogenético completo género <i>Rhodococcus</i>	235
Anexo 11: Árbol filogenético completo género <i>Tsukamurella</i>	237
Anexo 12: Árbol filogenético completo género <i>Williamsia</i>	239

Índice de tablas

INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Especies descritas y estimadas de los diferentes grupos de microorganismos.....	6
Tabla 2: Clasificación jerárquica del suborden <i>Corynebacterineae</i> basada en las secuencias de DNA y RNA ribosómico 16S.....	10
Tabla 3: Tipos de pared celular según sus constituyentes mayoritarios.....	22
Tabla 4: Tipos de pared celular y tipos glucídicos de los actinomicetos aerobios con <i>meso-DAP</i>	23
Tabla 5: Problemas en estaciones depuradoras de fangos activos: causas y efectos.....	44
Tabla 6: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.....	60

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 7: Microorganismos de referencia utilizados.....	87
Tabla 8: Aislados obtenidos.....	89
Tabla 9: Ciclos de la reacción de amplificación de la PCR para el gen 16S rDNA.....	97
Tabla 10: Ciclos de la PCR para el gen catecol 1,2-dioxigenasa.....	106

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11: Descripción macroscópica de los aislados.....	112
Tabla 12: Descripción microscópica de los aislados.....	113
Tabla 13: Resultados pruebas quimiotaxonómicas.....	115
Tabla 14: Identificación obtenida mediante matrices de similitud de la secuencia del 16S rDNA.....	123
Tabla 15: Porcentaje de similitud del 16S rDNA diferenciado por géneros.....	126
Tabla 16: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia amarae</i>	132
Tabla 17: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia hirsuta</i>	133
Tabla 18: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia jacobaea</i> y <i>Gordonia sputi</i>	134
Tabla 19: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia malaquae</i>	135
Tabla 20: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a <i>Tsukamurella pseudospumae</i> y <i>Tsukamurella sunchonensis</i>	145
Tabla 21: Resultados fenotípicos para el género <i>Corynebacterium</i> (I).....	149

Tabla 22: Resultados fenotípicos para el género <i>Corynebacterium</i> (II).....	150
Tabla 23: Resultados fenotípicos para el género <i>Corynebacterium</i> (III).....	150
Tabla 24: Resultados fenotípicos para el género <i>Dietzia</i> (I).....	150
Tabla 25: Resultados fenotípicos para el género <i>Dietzia</i> (II).....	151
Tabla 26: Resultados fenotípicos para el género <i>Dietzia</i> (III).....	151
Tabla 27: Resultados fenotípicos para el género <i>Gordonia</i> (I).....	152
Tabla 28: Resultados fenotípicos para el género <i>Gordonia</i> (II).....	153
Tabla 29: Resultados fenotípicos para el género <i>Gordonia</i> (III).....	154
Tabla 30: Resultados fenotípicos para el género <i>Microbacterium</i> (I).....	156
Tabla 31: Resultados fenotípicos para el género <i>Microbacterium</i> (II).....	156
Tabla 32: Resultados fenotípicos para el género <i>Microbacterium</i> (III).....	156
Tabla 33: Resultados fenotípicos para el género <i>Mycobacterium</i> (I).....	157
Tabla 34: Resultados fenotípicos para el género <i>Mycobacterium</i> (II).....	158
Tabla 35: Resultados fenotípicos para el género <i>Mycobacterium</i> (III).....	158
Tabla 36: Características de crecimiento aislado PA.3 vs. <i>P. asaccharolytica</i>	159
Tabla 37: Perfil ácidos grasos aislado PA.3 vs. <i>P. asaccharolytica</i>	159
Tabla 38: Tests fenotípicos diferenciadores entre aislado PA.3 y <i>P. asaccharolytica</i>	160
Tabla 39: Resultados fenotípicos para el género <i>Rhodococcus</i> (I).....	161
Tabla 40: Resultados fenotípicos para el género <i>Rhodococcus</i> (II).....	161
Tabla 41: Resultados fenotípicos para el género <i>Rhodococcus</i> (III).....	161
Tabla 42: Resultados fenotípicos para el género <i>Tsukamurella</i> (I).....	162
Tabla 43: Resultados fenotípicos para el género <i>Tsukamurella</i> (II).....	162
Tabla 44: Resultados fenotípicos para el género <i>Tsukamurella</i> (III).....	163
Tabla 45: Resultados fenotípicos para el género <i>Williamsia</i> (I).....	163
Tabla 46: Resultados fenotípicos para el género <i>Williamsia</i> (II).....	163
Tabla 47: Resultados fenotípicos para el género <i>Williamsia</i> (III).....	163
Tabla 48: Resultados ensayos biodegradación a los 21 días de incubación.....	165
Tabla 49: Resultados PCR catecol 1,2-dioxigenasa.....	170
Tabla 50: Resultados BLAST catecol 1,2-dioxigenasa.....	175

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Relación intraclase del <i>phylum Actinobacteria</i> , basada en la comparación de las secuencias del 16S rDNA/rRNA.....	8
Figura 2: Modelo propuesto por Minnikin para la cubierta de los mycolata.....	24
Figura 3: Vista esquemática de los componentes celulares y técnicas usadas.....	25
Figura 4: Resolución taxonómica de las técnicas utilizadas.....	26
Figura 5: Esquema general del proceso.....	39
Figura 6: Problema real de espumas en depuradora.....	45
Figura 7: Factores condicionantes en la biorremediación microbiana.....	65
Figura 8: Rutas metabólicas para la degradación del fenol.....	76
Figura 9: Ruta metabólica para la degradación del naftaleno.....	77
Figura 10: Degradación del catecol mediante la escisión orto del anillo aromático.....	79

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 11: Placa aislado CQG-5a.....	111
Figura 12: Placa aislado PA.3.....	111
Figura 13: Placa aislado P175.....	111
Figura 14: <i>Rhodococcus ruber</i> (54B).....	114
Figura 15: <i>Mycobacterium smegmatis</i> (PB.6).....	114
Figura 16: <i>Gordonia paraffinivorans</i> (C2.2).....	114
Figura 17: Cromatopla de ácidos micólicos de los aislados QB8.2, D1.1, QB7.2, P2.3, P1.1, N1, N4, N5, N9-1 y 8V. <i>Gordonia amarae</i> (CECT 5704) (1) y <i>Streptomyces albus</i> (CECT 3051) (2).....	118
Figura 18: Cromatopla de ácidos micólicos de los aislados D3.2, PA.2, 54B, P135, RG-4b, Ca20.2 y PA.3. <i>Gordonia amarae</i> (CECT 5704) (1) y <i>Streptomyces albus</i> (CECT 3051) (2).....	118
Figura 19: Cromatopla de isómeros del DAP de los aislados P26, J4.1, CS7.1, R1, P54, C4.1, C5.5a, D2.3, QB2.2 y CS1.1. En los extremos (1 y 2) se observan los patrones de las formas L-DAP y meso-DAP.....	119
Figura 20: Cromatopla de los azúcares predominantes de los aislados QB8.1, P39, CS20.4, D9.1, L2 y CS32.1. En los extremos (1, 2, 3 y 4) se observan los patrones de arabinosa y galactosa.....	119

Figura 21: Comprobación extracción DNA. 1: CQG5.a; 2: L10; 3: CS25.1; 4: D7.1; 5: CS27.2; 6: CS32.3; 7: PB.7; 8: PA.3.....	120
Figura 22: Gel de PCR con los productos de amplificación del 16S rDNA.1 y 16: Marcador de peso molecular; 2: Blanco sin DNA; 3: P26; 4: QB17.2; 5: P1.2; 6:D1.1; 7: CS5.1; 8: Ca10.1; 9: RG4b; 10: C2.1; 11: C5.6; 12: C4.5; 13: 54B; 14: CS20.1; 15: N16-9.....	121
Figura 23: Comparación de la similaridad de las secuencias del gen 16S rDNA y los valores de hibridación DNA:DNA.....	126
Figura 24: Árbol filogenético parcial del género <i>Corynebacterium</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	128
Figura 25: Árbol filogenético parcial del género <i>Dietzia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	130
Figura 26: Árbol filogenético parcial (I) del género <i>Gordonia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	136
Figura 27: Árbol filogenético parcial (II) del género <i>Gordonia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	137
Figura 28: Árbol filogenético parcial del género <i>Microbacterium</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	138
Figura 29: Árbol filogenético parcial del género <i>Mycobacterium</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	140

Índice de figuras

Figura 30: Árbol filogenético parcial del género <i>Pseudonocardia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	142
Figura 31: Árbol filogenético parcial del género <i>Rhodococcus</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	144
Figura 32: Árbol filogenético parcial del género <i>Tsukamurella</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	147
Figura 33: Árbol filogenético parcial del género <i>Williamsia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	148
Figura 34: control positivo glucosa medio MSM (A) y aislado 54B en medio MSM suplementado con fenol (B).....	168
Figura 35: control positivo glucosa medio M9 (A) y aislado C5.5a en medio M9 suplementado con fenol (B).....	168
Figura 36: Gel de PCR con los productos de amplificación del gen catecol 1,2-dioxigenasa. 1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco sin DNA; 3: Control negativo; 4: Control positivo; 5: PB.1; 6:P39; 7: Ca27.1; 8: 54B; 9: QB7.1; 10: CS6.1.....	169

Actualmente, el tratamiento de las aguas residuales, tanto urbanas como industriales, se centra principalmente en la reducción de la demanda biológica de oxígeno y, en ocasiones, en la eliminación de nutrientes, tales como nitrógeno y fósforo, sin prestar demasiada atención a los microorganismos que realizan la depuración ni en los que interfieren en el proceso.

En estos ambientes se encuentra una gran diversidad de microorganismos que han sido estudiados con poco detalle y que podrían proporcionar soluciones prácticas y reales a los problemas que pudieran ocasionar al proceso de depuración de aguas y, además, proporcionar aplicaciones biotecnológicas importantes como puede ser la eliminación de compuestos recalcitrantes o tóxicos en diferentes ambientes contaminados. Es por ello que los estudios de biodiversidad bacteriana en estos ambientes mejorarían sustancialmente la eficacia del proceso de depuración de aguas y por lo tanto el medio ambiente, favoreciendo un crecimiento sostenible que repercutiría positivamente en el bienestar de la sociedad.

En base a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se planteó realizar un estudio de biodiversidad de actinomicetos aislados de diferentes estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y conocer qué tipo de especies estaban implicadas en los procesos de formación de espumas así como en la degradación de compuestos tóxicos.

Se estudiaron un total de 28 EDAR de diferentes localidades, la gran mayoría de ellas con frecuentes episodios de formación de espumas biológicas. Se procedió, en primer lugar, al aislamiento en placa en tres medios de cultivo distintos con el objeto de obtener la máxima biodiversidad posible. En total se obtuvieron 152 aislados con morfología típica de actinomiceto nocardioforme. Estos aislados se caracterizaron, en primer lugar, mediante observación morfológica, tinción Gram y detección de ácidos micólicos para comprobar que pertenecían al suborden *Corynebacterineae*. Posteriormente se realizó la detección del isómero del ácido diaminopimélico así como el azúcar predominante en la pared celular. Todos los aislados, excepto cinco, contienen ácidos micólicos, meso-diaminopimélico y arabinosa y galactosa como azúcares predominantes, por lo tanto pertenecen al suborden *Corynebacterineae*.

Para identificar los aislados a nivel de especie se realizó el análisis de las secuencias del 16S rDNA. Se amplificó el gen 16S con iniciadores universales, se secuenció y se elaboraron árboles filogenéticos con su correspondiente matriz de similaridad nucleotídica. Los resultados demuestran que el 66% de los aislados identificados pertenecen al género *Gordonia*, de los

Resumen

cuales solo el 22% pertenece a la especie *G. amarae*. El 11% de los aislados pertenece al género *Mycobacterium*, el 10% al género *Tsukamurella*, el 6% al género *Rhodococcus* y el 6,5% restante repartido entre los géneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia* y *Williamsia*. Para completar la identificación de los aislados mediante taxonomía polifásica se realizaron una serie de tests fenotípicos para corroborar la identificación filogenética. En algunas especies la identificación no es concluyente por lo que se puede pensar que se trata de especies nuevas.

Una vez identificados los aislados, se realizaron estudios de biodegradación de dos compuestos tóxicos derivados del petróleo, como son el fenol y el naftaleno. Para ello se cultivaron las cepas en tres medios de cultivo minerales utilizando como única fuente de carbono el fenol y el naftaleno por ser estas sustancias las que mayores problemas ocasionaban en las depuradoras industriales. Finalmente, se realizó la puesta a punto de la técnica de PCR para la detección del gen catecol 1,2-dioxigenasa y así determinar el potencial genético de biodegradación de los microorganismos identificados.

El resultado indica que un 50% de cepas degradan, al menos, un compuesto tóxico. El gen de la catecol 1,2-dioxigenasa se detectó en el 20% de los aislados.

La taxonomía polifásica se mostró como el método más fiable para la identificación a nivel de especie de los microorganismos aislados en EDAR. Asimismo, se observó que existe una gran diversidad de especies que no han sido frecuentemente encontradas en otras plantas depuradoras y que un elevado porcentaje tenía la capacidad de degradar compuestos tóxicos con lo que, además de permitir mejorar el proceso biológico en función de las bacterias filamentosas encontradas y así mejorar la calidad del efluente, existe la capacidad de utilización de esas bacterias degradadoras en otros ambientes contaminados y, por tanto, la mejora del medio ambiente en general.

Actualment, el tractament de les aigües residuals, tant urbanes com industrials, es centra principalment en la reducció de la demanda biològica d'oxigen i, en ocasions, en l'eliminació de nutrients, tals com el nitrogen i fòsfor, sense prestar massa atenció als microorganismes que realitzen la depuració ni en els que interfereixen en el procés.

En aquests ambients es troba una gran diversitat de microorganismes que han estat estudiats amb poc detall i que podrien proporcionar solucions pràctiques i reals als problemes que poguessin ocasionar al procés de depuració d'aigües i, a més, proporcionar aplicacions biotecnològiques importants com pot ser l'eliminació de compostos reclacitrants o tòxics en diferents ambients contaminats. És, per això, que els estudis de biodiversitat bacteriana en aquests ambients millorarien substancialment l'eficàcia del procés de depuració d'aigües i per tant el medi ambient, afavorint un creixement sostenible que repercutiria positivament en el benestar de la societat.

Sobre la base de l'anteriorment exposat, en aquest treball es va plantejar realitzar un estudi de biodiversitat d'actinomicets aïllats de diferents estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) i conèixer què tipus d'espècies estaven implicades en els processos de formació d'escumes així com en la degradació de compostos tòxics.

Es van estudiar un total de 28 EDAR de diferents localitats, la gran majoria d'elles amb freqüents episodis de formació d'escumes biològiques. Es va procedir, en primer lloc, a l'aïllament en placa en tres medis de cultiu diferents amb l'objecte d'obtenir la màxima biodiversitat possible. En total es van obtenir 152 aïllats amb morfologia típica d'actinomicet nocardioforme. Aquests aïllats es van caracteritzar, en primer lloc, mitjançant observació morfològica, tinció Gram i detecció d'àcids micòlics per comprovar que pertanyien al subordre *Corynebacterineae*. Posteriorment es va realitzar la detecció de l'isòmer de l'àcid diaminopimèlic així com el sucre predominant en la paret cel·lular. Tots els aïllats, excepte cinc, contenien àcids micòlics, meso-diaminopimèlic i arabinosa i galactosa com sucres predominants, per tant pertanyen al subordre *Corynebacterineae*.

Per identificar els aïllats a nivell d'espècie es va realitzar l'anàlisi de les seqüències del 16S rDNA. Es va amplificar el gen 16S amb iniciadors universals, es va seqüenciar i es van elaborar arbres filogenètics amb la seva corresponent matriu de similitud nucleotídica. Els resultats demostren que el 66% dels aïllats identificats pertanyen al gènere *Gordonia*, dels quals

Resum

solament el 22% pertany a l'espècie *G. amarae*. El 11% dels aïllats pertany al gènere *Mycobacterium*, el 10% al gènere *Tsukamurella*, el 6% al gènere *Rhodococcus* i el 6,5% restant repartit entre els gèneres *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia* i *Williamsia*. Per completar la identificació dels aïllats mitjançant taxonomia polifàsica es van realitzar una sèrie de tests fenotípics per corroborar la identificació filogenètica. En algunes espècies la identificació no és conclouent pel que es pot pensar que es tracta d'espècies noves.

Una vegada identificats els aïllats, es van realitzar estudis de biodegradació de dos compostos tòxics derivats del petroli, com són el fenol i el naftalé. Per això es van cultivar els aïllats en tres medis de cultiu minerals utilitzant com a única font de carboni el fenol i el naftalé per ser aquestes substàncies les que majors problemes ocasionaven en les depuradores industrials. Finalment, es va realitzar la posada a punt de la tècnica de PCR per a la detecció del gen catecol 1,2-dioxigenasa i així determinar el potencial genètic de biodegradació dels microorganismes identificats.

El resultat indica que un 50% de aïllats degraden almenys un compost tòxic. El gen de la catecol 1,2-dioxigenasa es va detectar en el 20% dels aïllats.

La taxonomia polifàsica es va mostrar com el mètode més fiable per a la identificació a nivell d'espècie dels microorganismes aïllats en EDAR. Així mateix, es va observar que existeix una gran diversitat d'espècies que no han estat freqüentment trobats en altres plantes depuradores i que un elevat percentatge tenia la capacitat de degradar compostos tòxics amb el que, a més de permetre millorar el procés biològic en funció dels bacteris filamentosos trobats i així millorar la qualitat de l'efluent, existeix la capacitat d'utilització d'aquests bacteris degradadors en altres ambients contaminats i, per tant, la millora del medi ambient en general.

Currently, urban and industrial wastewater treatment plants (WWTP), are focused mainly on the reduction of biological oxygen demand and sometimes on the removal of nutrients such as nitrogen and phosphorus without paying too much attention neither the microorganisms that perform the treatment nor the microorganisms that interfere in the process.

In these environments there is a large diversity of microorganisms that haven't been studied in detail and that could provide real and practical solutions to the problems that could be caused by the wastewater treatment process. These microorganisms could also provide important biotechnological applications such as the elimination of recalcitrant or toxic compounds in different contaminated environments. That is why studies of bacterial biodiversity in these environments would substantially improve the efficiency of water treatment process and therefore the environment, promoting sustainable development that would have a positive impact on the society's welfare.

On the basis of the above, this work propounded a study of the biodiversity of actinomycetes isolated from different wastewater treatment plants (WWTP) and the identification of the species involved in the processes of foam formation and degradation of toxic compounds.

Twenty eight WWTP from different localities were studied, most of them with frequent episodes of biological foaming. First of all, plate isolation in three different culture media was carried out in order to obtain the maximum possible biodiversity. A total of 152 isolates were obtained with typical morphology of nocardioform actinomycete. These isolates were characterized, first, by morphological observation, Gram staining and mycolic acids detection to verify they belong to the suborder *Corynebacterineae*. Then, detection of diaminopimelic acid isomer and of the predominant sugar in cell wall was performed. All isolates, except five, contain mycolic acids, meso-diaminopimelic and arabinose and galactose as predominant sugars, therefore these isolates belong to the suborder *Corynebacterineae*.

To identify the isolates to species level, sequence analysis of 16S rDNA was performed. 16S gene was amplified with universal primers, sequenced and phylogenetic trees were constructed with the corresponding nucleotide similarity matrix. The results show that 66% of the identified isolates belong to the genus *Gordonia*, of which only 22% belong to the species *G. amarae*. 11% of the isolates belong to the genus *Mycobacterium*, 10% to the genus *Tsukamurella*, 6% to the genus *Rhodococcus* and the remaining 6.5% distributed among the

Abstract

genera *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Pseudonocardia* and *Williamsia*. To complete the identification of the isolates by the means of polyphasic taxonomy, a series of phenotypic tests was conducted to corroborate the phylogenetic identification. In some species, the identification is not conclusive, so may be considered they are new species.

Once the isolates were identified, studies of biodegradation of two toxic compounds from petroleum, such as phenol and naphthalene, were carried out. For this purpose, strains were grown in three mineral culture media, using as the sole carbon source phenol and naphthalene, because these substances cause the worst problems in industrial water treatment plants. Finally, PCR technique adjustment was conducted for the detection of catechol 1,2-dioxygenase gene and so to determine the genetic potential of biodegradation of identified microorganisms.

The result indicates that 50% of strains degrade at least one of the toxic compounds. The catechol 1,2-dioxygenase gene was detected in 20% of the isolates.

Polyphasic taxonomy was found to be the most reliable method for species level identification of isolates from WWTP. It was also noted that there is a great diversity of species that are not often found in other treatment plants and that a high percentage of the species had the ability to degrade toxic compounds. In this way, besides the fact that the biological process can be optimized depending on the filamentous bacteria found and the effluent quality can be improved, these degrading bacteria can be used in contaminated environments to improve the environment in general.

INTRODUCCIÓN

1.- Diversidad microbiana

El término biodiversidad nos evoca frecuentemente la imagen de ecosistemas en los que abundan especies vegetales y animales, como es el caso de las selvas tropicales. Sin embargo, en nuestro planeta los organismos que presentan una mayor biodiversidad biológica y funcional son los microorganismos (Oren, 2004; Schleifer, 2004; González Pastor, 2010).

El hecho de que exista una gran variedad de microorganismos y que muchos de ellos hayan sido estudiados con poco detalle, abre la posibilidad de su estudio para su uso y beneficio en algún aspecto de tipo industrial. En este sentido, los microorganismos pertenecientes a la clase *Actinobacteria* (bacterias Gram positivas con un alto contenido en Guanina y Citosina) genéricamente conocidos como actinomicetos, destacan por su capacidad para producir importantes compuestos activos (Stackebrandt *et al.*, 1997) y diversas aplicaciones biotecnológicas (Bull *et al.*, 2000).

El aprovechamiento de los recursos microbianos presentes en nuestros ecosistemas, por ejemplo en las aguas residuales, permitiría profundizar en el estudio de microorganismos capaces de producir diversos metabolitos, que pudieran ser empleados para la obtención de algún bien o servicio en favor del ser humano, así como para estudiar de una forma precisa y objetiva cualquier forma de vida existente en nuestro entorno.

El mundo viviente es uniforme, sobre todo, en la composición química en cuanto a la presencia de las moléculas portadoras de la información genética (DNA y RNA) que, a su vez, es transmitida a los descendientes. A partir de esta capacidad de multiplicación, los seres vivos se diversifican, evolucionan y, con el tiempo, se adaptan a distintos ambientes y situaciones (Volcy, 2004).

Basándose en esto, caben al menos dos tipos de definición de la vida. La primera, planteada por Lynn Margulis y la más generalizada, considera que la vida sobre la Tierra es exclusivamente celular y, por lo tanto, como afirma Forterre (1999), "la forma de vida mínima es un sistema circunscrito en un compartimento semi-permeable y que produce sus propios elementos constitutivos por la transformación de la energía y de los nutrientes". Desde este punto de vista, el metabolismo o autopoyesis es la esencia de la vida, lo cual implica capacidad

Introducción

para sintetizar proteínas, sincronizar las reacciones vitales, mantener su organización a nivel molecular y estructural, y capacidad continua de auto-reparación. La segunda postura asocia la vida a las moléculas con capacidad para autoreplicarse y dotadas de mecanismos de adaptación y evolución. En este caso, la vida pudo haber aparecido bajo la forma de moléculas de RNA capaces de multiplicarse (Margulis y Dolan, 2006).

El científico John Maynard Smith plantea que la evolución es la esencia de la vida misma. A su modo de ver, “la vida es un equilibrio activo entre el organismo vivo y su medio” y si este último se modifica excesivamente, se rompe, conduce a la muerte de los seres vivos y/o a la supervivencia de algunos. Un ser vivo, en su concepto, es aquel que puede variar, que puede multiplicarse y que puede evolucionar (Maynard y Eörs, 2001).

Maynard Smith considera diferentes tipos de adaptación que pueden darse por distintos mecanismos. Se refiere en primer lugar a la adaptación genética, si el organismo posee los caracteres que le permiten vivir en unas condiciones determinadas; una adaptación fisiológica cuando es capaz de cambiar y reajustar su fisiología de acuerdo con los cambios externos, y según la expresión del propio autor, una adaptación “desarrollática” y flexible, cuando el organismo, bajo unas nuevas condiciones, elabora estructuras aptas y especiales para su supervivencia (Maynard y Eörs, 2001).

De este modo, la adaptación cataliza el proceso evolutivo, conduce a variantes biológicas e intraespecíficas y refleja así las diferencias genéticas. En cierta medida, la adaptación es un proceso rítmico con una regularidad temporal y en una secuencia predeterminada. Por otro lado, debido a que no es un proceso fiel, la adaptación conduce a la innovación y asegura la perpetuación de la vida (Volcy, 2004).

Tradicionalmente, los microorganismos y organismos en general han sido catalogados en procariontes y eucariontes basándose en la presencia o ausencia de membrana nuclear. Carl Woese planteó, en la década de los 80, una propuesta radical con tres formas de vida: bacterias, arqueobacterias y eucariontes. Estas tres formas de vida son representadas en un árbol evolutivo que muestra la cercanía, el origen común y las relaciones filogenéticas entre las arqueobacterias y los eucariontes, en contraposición con el punto de vista más difundido, de la supuesta afinidad entre las arqueobacterias y las eubacterias. Quiere decir que estas dos

categorías son distintas entre sí y que la noción de procarionte (clasificación que engloba a ambas categorías) como grupo monofilético carecería de justificación (Woese, 1987).

Dentro de estos grupos podemos incluir a la totalidad de especies conocidas hasta el momento. Pero los aportes de biólogos, genetistas, ecólogos y fisiólogos hacen de la taxonomía una disciplina dinámica, flexible y cambiante; contrariamente a la opinión generalizada, no podría afirmarse una clasificación oficial para ningún grupo de organismos.

La cantidad o número de especies de los diferentes organismos, los nichos o hábitats ecológicos que ocupan y su diversidad genética constituyen los tres pilares de la biodiversidad. Estas tres áreas no están desligadas, se alimentan las unas de las otras, y en consecuencia, la diversidad o riqueza de especies revela de modo implícito una diversidad genética heterogénea de los organismos; al igual que la diversidad ecológica es una consecuencia de la diversidad de especies (Volcy, 2004).

Independientemente de las diferencias entre tipos de microorganismos, esta respuesta inesperada de crecimiento es el reflejo de su muy corto tiempo generacional y de la rapidez con que se adaptan a las nuevas condiciones. Las bacterias, debido a su capacidad de adaptación, incluso pueden adquirir genes de otras especies de bacterias cohabitantes recombinándolos y adquiriendo así nuevas funciones (Volcy, 2004).

En los eucariotas, una especie es “cualquier grupo de organismos vivientes que comparten un conjunto de características y que son capaces de aparearse en estado natural”; y la especiación es “el proceso evolutivo que genera nuevas especies” que, al mantenerse aisladas, se vuelven tan diferentes que ya no pueden cruzarse. Por lo pronto, se acepta esta definición clásica de especie a pesar de su impracticabilidad en diversos grupos de microorganismos, tales como los procariotas.

La unidad básica en taxonomía de procariotas se ajusta al concepto que denominamos filo-fenético, y entiende una especie como una categoría que circunscribe a un grupo de cepas de origen monofilético y que se muestran coherentes tanto desde el punto de vista genómico como fenotípico, y que por ello se pueden distinguir de otros grupos semejantes (Roselló-Mora y Amann, 2001).

Introducción

Basándonos en lo anteriormente expuesto, podríamos formularnos la siguiente pregunta, ¿cuántas formas de vida existen? o, al menos ¿cuántas de ellas conocemos?. En la tabla 1 podemos encontrar respuesta a esta pregunta.

Tabla 1: Especies descritas y estimadas de los diferentes grupos de microorganismos (Schleifer, 2004)

Grupo	Especies descritas	Especies estimadas
Procariotas	5.000	> 1.000.000
Hongos	72.000	1.500.000
Algas	40.000	400.000
Protozoos	40.000	200.000

Las bacterias son los organismos con mayor capacidad metabólica pudiendo realizar funciones propias de plantas, animales y hongos. La mayoría recicla los compuestos hidrocarbonados, algunas fotosintetizan como las plantas, y otras descomponen diversos compuestos como los hongos. Su capacidad de fermentación es prácticamente ilimitada, y por otra parte, son los mayores productores de antibióticos (Volcy, 2004).

Por ello, a través de la biodiversidad microbiana, se puede conocer las aplicaciones de los microorganismos en término de producción de antibióticos, control biológico, fuente de alimentos y, en una palabra, aplicaciones para el bienestar de la sociedad (Bull *et al.*, 2000).

Los microorganismos son ubicuos y, de estos, las bacterias son las más cosmopolitas. La mayor cantidad de bacterias se halla en el suelo, pero se estima una mayor presencia todavía en los fondos oceánicos.

2.- Phylum Actinobacteria

En la década de los años 90 se observó que las secciones del Volumen 4 del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams *et al.*, 1989) no coinciden con los datos de la secuencia del 16S rDNA. Con el fin de corregir este problema se realizó una propuesta para una nueva clasificación jerárquica basada en el estudio filogenético de las secuencias del 16S rDNA. En 1997 se propone la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997) compuesta por el orden *Actinomycetales* y sus parientes filogenéticos con un alto contenido en G+C. La clase *Actinobacteria* constituye uno de los principales phyla dentro del dominio Bacteria (Ludwig y

Klenk, 2001). Esta clasificación adoptó 95 géneros, pertenecientes a 30 familias y 10 subórdenes.

La segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone *et al.*, 2001) recoge la clasificación actual, en la que la clase *Actinobacteria* se eleva al rango de *Phylum*. Dentro del *Phylum* se reconoce una única clase, *Actinobacteria*, que mantiene la estructura jerárquica propuesta por Stackebrandt *et al.*, (1997). En el año 2006 Dworkin y sus colaboradores adoptaron una nueva clasificación donde se incluían 6 órdenes, 39 familias y más de 130 géneros. Actualmente (Figura 1), el *phylum Actinobacteria* cuenta con más de 215 géneros, englobados en 50 familias, 13 subórdenes y 5 órdenes, siendo el más importante el orden *Actinomycetales*, grupo conocido como actinomicetos (Zhi *et al.*, 2009).

2.1.- Orden *Actinomycetales*

Los actinomicetos forman un grupo de microorganismos morfológicamente muy heterogéneo, pertenecientes al dominio Bacteria, formado por bacterias generalmente aerobias, Gram-positivas, con alto contenido en G+C. Muchos de ellos forman filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales. Su diversidad morfológica es considerable, desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas. Dos de las propiedades más significativas de los actinomicetos son su capacidad para desarrollarse sobre sustratos muy diversos que no pueden ser usados por otros microorganismos, como la quitina y celulosa y su aptitud para sintetizar numerosos metabolitos bioactivos. Estas propiedades ponen de manifiesto la riqueza destacable del metabolismo celular de este grupo microbiano (Goodfellow *et al.*, 1997).

El interés por los actinomicetos comenzó a raíz del descubrimiento de la capacidad de estos microorganismos para producir antibióticos. Aunque la búsqueda de compuestos bioactivos sigue en auge, el interés por los actinomicetos se ha diversificado y actualmente ocupa áreas muy variadas. Pueden ser patógenos de plantas, de animales, de humanos, descomponer productos del caucho o crecer en el combustible de los aviones. En las estaciones depuradoras de aguas residuales causan espumas densas que llegan a obstruir las instalaciones. Por la diversidad de hábitats que pueden colonizar este grupo de microorganismos tiene un enorme interés ecológico (Dworkin *et al.*, 2006).

Introducción

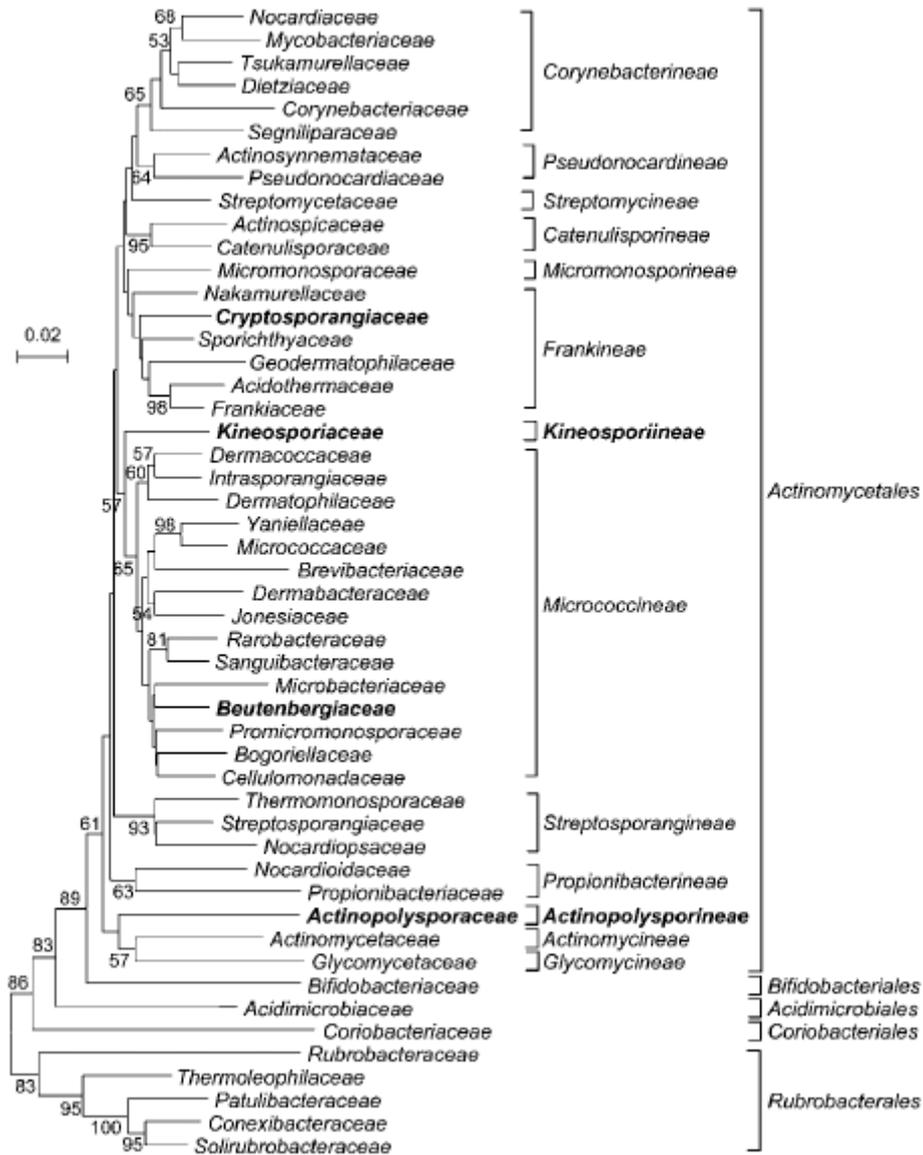


Figura 1: Relación intraclase del *phylum Actinobacteria*, basada en la comparación de las secuencias del 16S rDNA/rRNA (Zhi *et al.*, 2009)

La primera clasificación formal se dio en el año 1943 por Waksman y Henrici, al considerar dichos microorganismos como un puente evolutivo entre bacterias y hongos. Transcurrieron varias décadas considerando a este grupo microscópico como parte del reino *Fungi* debido a su similitud morfológica. Su nombre proviene del griego *actis*: rayo de sol y *mykes*: hongo, por lo que dada su forma era fácil denominarlos “hongos radiados”.

El taxón incluye géneros con morfologías diferentes. Así podemos encontrar organismos que forman micelio ramificado y bien diferenciado como es el caso del género *Streptomyces*, otros poseen hifas que pueden fragmentar, como es el caso del género *Nocardia* o el género

Rhodococcus; además varios géneros como *Gordonia* y *Mycobacterium* poseen formas cocáceas o cocobacilares.

Los actinomicetos están presentes en todo tipo de suelos tanto en las capas más superficiales como en horizontes profundos disminuyendo su concentración con la profundidad. Suele ser el segundo grupo de microorganismos más abundante, después de las bacterias no actinomicetos. Los actinomicetos utilizan como fuente de carbono compuestos simples y complejos tales como ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Muchos pueden degradar proteínas, lípidos, almidón y quitina. Estos microorganismos participan en muchos procesos, tales como la descomposición de los compuestos más resistentes procedentes de plantas y animales, formación de humus, fermentación del compost, causantes de fitopatologías, infecciones en animales y en humanos y simbiosis con plantas.

Actualmente se cuenta con más de 10.000 productos aislados tan solo del orden de los actinomicetales (Bull y Stach, 2007). Entre los metabolitos secundarios se encuentran antibióticos, antitumorales, inmunosupresores y enzimas. Debido a la excelente trayectoria de las actinobacterias en este campo, se han diseñado numerosas estrategias para el aislamiento de estas a lo largo de la historia. La falta de accesibilidad a hábitats poco comunes como los que constituyen los ecosistemas acuáticos, poco a poco se ha ido superando con los avances tecnológicos (Fenical y Jensen. 2006).

Las aguas residuales, tanto urbanas como industriales, representan una gran fuente no explotada de aislamiento de nuevos actinomicetos con elevado potencial de producción de metabolitos secundarios activos. De ellos se conoce su producción de diversos compuestos con un amplio rango de actividad biológica (Bredholt *et al.*, 2008).

Debido a las distintas características existentes entre los hábitats terrestres y acuáticos, se refleja, por tanto, una gran diversidad genética y metabólica (Lam, 2006).

Es precisamente debido al interés desde el punto de vista económico, que la búsqueda de actinomicetos se ha reorientado hacia ambientes poco estudiados como sedimentos de ríos, lagos, océanos e incluso desiertos (Maldonado *et al.*, 2009; Okoro *et al.*, 2009; Zhang *et al.*,

Introducción

2010), pues ofrecen la posibilidad de encontrar cepas nativas desconocidas que produzcan nuevos metabolitos activos.

2.1.1.- Suborden *Corynebacterineae*

Dentro de este suborden están incluidos los actinomicetos caracterizados por la presencia de ácidos micólicos, también llamados mycolata. En la tabla 2 se muestra la nueva clasificación, propuesta para este suborden, formado por 6 familias: *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Segniliparaceae* y *Tsukamurellaceae* (Zhi et al., 2009). Los microorganismos pertenecientes al suborden *Corynebacterineae* son mayoritariamente aerobios, contienen en la pared celular ácido meso-diaminopimélico y los azúcares predominantes en la pared celular son la galactosa y la arabinosa (quimiotipo de pared celular IV). Asimismo, poseen ácidos micólicos, son Gram positivos y catalasa positivos.

Tabla 2: Clasificación jerárquica del suborden *Corynebacterineae* basada en las secuencias de DNA y RNA ribosómico 16S (Zhi et al., 2009)

Suborden	Familia	Género
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
	<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia</i>
	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Amycolobicoccus</i> <i>Mycobacterium</i>
	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Gordonia</i> <i>Millisia</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Skermania</i> <i>Williamsia</i>
	<i>Segniliparaceae</i>	<i>Segniliparus</i>
	<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>Tsukamurella</i>

2.1.1.1.- Familia *Corynebacterineae*

Es la familia tipo del suborden *Corynebacterineae*. Contiene un único género, *Corynebacterium* (Zhi et al., 2009). *Corynebacterium* está incluido en el grupo 20 del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994).

2.1.1.1.1.- Género *Corynebacterium*

El género *Corynebacterium* contiene bacilos rectos o levemente curvados, a menudo de extremos afilados, cuyo tamaño oscila entre 2-6 µm de longitud y 0,5 µm de diámetro. Son bacterias Gram positivas, catalasa positivas, no esporuladas, que carecen de motilidad, aerobias y anaerobias facultativas. Su contenido en G+C expresado en mol% se encuentra entre el 51-65%. Las corinebacterias poseen un quimiotipo de pared celular tipo IV, esto es, ácido meso-diaminopimélico en el tetrapéptido de la mureína, arabinosa y galactosa como azúcares predominantes en la pared celular y ácidos micólicos de 22-36 átomos de carbono (Collins y Cummins, 1986). Actualmente se conocen 85 especies validadas de este género. La especie tipo del género es *Corynebacterium diphtheriae* (Euzéby, 2011).

Corynebacterium es un género muy diverso que se encuentra en gran variedad de ambientes y que contiene importantes especies patógenas humanas como *C. diphtheriae*. Ciertos saprófitos, como *C. glutamicum*, poseen una larga tradición como microorganismos industriales en procesos de producción biotecnológica debido a la producción de aminoácidos y nucleótidos (Theilleux, 2000). Aunque este género pertenece al grupo de los mycolata que, frecuentemente ocasionan problemas en estaciones depuradoras con sistemas de fangos activos, hasta ahora ninguna especie de *Corynebacterium* se ha visto implicada en estos problemas.

2.1.1.2.- Familia *Dietziaceae*

Solamente posee un único género, *Dietzia* (Rainey *et al.*, 1995).

2.1.1.2.1.- Género *Dietzia*

Este género fue propuesto para organismos inicialmente conocidos como *Flavobacterium maris* y después *Rhodococcus maris* (Nesterenko *et al.*, 1982). Posteriormente se reclasificó como *Dietzia maris* basándose en la secuencia del 16S rDNA (Rainey *et al.*, 1995). El género *Dietzia* está constituido por cocobacilos, Gram-positivos, catalasa positivos, aerobios y no formadores de esporas. Posee un quimiotipo de pared celular IV. Contiene ácidos micólicos de 34-38 átomos de carbono. Su contenido en G+C, expresado en mol%, es del 73% (Rainey *et al.*, 1995).

Introducción

Actualmente se conocen 12 especies validadas de este género, siendo la especie tipo del género *Dietzia maris* (Euzéby, 2011). Se conoce un caso en el que *Dietzia maris* ha causado infección nosocomial asociado a prótesis por lo que esta especie debería ser considerada como un potencial patógeno oportunista (Pidoux *et al.*, 2001).

2.1.1.3.- Familia *Mycobacteriaceae*

Contiene dos géneros, *Mycobacterium* y *Amycolicoccus* (Euzéby, 2011).

2.1.1.3.1.- Género *Amycolicoccus*

Este género ha sido descrito recientemente y solamente posee 1 especie, *Amycolicoccus subflavus* (Euzéby, 2011). Está compuesto por cocos sin flagelo, aerobios y Gram positivos. La pared celular contiene arabinosa, galactosa, glucosa y xilosa como azúcares predominantes. El contenido en G+C, expresado en mol%, es aproximadamente del 60%. El rasgo predominante del género es que no posee ácidos micólicos (Wang *et al.*, 2010).

2.1.1.3.2.- Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* está compuesto por bacilos ligeramente curvos o rectos. Son aerobios y catalasa positivos. El quimiotipo de pared celular es IV y el contenido en G+C, expresado en mol%, es del 62-70%. Sus paredes celulares son muy ricas en lípidos y contienen ceras con ácidos micólicos de 60 a 90 átomos de carbono. La presencia de ácidos micólicos y de otros lípidos por fuera de la capa de peptidoglicano hace que las micobacterias sean fuertemente ácido-alcohol resistentes (Sneath *et al.*, 1986). Actualmente se conocen 145 especies validadas de este género, siendo la especie tipo del género *Mycobacterium tuberculosis* (Euzéby, 2011).

Las micobacterias suelen crecer muy lentamente y han de ser incubadas desde 2 hasta 40 días tras su inoculación en un medio complejo solidificado para formar colonias visibles. Se dividen en micobacterias de lento crecimiento y de rápido crecimiento. Las micobacterias patógenas suelen ser de lento crecimiento, como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, mientras que las de rápido crecimiento se consideran ambientales y son frecuentemente aisladas del suelo, como *Mycobacterium moriokaense* (Hartmans y de Bont, 1992).

Se ha demostrado que las micobacterias pueden multiplicarse en agua pura aunque la materia orgánica favorece su crecimiento (Dailloux *et al.*, 1999). En sistemas de tratamiento de aguas potables han sido aisladas diversas especies de micobacterias no tuberculosas (Le Dantec *et al.*, 2002, Torvinen *et al.*, 2004). Aunque las micobacterias se pueden observar en fangos activos, no se ha demostrado todavía que son responsables de formación de espumas biológicas.

2.1.1.4.- Familia *Nocardiaceae*

Contiene 6 géneros, *Nocardia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Rhodococcus*, *Skermania* y *Williamsia* (Stackebrandt *et al.*, 1997, Chun *et al.*, 1997, Zhi *et al.*, 2009) descritos en la sección 17 (nocardioformes) y sección 26 (actinomicetos nocardioformes) de la primera edición del Manual Bergey's (Williams *et al.*, 1989).

El término nocardioforme, introducido por Prauser en 1967, hace referencia a los actinomicetos que forman un micelio fugaz que se fragmenta en elementos bacilares o cocoides. Actualmente, ésta no es una definición satisfactoria ya que se conocen cepas individuales de nocardioformes que no presentan esta característica. Este término intentó unir, de una manera informal, un número de organismos con características similares sin que eso significara que fueran organismos estrechamente relacionados.

2.1.1.4.1.- Género *Gordonia*

Originariamente, este género fue propuesto por Tsukamura en 1971 para algunos actinomicetos débilmente ácido-alcohol resistentes, aislados del suelo y de esputos de pacientes con enfermedades pulmonares. Las tres especies originales *G. bronchialis*, *G. rubropertincta* y *G. terrae* fueron transferidas en 1977 por Goodfellow y Alderson al género *Rhodococcus* desapareciendo como tal el género *Gordonia*. Posteriormente, el descubrimiento de que en el género *Rhodococcus* existían dos grupos filogenéticamente distintos, según el análisis de la secuencia del 16S rDNA, condujo a Stackebrandt *et al.* (1988) a recuperar el género *Gordonia*.

Actualmente existen 33 especies de *Gordonia* válidamente descritas, siendo la especie tipo del género *Gordonia bronchialis* (Euzéby, 2011). *Gordonia amarae* fue transferida desde el género *Nocardia* a este género en base a sus propiedades químicas, fenotípicas y a la secuencia

Introducción

del 16S rDNA (Klatte *et al.*, 1994, Goodfellow *et al.*, 1994). Desde su primera descripción como *N. amarae* (Lechevalier y Lechevalier, 1974) esta especie ha sido aislada en gran cantidad de plantas depuradoras con sistemas de fangos activos y es uno de los mycolata más frecuentemente implicados en problemas de espumas biológicas (Iwahori *et al.*, 2001).

El género incluye pequeños bacilos y formas cocáceas. Pueden formar hifas con ramificaciones en ángulo recto, son aerobios, Gram-positivos o Gram-variable, catalasa positivos y normalmente parcialmente ácido-alcohol resistentes. Forman colonias marrónáceas, rosas, naranjas o rojas cuyas células se encuentran en algunos casos formando agregados. La pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico (DAP) y los azúcares mayoritarios son galactosa y arabinosa (quimiotipo de pared celular IV), estando comprendido su contenido en G+C, expresado en mol%, entre el 60% y el 70%. Poseen ácidos micólicos de 48-66 átomos de carbono (Arensköter *et al.*, 2004).

El género *Gordonia* ha sido considerado como patógeno oportunista aislado de esputos de pacientes con afecciones pulmonares como *G. sputi* y *G. bronchialis* (Tsukamura, 1982) o como productor de bacteremias (Pham *et al.*, 2003). Sin embargo, muchas de las especies aisladas presentan una diversidad metabólica considerable y son capaces de degradar xenobióticos como *G. desulfuricans* y *G. amicalis* (Kim *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2000), alcanos como *G. alkanivorans* (Kummer *et al.*, 1999) o caucho como *G. polyisoprenivorans* (Linos *et al.*, 1999), mientras que otras especies como *G. hydrophobica* y *G. hirsuta* (Bendinger *et al.*, 1995, Klatte *et al.*, 1996) son capaces de eliminar malos olores en biofiltros. La diversidad metabólica de este género queda reflejada en la revisión realizada por Arensköter *et al.*, (2004). Otra especie de este género, *G. jacobea*, produce pigmentos de aplicación industrial (De Miguel *et al.*, 2000). La etimología del género fue corregida por Stackebrandt en 1997 quedando como *Gordonia* y no *Gordona* (Stackebrandt *et al.*, 1997).

2.1.1.4.2.- Género *Millisia*

Este género fue propuesto por Soddell *et al.* en 2006 y fue aislado de espumas procedentes de plantas de fangos activados. Actualmente la única especie de este género es, *Millisia brevis* (Euzéby, 2011). Está constituido por bacilos con ramificaciones en ángulo recto, aerobios, Gram-positivos o Gram-variables, ácido-alcohol resistentes, catalasa positivos y con gránulos de polifosfato. Forman colonias rosáceo-asalmonadas, irregulares y con escasos

filamentos. La pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico (DAP) y los azúcares mayoritarios son galactosa y arabinosa (quimiotipo de pared celular IV). Poseen ácidos micólicos de 44-52 átomos de carbono. Su contenido en G+C, expresado en mol%, es del 64,7%.

2.1.1.4.3.- Género *Nocardia*

La primera *Nocardia* fue aislada en 1888 por el veterinario y bacteriólogo francés Edmond Nocard y fue caracterizada un año después por Trevisan, el cual le dio el nombre de *Nocardia farcinica*. En 1980 *N. asteroides* sustituyó a *N. farcinica* como especie tipo (Wallace *et al.*, 1990).

Actualmente estas cepas se incluyen en el llamado *Nocardia asteroides* complex constituido por *N. asteroides* “*sensu stricto*”, *N. farcinica* y *N. nova* y se dispone de métodos moleculares precisos para diferenciar estas tres especies (Steingrube *et al.*, 1995).

Desde la transferencia de *N. amarae* al género *Gordonia* como *G. amarae* (Goodfellow *et al.*, 1994) y de *N. pinensis* al género *Skermania* como *S. piniformis* (Chun *et al.*, 1997) el género *Nocardia* ha quedado como un taxón homogéneo. El género *Nocardia* contiene 79 especies válidamente descritas, siendo la especie tipo del género *Nocardia asteroides* (Euzéby, 2011). Se ha demostrado que una de estas especies, *N. farcinica*, es una de las responsables de la formación de espumas en plantas de fangos activos (Stratton *et al.*, 1996).

Nocardia está distribuido en el suelo de todo el planeta y se encuentra también en hábitats acuáticos. Se ha llegado a detectar especies de *Nocardia* en aguas oligotróficas radiactivas (Chicote Guerrero, 2004). Aunque en su mayoría son saprófitos de vida libre, algunas especies, en particular *N. asteroides*, son patógenas oportunistas que causan nocardiosis en seres humanos y en algunos animales. Es más frecuente la afectación pulmonar, pero también pueden llegar a invadir el sistema nervioso y otros órganos (McNeil *et al.*, 1994).

Son aerobios, catalasa positivos, parcialmente ácido-alcohol resistentes, Gram-positivos o Gram-variables. Forman un micelio aéreo, aunque únicamente visible al microscopio, que se eleva por encima del agar, donde ocasionalmente se pueden encontrar conidios. Las hifas del micelio del sustrato adquieren unas dimensiones de 0.5 - 1,2 µm de diámetro y la principal característica morfológica de este género es la tendencia a fragmentarse con facilidad en bacilos

Introducción

y elementos cocoides. Las hifas forman ramificaciones características en ángulo recto. Las colonias tienen un aspecto aterciopelado o calcáreo y pueden ser marrones, rosas, rojas, naranjas, púrpuras, grises o blancas y, además, pueden producir pigmentos solubles de color marrón o amarillo. Los componentes mayoritarios de la pared celular son el ácido *meso*-DAP y la arabinosa y la galactosa como azúcares predominantes. Contienen ácidos micólicos de 44-60 átomos de carbono y su contenido en G+C, expresado en mol%, es del 64-72%.

2.1.1.4.4.- Género *Rhodococcus*

El género *Rhodococcus* abarca actinomicetos aerobios, Gram-positivos, catalasa positivos y parcialmente ácido-alcohol resistentes en alguno de sus estados de crecimiento. Son coco-bacilos que pueden formar micelio de sustrato que da lugar a la aparición de extensas hifas, mientras que tan sólo en algunas especies es característico un micelio aéreo visible al microscopio. Las colonias de *Rhodococcus* pueden ser aterciopeladas, rugosas o mucosas, de color rojo, naranja, amarillo o crema. Los componentes mayoritarios del peptidoglicano de la pared celular son el ácido *meso*-DAP y la arabinosa y galactosa como azúcares predominantes. Contiene ácidos micólicos de 32-66 átomos de carbono y su contenido en G+C, expresado en mol%, es del 73%.

El hábitat de *Rhodococcus* es muy amplio y frecuentemente es aislado de suelos, medios acuáticos y excrementos de animales herbívoros. Existen 31 especies de *Rhodococcus* válidamente descritas, siendo la especie tipo del género *Rhodococcus rhodochrous* (Euzéby, 2011). Algunas especies como *R. equi* son patógenos para hombres y animales. Otras especies tienen interés medioambiental ya que son capaces de degradar herbicidas y otros compuestos (Finnerty, 1992, Briglia *et al.*, 1996).

2.1.1.4.5.- Género *Skermania*

Nocardia pinensis fue propuesta como una de las principales especies de actinomicetos que ocasionan espumas en las superficies de los tanques de aireación de las plantas de tratamiento de aguas residuales de Australia (Blackall *et al.*, 1989). La secuencia completa del 16S rDNA y la estructura de los ácidos micólicos representativos de los mycolata ha sido determinante para clarificar la posición taxonómica de esta especie, ya que pone de manifiesto el error al clasificarla en el género *Nocardia*, a pesar de estar relacionada filogenéticamente con las

distintas familias que integran la clase *Actinobacteria*. En base al estudio realizado por Chun *et al.* (1997), *Nocardia pinensis* fue reclasificada como un género nuevo dentro de la familia *Nocardiaceae*, renombrándose como *Skermania piniformis*, la única especie del género.

El género *Skermania* lo componen bacterias filamentosas, Gram-positivas, no ácido-alcohol resistentes con un metabolismo oxidativo y catalasa, oxidasa y ureasa positivos. Los componentes mayoritarios de la pared celular son el ácido *meso*-DAP y la arabinosa y galactosa como azúcares predominantes. El número de átomos de carbono de sus ácidos micólicos oscila entre 58 y 64, y su contenido en G + C, expresado en mol%, es del 67.5% (Chun *et al.*, 1997).

2.1.1.4.6.- Género *Williamsia*

Este nuevo género fue aislado de las paredes de una guardería en Finlandia (Kämpfer *et al.*, 1999). Existen 6 especies de *Williamsia* válidamente descritas, siendo la especie tipo del género *Williamsia muralis* (Euzéby, 2011). Los componentes mayoritarios de la pared celular son el ácido *meso*-DAP, y los azúcares arabinosa, galactosa, manosa y ribosa. El número de átomos de carbono de sus ácidos micólicos oscila entre 50 y 56. La secuencia del 16S rDNA indica que representa un taxón dentro del suborden *Corynebacterineae*. Aunque las propiedades morfológicas y quimiotaxonómicas son parecidas a las del género *Gordonia*, pueden ser diferenciadas por la secuencia del 16S rDNA y la longitud de las cadenas de ácidos micólicos. Este taxón fue reconocido como familia en la edición del Bergey's Taxonomic Outline (Garrity *et al.*, 2002), sin embargo, actualmente, está incluido en la familia *Nocardiaceae* (Zhi *et al.*, 2009).

2.1.1.5.- Familia *Segniliparaceae*

Esta familia está integrada por un único género, *Segniliparus* (Butler *et al.*, 2005).

2.1.1.5.1.- Género *Segniliparus*

Actualmente contiene únicamente 2 especies validadas, *Segniliparus rotundus* y *Segniliparus rugosus*, siendo *Segniliparus rotundus* la especie tipo del género. Estas bacterias están caracterizadas por tener forma bacilar. Producen colonias no pigmentadas (de blancas a beige), lisas o arrugadas. Su contenido en G+C se encuentra comprendido entre un 68 y un 72 mol%. La pared celular contiene ácido *meso*-DAP y ácidos micólicos (Butler *et al.*, 2005).

Introducción

2.1.1.6.- Familia *Tsukamurellaceae*

Aparece en el Grupo 22 correspondiente a los actinomicetos nocardioformes del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Está integrada por un único género, *Tsukamurella*, el cuál fue introducido en 1988 por Collins *et al.*, para acomodar dos organismos previamente clasificados como *Corynebacterium paurometabolum* y *Rhodococcus auranticus* y reducirlos a una sola especie, *T. paurometabola*, mediante el análisis de la secuencia del 16S rDNA (Collins *et al.*, 1988).

2.1.1.6.1.- Género *Tsukamurella*

El género incluye actinomicetos aerobios, Gram-positivos, catalasa positivos, débilmente ácido-alcohol resistentes y de forma bacilar, que pueden observarse solos, en parejas o en masa. También pueden aparecer elementos cocobacilares. Forman colonias convexas que son secas pero ligeramente emulsificables y cuyos colores van desde el blanco o crema hasta el naranja. El componente mayoritario del peptidoglicano es el ácido *meso*-DAP, y la galactosa y arabinosa como azúcares predominantes. La envoltura celular posee ácidos micólicos de 62-78 átomos de carbono y su contenido en G+C, expresado en mol%, es del 68%.

Han sido aisladas mayoritariamente del suelo y de esputos humanos. La especie *T. spumae* ha sido aislada en espumas de fangos activos (Nam *et al.*, 2003), al igual que la especie *T. pseudospumae* (Nam *et al.*, 2004). Actualmente, el género contiene 11 especies válidamente descritas, siendo *Tsukamurella paurometabola* la especie tipo del género (Euzéby, 2011).

2.1.2.- Suborden *Pseudonocardineae*

Este suborden se compone de 2 familias: *Actinasynnemaceae* y *Pseudonocardiaceae*. (Euzéby, 2011).

2.1.2.1.- Familia *Pseudonocardiaceae*

Es la familia tipo del suborden *Pseudonocardineae*. Dentro de esta familia encontramos un total de 21 géneros, siendo el género *Pseudonocardia* el género tipo de la familia (Euzéby, 2011).

2.1.2.1.1.- Género *Pseudonocardia*

Actualmente el género contiene 38 especies válidamente descritas, siendo *Pseudonocardia thermophila* la especie tipo del género (Euzéby, 2011). Son bacterias aerobias y Gram-positivas. El género se caracteriza por no poseer ácidos micólicos y una pared celular tipo IV (ácido meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa) (Huang *et al.*, 2002). El contenido en G+C del DNA, expresado en mol%, se encuentra comprendido entre el 68% y el 79 % (Dworkin *et al.*, 2006).

2.1.3.- Suborden *Micrococcineae*

Este suborden se compone de 16 familias: *Beutenbergiaceae*, *Bogoriellaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Cellulamonadaceae*, *Dermabacteraceae*, *Dermacoccaceae*, *Dermatophilaceae*, *Intrasporagiaceae*, *Jonesiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Rarobacteraceae*, *Ruaniaceae*, *Sanguibacteraceae* y *Yaniaceae* (Euzéby, 2011).

2.1.3.1.- Familia *Microbacteriaceae*

Dentro de esta familia encontramos un total de 34 géneros, siendo el género *Microbacterium* el género tipo de la familia (Euzéby, 2011).

2.1.3.1.1.- Género *Microbacterium*

Actualmente el género contiene 72 especies válidamente descritas, siendo la especie tipo del género *Microbacterium lacticum* (Euzéby, 2011). Las especies de este género son aerobias, Gram-positivas y catalasa positivas y se caracterizan por poseer generalmente formas bacilares. El género no posee ácidos micólicos. El contenido en G+C del DNA, expresado en mol%, se encuentra comprendido entre el 66% y el 72 % (Dworkin *et al.*, 2006).

3.- Detección e identificación de actinomicetos nocardioformes en fangos activos

3.1.- Aislamiento y recuento

Para aislar nocardioformes se utiliza la técnica de dilución y siembra en medios selectivos suplementados con antibióticos, como el ácido nalidíxico que inhibe la flora acompañante Gram-negativa (Goodfellow *et al.*, 1996). Además, es necesario resaltar que la morfología de algunos organismos formadores de espumas puede variar en cultivo puro debido a las influencias en su ritmo de crecimiento y estado fisiológico y hay que tener en cuenta también que los nocardioformes no suelen crecer a temperaturas superiores a los 30° C. Sin embargo, recientes avances en biología molecular están permitiendo el desarrollo de pruebas más rápidas y exactas en la identificación *in situ*, aunque el aislamiento por métodos clásicos es necesario como primer peldaño en este tipo de investigaciones (Amann *et al.*, 1995).

Uno de los inconvenientes de esta técnica es la gran cantidad de microbiota acompañante que enmascara el crecimiento de los nocardioformes más lentos como *Skermania piniformis*. Debido a esta limitación con este método, sólo pueden ser aislados los nocardioformes más abundantes y de crecimiento más rápido, siendo inadecuado este método para nocardioformes de crecimiento lento.

La siembra se realiza en superficie para así obtener colonias aisladas. Con este método las cantidades relativas de microorganismos de la muestra original pueden estimarse sobre la base de crecimiento de las colonias más allá del área original sembrada (Bailey y Scott, 2007).

El aislamiento de las colonias individuales durante los cultivos no sólo es importante para examinar posteriormente la morfología y las características sino también para la realización de tinciones Gram y los posteriores subcultivos pertinentes (Bailey y Scott, 2007).

3.2.- Identificación y caracterización

3.2.1.- Métodos clásicos

Para identificar los diversos grupos de actinomicetos se utilizan tradicionalmente criterios fisiológicos, morfológicos y quimiotaxonómicos. Los criterios fisiológicos se limitan al tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo. Los caracteres morfológicos y quimiotaxonómicos son los más importantes. Estos últimos se han utilizado tanto para distinguir grupos supragenéricos como para distinguir especies (Williams *et al.*, 1989).

3.2.1.1.- Caracteres morfológicos

Los caracteres morfológicos son todavía muy utilizados para caracterizar a nivel de género. Los principales tratan sobre el modo de septación de las hifas, la estabilidad o fugacidad, importancia y disposición de las hifas del micelio del sustrato o del micelio aéreo, la presencia de esporangios o de las diversas formas de los conidios, la presencia de esporas, su número, su movilidad, su disposición en las hifas y su forma. La observación microscópica de estos caracteres debe realizarse alterando lo menos posible las estructuras morfológicas de las cepas examinadas. Esto es posible empleando objetivos a gran distancia focal que permiten el estudio de las colonias desarrolladas sobre medios sólidos translúcidos.

La evaluación inicial de la morfología en las placas de cultivo primario tiene extrema importancia. Las características clave de una colonia incluyen su tamaño, pigmentación, forma, aspecto de la superficie de la colonia, cambios en los medios de agar como resultado del crecimiento, así como el olor característico puede ayudar a la identificación preliminar (Bailey y Scott, 2007).

Pero, aunque a veces sea posible clasificar una cepa en base a criterios morfológicos completamente evidentes, estos no son suficientes para establecer una determinación correcta y es indispensable considerar otros caracteres (Lechevalier *et al.*, 1980).

Muchos de estos criterios son algo subjetivos y los términos calificativos y descriptivos utilizados pueden variar. Aunque es importante la determinación cuidadosa del aspecto de la colonia, es imprudente confiar totalmente en la morfología de la colonia para su primera

Introducción

identificación. Las colonias de una especie bacteriana, a menudo, presentan características casi indistinguibles de las de muchas otras especies. Además, bacterias de una misma especie pueden presentar diferente morfología.

Después de la descripción de las características de crecimiento en los medios en placa primarios todos los procedimientos posteriores para la identificación definitiva requieren el uso de cultivos puros.

Si se puede obtener un inóculo suficiente a partir de los medios primarios no es necesario realizar subcultivos, excepto como precaución para obtener mayor cantidad del microorganismo. Sin embargo, los medios primarios con frecuencia no proporcionan cantidades suficientes de bacterias en cultivos puros y se requiere un subcultivo. Una vez que se dispone de cultivos puros en cantidad suficiente puede prepararse un inóculo para los procedimientos de identificación posteriores.

3.2.1.2.- Quimiotaxonomía

El estudio de los constituyentes mayoritarios de la pared celular de los actinomicetos tiene una importancia taxonómica considerable. De esta forma se muestra que estos microorganismos se pueden dividir en ocho tipos, de los cuales los más frecuentes son los cuatro primeros (Tabla 3).

Tabla 3: Tipos de pared celular según sus constituyentes mayoritarios (Lechevalier y Lechevalier, 1980)

Tipo Pared	Constituyentes mayoritarios	Ejemplo de géneros
I	L-DAP, glicina	<i>Streptomyces</i>
II	Meso-DAP, glicina	<i>Micromonospora</i>
III	Meso-DAP	<i>Actinomadura</i>
IV	Meso-DAP, arabinosa, galactosa	<i>Nocardia, Saccharopolyspora</i>
V	Lisina, ornitina	<i>Actinomyces</i>
VI	Acido aspártico y galactosa	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, glicina	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornitina	<i>Cellulomonas</i>

Los actinomicetos con paredes celulares del tipo I poseen principalmente ácido diaminopimélico de la forma L, mientras que la forma *meso* de este mismo ácido es

característica de los tipos II, III y IV. Por otra parte, la presencia o ausencia de cuatro azúcares, arabinosa, galactosa, xilosa y madurosa, en los hidrolizados ácidos de células enteras permite clasificar los actinomicetos de los tipos II, III y IV que contienen ácido *meso*-diaminopimélico (Tabla 4). Sobre esta misma base, es posible repartir en dos grupos los actinomicetos con pared celular tipo III según la presencia o ausencia de madurosa.

Tabla 4: Tipos de pared celular y tipos glucídicos de los actinomicetos aerobios con *meso*-DAP (Lechevalier y Lechevalier, 1980)

Tipo pared	Constituyentes mayoritarios	Tipo glucídico	Constituyentes glucídicos
II	Glicina	D	Xilosa, arabinosa
III	Ninguno	B	Madurosa
		C	Ninguno o ramnosa
IV	Arabinosa, galactosa	A	Arabinosa, galactosa

Para completar los caracteres citados se utilizan otros caracteres quimiotaxonómicos. Es el caso de los fosfolípidos de la membrana, de los ácidos micólicos y de las menaquinonas. Se han definido de este modo cinco perfiles fosfolipídicos característicos de los actinomicetos (Lechevalier *et al.*, 1980), así como cuatro perfiles basados en los tipos de ácidos grasos presentes en estos fosfolípidos.

Los ácidos micólicos (3-hidroxi-ácidos grasos con un sustituyente alifático de cadena moderadamente larga en la posición 2) son constituyentes únicos y característicos de la pared celular de los géneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Segniliparus*, *Skermania*, *Tsukamurella* y *Williamsia*, también conocidos como mycolata. Los únicos actinomicetos que contienen ácidos micólicos pertenecen al suborden *Corynebacterineae* al que pertenecen la mayoría de los microorganismos estudiados en el presente trabajo.

Los ácidos micólicos tienen un amplio rango de longitudes, un número variable de dobles enlaces y grupos funcionales, dependiendo de las especies o del género (Baba *et al.*, 1997, Nishiuchi *et al.*, 1999). Están unidos covalentemente a una molécula de arabinosa del arabinogalactano. Este polímero está unido, a su vez, a una molécula de ácido N-glucolilmurámico. El modelo propuesto por Minnikin para la estructura de la cubierta celular de

Introducción

los mycolata está descrito en el trabajo de Sutcliffe (1998). En este modelo, los ácidos micólicos pueden llegar al 30% del peso de la pared celular (Figura 2).

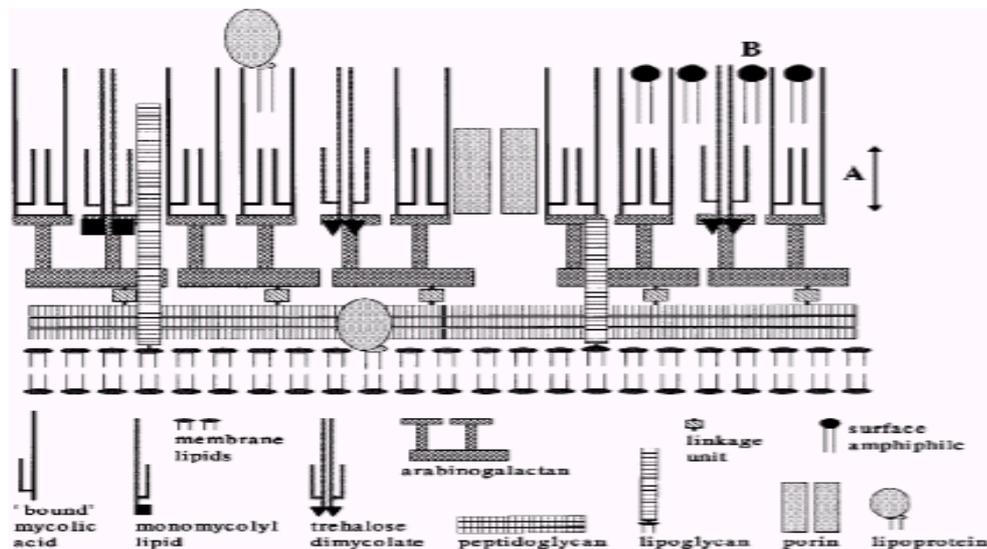


Figura 2: Modelo propuesto por Minnikin para la cubierta de los mycolata (Sutcliffe,1998)

La detección de ácidos micólicos se realiza por cromatografía en capa fina (Hecht *et al.*, 1976; Minnikin *et al.*, 1980; Cardinali *et al.*, 1995) y por HPLC y cromatografía de gases (Baba *et al.*, 1997; Chou *et al.* 1998). Recientes estudios han demostrado que el medio de cultivo puede influir en el perfil de ácidos micólicos en micobacterias (Wick *et al.*, 2002) y en nocardioformes (Stratton *et al.*, 1993; Stratton *et al.*, 1997; Sokolovská *et al.*, 2003).

3.2.2.- Métodos genotípicos

Actualmente, para clasificar correctamente un microorganismo se utiliza la taxonomía polifásica, es decir, utilizar gran cantidad de información. Esta información se divide en información genotípica e información fenotípica. Este tipo de taxonomía intenta asimilar muchos niveles de información, desde moleculares a ecológicos, para así poder clasificar e identificar de una manera más correcta a los microorganismos (Figura 3).

De los métodos moleculares disponibles (Figura 4), los mejores son aquellos que no dependen de cultivo. Entre estos se puede destacar la técnica de la PCR, que se puede realizar directamente de la muestra si los cebadores diseñados son suficientemente específicos, y la secuenciación de DNA. De los métodos moleculares no dependientes de cultivo el que más

información aporta es, sin lugar a dudas, el FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization), ya que combina técnicas morfológicas con la especificidad de las técnicas moleculares (Amann *et al.*, 1995).

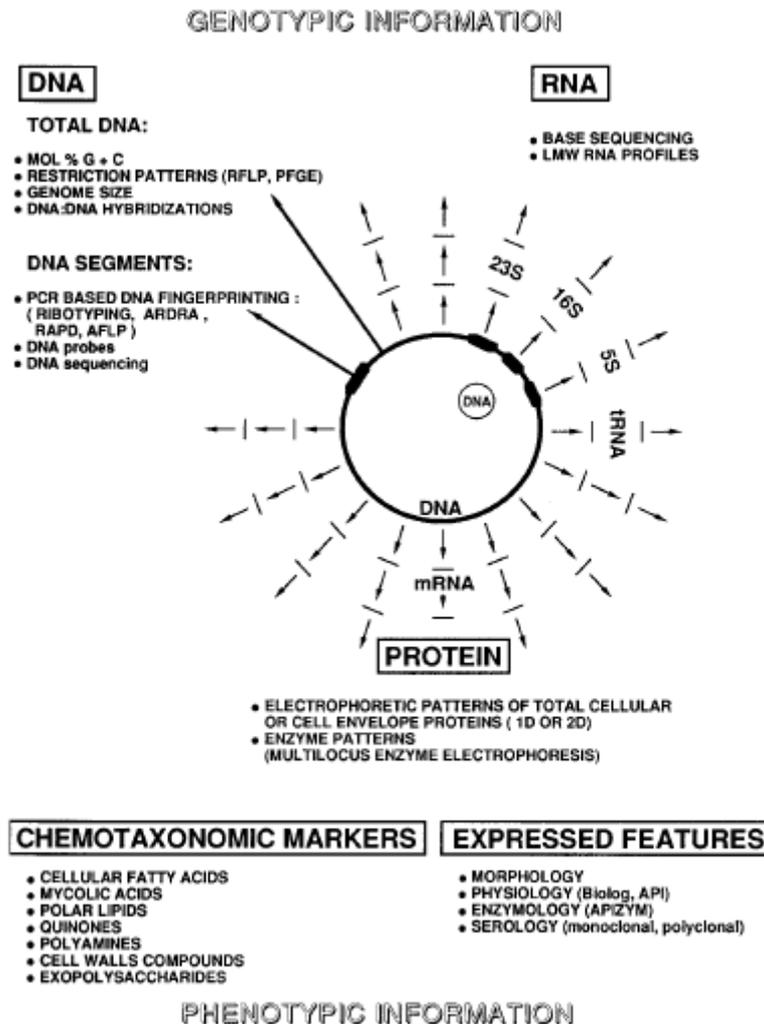


Figura 3: Vista esquemática de los componentes celulares y técnicas usadas (Vandamme *et al.*, 1996)

3.2.2.1.- Análisis de las secuencias del 16S rDNA

En la actualidad está demostrado que ciertas macromoléculas se pueden utilizar como cronómetros evolutivos, es decir, medidas del cambio evolutivo. Así pues, la distancia evolutiva entre dos organismos puede determinarse por las diferencias en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de macromoléculas homólogas aisladas de cada uno de ellos.

Introducción

Para determinar las verdaderas relaciones evolutivas entre organismos es esencial elegir las moléculas adecuadas para los estudios de secuenciación. Esto es importante por varios motivos. Primero, la molécula debe estar universalmente distribuida en el grupo elegido para ser estudiada. Segundo, deben ser funcionalmente homólogas en cada organismo; las comparaciones filogenéticas deben realizarse con moléculas de idéntica función. Tercero, resulta crucial poder alinear apropiadamente las dos moléculas a fin de identificar regiones tanto con homología como con variación de secuencia. Finalmente, la secuencia de la molécula elegida debería cambiar con una velocidad proporcional a la distancia filogenética que se va a determinar y, de hecho, cuanto mayor sea la distancia filogenética a determinar, menor será la velocidad de cambio de la molécula; demasiado cambio tiende a enturbiar el registro evolutivo.

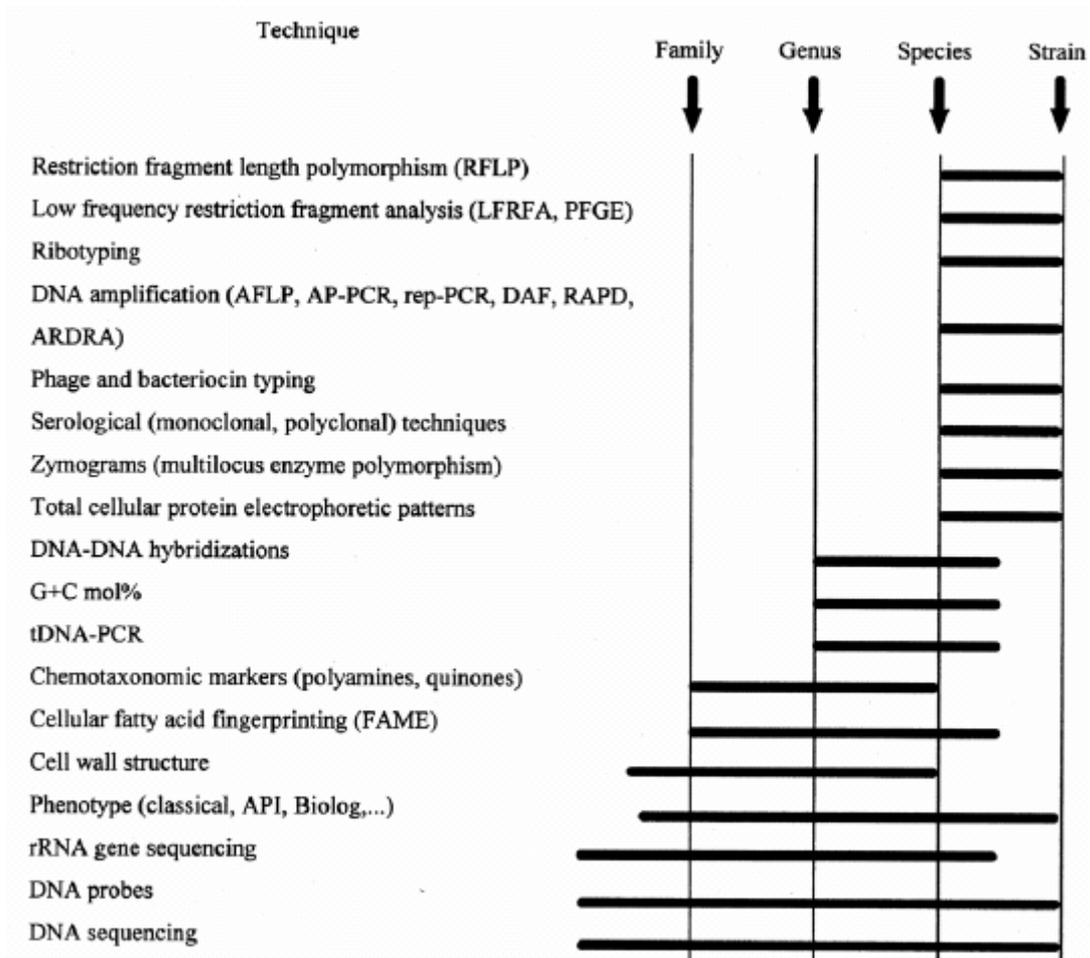


Figura 4: Resolución taxonómica de las técnicas utilizadas (Vandamme *et al.*, 1996)

Se han evaluado muchas moléculas como cronómetros evolutivos, y entre ellas, los genes que codifican los RNAs ribosómicos, componentes clave del sistema de traducción, son

los que han proporcionado la información más significativa sobre los microorganismos para poder establecer relaciones filogenéticas.

La mayor parte de la atención se ha centrado en las secuencias del rDNA 5S y 16S, aislados respectivamente de las subunidades 50S y 30S de los ribosomas procariotas. Los rDNA son prácticamente ideales para los estudios de evolución y parentesco microbianos, puesto que son imprescindibles para un orgánulo esencial que se encuentra en todos los microorganismos. Su papel funcional es el mismo en todos los ribosomas. Además, su secuencia se modifica muy lentamente en el tiempo, debido probablemente a la función esencial y constante que desempeñan.

Debido a que el rDNA contiene secuencias variables y estables, es posible comparar tanto microorganismos estrechamente relacionados como de parentesco muy lejano. Esto constituye una importante ventaja ya que los microorganismos de parentesco lejano sólo pueden estudiarse utilizando secuencias que sufren pocas modificaciones con el tiempo. (Madigan *et al.*, 2009).

3.2.2.2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las bases para el método de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos fueron descritas por Kleppe *et al.* (1971), quienes describieron una síntesis extensiva de DNA catalizada por DNA polimerasas en la reparación de la replicación. Pero fue K. Mullis, científico de la compañía Cetus, quien en 1983 desarrolló un proceso de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos, apoyándose en la teoría de la síntesis automatizada de oligonucleótidos, patentándose la técnica en 1987. En 1991, la empresa Hoffmann La Roche adquirió la patente, así como los derechos de la PCR y en 1993, Mullis, autor inicial de la idea, recibió el Premio Nobel de Química.

La PCR es un proceso de amplificación enzimática *in vitro* del DNA o RNA, iniciada por unos fragmentos cortos de DNA llamados iniciadores o cebadores (primers). Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. Cada ciclo está dividido temporalmente en tres fases térmicas: desnaturalización de la doble cadena de DNA, acoplamiento o unión de los iniciadores y polimerización mediante la adición de dNTPs por la enzima *Taq* polimerasa. Los productos de la PCR, llamados amplicones, se detectan normalmente por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan bajo luz ultravioleta.

Introducción

Debido a su sencillez, sensibilidad y rapidez, su uso en laboratorios microbiológicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección de microorganismos. Muchos problemas derivados de la detección mediante las técnicas tradicionales pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa muy eficaz en microbiología. Además, la versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación a otros campos de interés económico, como la identificación genética, la medicina forense o el control de calidad en las industrias.

Recientemente el proceso de PCR se ha automatizado, permitiendo además la cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real. Esta nueva técnica conocida como "Real-Time PCR" no requiere el análisis posterior de la muestra, evitando contaminaciones y minimizando el tiempo de análisis de las muestras. Esta técnica se ha usado para cuantificar poblaciones microbianas en fangos activos (Hall *et al.*, 2002, Dionisi *et al.*, 2003).

En algunos casos para la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra basta con el tratamiento por ebullición para conseguir la lisis celular. En general, la mayoría de protocolos para la extracción de ácidos nucleicos en bacterias Gram-positivas utilizan la lisozima seguida de la proteinasa K y la purificación con fenol-cloroformo. Los sistemas comerciales para la extracción y purificación del DNA incorporan, además de los reactivos ya preparados, unas columnas con filtros de polipropileno que facilitan la labor.

Para poder diseñar los iniciadores es necesario conocer la secuencia del fragmento o gen de DNA o RNA que se va amplificar. En muchos casos conocer la secuencia completa del organismo que nos interesa es un proceso caro y difícil, por lo que se recurre a información generada por otros investigadores y almacenada en los numerosos bancos de datos para esta finalidad (NCBI, Ribosomal Database Project). La información generada por los genetistas, al secuenciar y analizar las secuencias de DNA para determinar las relaciones entre los diferentes grupos bacterianos, basándose en las diferencias en sus secuencias, se utiliza para identificar organismos a nivel de especie. De los tres genes que forman el rDNA, son el 16S y el 23S los que se estudian para establecer diferencias entre microorganismos. El 5S es demasiado corto (150-200 pb) para ser relevante como portador de variaciones genéticas entre bacterias. La recopilación de varias secuencias del 16S y del 23S en los bancos de datos es una excelente ayuda a los investigadores en el desarrollo de iniciadores para la detección mediante PCR.

La PCR ha sido aplicada con éxito para caracterizar actinomicetos nocardioformes principalmente en muestras clínicas. En el caso del género *Nocardia* se disponen de iniciadores específicos de género (Laurent *et al.*, 2000) que son de gran utilidad para el diagnóstico de casos de nocardiosis.

El análisis de enzimas de restricción (REA) de la porción de 65-kDa de la proteína de stress térmico (HSP) se ha utilizado con éxito para diferenciar especies de *Nocardia* incluso dentro del complejo *N. asteroides* (Steingrube *et al.*, 1995; Cuesta, 2004).

A la rapidez de la técnica se puede añadir, además, la posibilidad de detectar varias especies o varios genes de una misma especie a la vez en una misma muestra, lo que se conoce como PCR múltiple, utilizando varios pares de iniciadores en una misma reacción de amplificación (Cormican *et al.*, 1995, Cheng *et al.*, 2004).

Otra modificación de la PCR es la “nested PCR” o PCR anidada, que consiste en una doble amplificación con dos parejas de iniciadores, en donde la segunda pareja reconoce y amplifica una región interna del primer producto amplificado, siendo así de mayor sensibilidad y especificidad, especialmente útil en el caso de muestras ambientales. Esta técnica se ha utilizado para identificar *N. restricta* en monumentos de piedra biodegradados (Palla *et al.*, 2002) y para amplificar un elemento extragenómico repetitivo para detectar *N. asteroides* en diferentes ambientes (Yamamura *et al.*, 2004).

3.2.3.- Métodos fenotípicos

El estudio del 16S rDNA solamente abarca una pequeña porción del genoma de la bacteria, con lo que estaríamos despreciando un alto contenido de información. Como datos de apoyo se utilizan los marcadores quimiotaxonómicos y las pruebas fenotípicas que nos dan una visión más global de la expresión del genoma (Garrity *et al.*, 2001).

Las pruebas fenotípicas convencionales que se suelen utilizar se basan en la observación de las características morfológicas macroscópicas de las colonias en los diferentes medios de cultivo, observación de morfología microscópica con las tinciones de Gram y la descomposición de algunos sustratos específicos, tales como adenina, xantina, caseína, hipoxantina, testosterona, tirosina y urea entre otros (Biehle *et al.*, 1996).

Introducción

Hay que destacar que el crecimiento relativamente lento de las especies del género *Nocardia* y la gran similitud morfológica y fisiológica que pueden presentar algunas de las especies de este género dificulta aún más la identificación (Wauters *et al.*, 2005).

4.- Aguas residuales

La organización mundial de la salud (OMS) ha establecido como uno de los derechos fundamentales de todo ser humano “el disfrute del grado máximo de salud posible”. Considera la salud como un “estado completo de bienestar físico, mental y social”, y fija el nivel de salud por el grado de armonía, que exista entre el hombre y el medio que sirve de escenario a su vida (citado por Hernández, *et al.*, 1996).

La contaminación, a efectos del Real Decreto RD 1/2001, es la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica. La contaminación de las aguas es uno de los factores importantes que rompe la armonía entre el hombre y su medio tanto a corto, como a medio y largo plazo; por lo que la prevención y lucha contra ella constituye, en la actualidad, una necesidad de importancia prioritaria (Hernández, *et al.*, 1996).

Los humanos han utilizado las aguas no sólo para su consumo, sino, con el paso del tiempo, para su actividad y para su confort, convirtiendo las aguas usadas en vehículo de desechos. De aquí surge la denominación de aguas residuales. La mayoría de los vertidos de aguas residuales que se hacen en el mundo no son tratados. Simplemente se descargan en el río, mar o lago más cercano y se deja que los sistemas naturales, con mayor o menor eficacia y riesgo, degraden los desechos de forma natural. En los países desarrollados, una proporción cada vez mayor de los vertidos es tratada, antes de que lleguen a los ríos o mares, en estaciones depuradoras de aguas residuales. El objetivo de estos tratamientos es, en general, reducir la carga de contaminantes del vertido y convertirlo en inocuo para el medio ambiente. Para cumplir estos fines se usan distintos tipos de tratamiento dependiendo de los contaminantes que arrastre el agua y de otros factores más generales, como localización de la planta depuradora, clima, ecosistemas afectados, etc.

“Las aguas residuales pueden definirse como las aguas que provienen del sistema de abastecimiento de agua de una población, después de haber sido modificadas por diversos usos en actividades domésticas, industriales y comunitarias” (Mara, 1976).

Según su origen, las aguas residuales resultan de la combinación de líquidos y residuos sólidos transportados por el agua que proviene de residencias, oficinas, edificios comerciales e instituciones, junto con los residuos de las industrias y de actividades agrícolas, así como de las aguas subterráneas, superficiales o de precipitación que también pueden agregarse eventualmente al agua residual (Mendonça, 1987).

Así, de acuerdo con su origen, las aguas residuales pueden ser clasificadas como:

- **Domésticas:** son aquellas utilizadas con fines higiénicos (baños, cocinas, lavanderías, etc.). Consisten básicamente en residuos humanos que llegan a las redes de alcantarillado por medio de descargas de instalaciones hidráulicas de la edificación y también en residuos originados en establecimientos comerciales, públicos y similares.
- **Industriales:** son líquidos generados en los procesos industriales. Poseen características específicas, dependiendo del tipo de industria.
- **Infiltración y caudal adicionales:** las aguas de infiltración penetran en el sistema de alcantarillado a través de los empalmes de las tuberías, paredes de las tuberías defectuosas, tuberías de inspección y limpieza, etc. Hay también aguas pluviales, que son descargadas por medio de varias fuentes, como canales, drenajes y colectores de aguas de lluvias.
- **Pluviales:** son agua de lluvia, que descargan grandes cantidades de agua sobre el suelo. Parte de esta agua es drenada y otra escurre por la superficie, arrastrando arena, tierra, hojas y otros residuos que pueden estar sobre el suelo.

Los múltiples usos a que se destina el agua y la creciente demanda la han convertido en un recurso limitado, cuando no escaso. Por otra parte, las aguas residuales pueden ser la causa de un impacto ambiental cuyo control forma parte de los programas de bienestar social de cualquier gobierno.

Introducción

4.1.- Depuración de aguas residuales

4.1.1.- Antecedentes

Aunque la captación y el drenaje de las aguas residuales pluviales datan de tiempos antiguos, la recogida de aguas residuales no aparece hasta principios del siglo XIX, mientras que el tratamiento sistemático de las aguas residuales data de finales del siglo pasado y principios del presente. El desarrollo de la teoría de los gérmenes productores de enfermedades a cargo de Koch y Pasteur en la segunda mitad del siglo XIX marcó el inicio de una nueva era en el campo del saneamiento.

Hasta ese momento se había profundizado poco en la relación entre contaminación y enfermedades, y no se había aplicado al tratamiento de aguas residuales la microbiología, disciplina entonces en sus inicios. En Estados Unidos, el tratamiento y eliminación de las aguas residuales no recibió demasiada atención hasta finales del siglo XIX porque los daños causados por el vertido de aguas no tratadas en las relativamente grandes masas de agua receptoras (comparadas con las europeas) no eran graves, y porque se disponía de grandes extensiones de terreno para su evacuación. Sin embargo, a principios del siglo XX, los daños causados y las condiciones sanitarias impulsaron una creciente demanda de mayor eficiencia en el tratamiento y gestión de las aguas residuales (Metcalf y Eddy, 1995).

4.1.2.- Clasificación de los métodos de tratamiento de aguas residuales

La depuración consiste en la eliminación de la contaminación e impurezas incorporadas en el agua a tratar. Sus objetivos consisten en prevenir y reducir la contaminación y sus molestias, mantener un balance ecológico y asegurar la protección de la biosfera, prever el desarrollo urbano y asegurar una atención especial a los aspectos ambientales en la planificación del suelo y de las ciudades.

Podemos clasificar los métodos de tratamiento de aguas residuales:

- Según **mecanismos de la operación**: se conoce como operaciones físicas unitarias aquellos métodos de tratamiento en los que predominan fenómenos físicos, mientras que aquellos métodos en los que la eliminación de contaminantes se realiza basándose en procesos

químicos o biológicos se conocen como procesos químicos y biológicos unitarios. Las *operaciones físicas unitarias* utilizan fuerzas físicas mediante el desbaste, mezclado, floculación, sedimentación, flotación, transferencia de gases y filtración, para la eliminación de sólidos sedimentables y flotantes presentes en el agua residual. En los *procesos químicos unitarios* la transformación de la materia se produce mediante reacciones químicas. En este caso la eliminación de los contaminantes se consigue por medio de la adición de productos químicos (Metcalf y Eddy, 1995). El objetivo de los *procesos biológicos unitarios* es la eliminación, estabilización o transformación de la materia orgánica, presente en las aguas como sólidos coloidales no sedimentables. Esta acción se logra por la acción de los microorganismos mediante dos acciones complementarias: acción metabólica, la cual transforma los glúcidos, lípidos, ésteres, hidratos de carbono y proteínas en materia viva; y la acción físico-química, en la cual se emplea: coagulación, oxidación de la materia carbonosa, decantación y arrastre de bacterias (Hernández, *et al.*, 1996).

En la actualidad, las operaciones y procesos unitarios se agrupan entre sí para constituir los así llamados tratamiento primario, secundario y terciario (o tratamiento avanzado) (Metcalf y Eddy, 1995).

- Según la **posición dentro del esquema de depuración y el uso que se les da a las diferentes operaciones:**

- **Pretratamiento de las aguas residuales:** el primer paso en la depuración de aguas residuales ha de consistir en una eliminación de materias gruesas, cuerpos gruesos y arenosos, cuya presencia en el efluente perturbaría el tratamiento total y el eficiente funcionamiento de las máquinas, equipos e instalaciones de la estación depuradora (Hernández, *et al.*, 1996). En este proceso se emplean cribas, rejas gruesas, rejas finas y tamices que separan los restos voluminosos.

- **Tratamiento primario:** reducción de la materia suspendida por medio de la precipitación o sedimentación, con o sin reactivos, o por medio de diversos tipos de oxidación química, poco utilizada en la práctica, salvo aplicaciones especiales, por su alto coste.

- **Tratamiento secundario:** se emplea para eliminar la contaminación orgánica disuelta, que no se puede eliminar por tratamientos físico-químicos. Suele aplicarse tras los anteriores.

Introducción

Consisten en la oxidación aerobia de la materia orgánica (en sus diversas variantes de fangos activados, lechos de partículas, lagunas de oxidación y otros sistemas) o su eliminación anaerobia en digestores cerrados. Ambos sistemas producen fangos en mayor o menor medida que, a su vez, deben ser tratados para su reducción, acondicionamiento y destino final.

- **Tratamientos terciarios:** utiliza técnicas de los tratamientos primarios y secundarios destinadas a mejorar el vertido final, mejorando alguna de sus características. Con este tratamiento se consigue eliminar: nutrientes, compuestos tóxicos, excesos de materia orgánica y sólidos en suspensión. Si se emplea intensivamente puede lograr hacer el agua de nuevo apta para el abastecimiento de necesidades agrícolas, industriales e incluso para potabilización.

- **Tratamiento de fangos:** la evacuación final de los residuos sólidos, semisólidos (fangos) y contaminantes concentrados separados del agua residual mediante los diversos procesos de tratamiento, ha sido y continúa siendo uno de los problemas más complejos y costosos en el ámbito de la ingeniería de las aguas residuales (Metcalf y Eddy, 1995). En este proceso se tratan los fangos extraídos de las diferentes operaciones de tratamiento, para su posterior aprovechamiento o eliminación.

El tratamiento de aguas residuales empieza por la separación física inicial de sólidos de la corriente de aguas domésticas o industriales, seguido por la conversión progresiva de materia biológica disuelta en una masa biológica sólida usando bacterias adecuadas, generalmente presentes en estas aguas. Una vez que la masa biológica es separada, el agua tratada puede experimentar una desinfección adicional mediante procesos físicos o químicos. Este efluente final puede ser descargado o reintroducido en un medio natural u otro ambiente. Los sólidos biológicos segregados experimentan un tratamiento y neutralización adicional antes de la descarga o reutilización apropiada.

Las operaciones unitarias empleadas en el tratamiento de aguas residuales promueven el desarrollo de la población bacteriana y, como consecuencia, la aceleración de los procesos de degradación natural, dentro de recintos controlados, de modo que la carga contaminante se reduzca hasta concentraciones que no causen efectos en el medio receptor (Metcalf y Eddy, 1995).

El nombre de tratamientos secundarios abarca todos los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales, tanto aerobios como anaerobios. Constituye una de las etapas fundamentales, en la que la mayor parte de la carga orgánica es eliminada por el efecto de una biomasa activa presente.

Los tratamientos biológicos se pueden clasificar según dos criterios:

- En función de los **requerimientos de oxígeno** por parte de los microorganismos:
 - **Procesos aerobios:** se dan en presencia de oxígeno molecular. Incluye el proceso de fangos activados.
 - **Procesos anaerobios:** se dan en ausencia de oxígeno molecular.
 - **Procesos facultativos:** los organismos responsables pueden funcionar en presencia o ausencia de oxígeno molecular.
- En función del **estado físico del medio donde se desarrollan los microorganismos:**
 - **Procesos de cultivo en medio líquido o en suspensión:** los organismos responsables de la degradación de la carga contaminante se encuentran en suspensión dentro de la masa líquida.
 - **Procesos de cultivo fijo o de soporte sólido:** los organismos responsables de la degradación de la carga contaminante están fijados a un medio inerte como son las piedras, escorias, materiales cerámicos y plásticos especialmente diseñados para esta función.
 - **Procesos biológicos**, donde se pueden distinguir cuatro grupos:
 - **Fangos activos**
 - **Lagunas aireadas**

Introducción

- **Lagunaje**
- **Tratamiento de fangos**

El proceso de fangos activos es estrictamente aerobio en donde el aire es aportado por medio de difusores o aireación mecánica. Los fangos activos constituyen una mezcla de microorganismos vivos y muertos contenidos en el agua residual, que transforma la materia orgánica biodegradable hasta formas más simples y estables (H_2O , NH_3 y principalmente CO_2), y nueva biomasa celular, que se agrupa para formar el flóculo.

Una vez transformada la materia orgánica del agua residual, ésta pasa a un tanque de sedimentación donde los flóculos, por gravedad, se van depositando y agregando para formar el fango. De aquí se extrae el agua depurada y clarificada.

4.2.- Aguas residuales urbanas

Llamamos aguas residuales a los líquidos procedentes de la actividad humana, que llevan en su composición gran parte de agua y que generalmente son vertidos a cursos o a masas de agua continentales o marinas.

Su origen puede ser muy diverso y se agrupan, según Brebion (1973) en 5 categorías de origen:

- **Mecánico y físico**
- **Inorgánico y mineral**
- **Orgánico**
- **Urbano**
- **Colectivo**

Las aguas residuales urbanas se componen de (Brebion, 1973)

- **Excretas:** son las que contienen los residuos sólidos y líquidos que constituyen las heces humanas fundamentalmente.

- **Residuos domésticos:** son los que proceden de la evacuación de los residuos y manipulaciones de cocinas (desperdicios, arenas de lavado, residuos animales y vegetales, detergentes y partículas), de los lavados domésticos (jabones, detergentes sintéticos con espumantes MES, sales, etc.), y de la actividad general de las viviendas (celulosa, almidón, glucógeno, insecticidas, partículas orgánicas, etc.).

- **Arrastres de lluvia:** al caer la lluvia sobre una ciudad, arrastrará las partículas y fluidos presentes en las superficies expuestas, es decir, hollín, polvo de ladrillo y cemento, esporas, polvo orgánico e inorgánico de los tejados, partículas sólidas polvo, hidrocarburos de las vías públicas, restos de vegetales y animales y partículas sólidas (tierras) de los parques y zonas verdes. Si la precipitación es suficiente, los arrastres se efectuarán hasta la red de evacuación y aparte de los componentes extraños, el volumen de agua es tal que produce diluciones a tener en cuenta en los procesos de depuración.

- **Infiltraciones:** a veces las zonas verdes urbanas, por la composición de su suelo, permiten el paso de las aguas de arrastre hacia los acuíferos, con el consiguiente peligro de contaminación.

- **Residuos industriales:** son los que proceden de la evacuación de los residuos y manipulaciones de las fábricas. Debe tenerse en cuenta que las características de los residuos estarán relacionadas con cada sector industrial.

4.3.- Aguas residuales en la industria petroquímica

Por regla general, las instalaciones de refino son grandes y están completamente integradas. Las refinerías son centros industriales que manipulan enormes cantidades de materias primas y productos y además tienen un consumo intensivo de energía y agua. En los procesos de almacenamiento y refino, las refinerías generan emisiones a la atmósfera, al agua y

Introducción

al suelo, hasta el punto de que la gestión ambiental se ha convertido en un factor importante de su actividad (Bref Document, 2003).

En una refinería se consumen grandes cantidades de agua, ya sea con fines de proceso o de refrigeración. Este agua se contamina con productos derivados del petróleo. Los principales contaminantes del agua son los hidrocarburos, sulfuros, amoníaco y algunos metales. Teniendo en cuenta la enorme cantidad de materia prima que procesan, las refinerías no generan cantidades significativas de residuos. En la actualidad, los residuos generados por las refinerías consisten principalmente en lodos, desechos no específicos, tales como basuras, y productos químicos agotados, como por ejemplo ácidos, aminos o catalizadores.

Las aguas residuales de las refinerías se recolectan separadas, de acuerdo con el punto de su generación y su concentración y se llevan a las plantas de tratamiento o purificación (Asociación Alemana de Saneamiento, 1986). Además, se debe diferenciar entre aguas libres de petróleo, aguas que pueden contener petróleo y aguas que han estado en contacto con el petróleo. Generalmente, estas aguas, proceden del vapor condensado, el agua de separación, la descarga procedente de la purga de torres de refrigeración y calderas, el agua de lavado, las aguas procedentes del proceso de desalación del crudo, el agua de neutralización de residuos ácidos y alcalinos otras aguas relacionadas con los procesos y las aguas sanitarias.

En cualquier caso, la cantidad y características de los contaminantes varían en función de los crudos que se procesan, de la complejidad y tipos de procesos de cada planta y de la integración y tipo de petroquímica derivada que incorpore las existencias de redes separativas o tratamiento específicos de corriente (Zornoza *et al.*, 2008).

Por lo general, en una refinería, se practican las siguientes etapas de tratamiento (Figura 5):

- **Tratamiento previo de las aguas de proceso:** los destiladores eliminan sustancias altamente volátiles, entre otras, por medio del vapor de agua.

- **Separación del petróleo:** en separadores. El que flota en la superficie se recupera para su posterior transformación.

- **Procedimientos químicos de tratamiento:** eliminan las partículas de petróleo que están finamente distribuidas u otras sustancias. Este proceso puede ser apoyado por una flotación.
- **Tratamiento biológico posterior:** las sustancias que aún quedan en el agua, después de estos pasos, se eliminan en buena medida en el tratamiento biológico posterior, en caso de que sean biodegradables o de que se puedan someter a una eliminación físico-química.

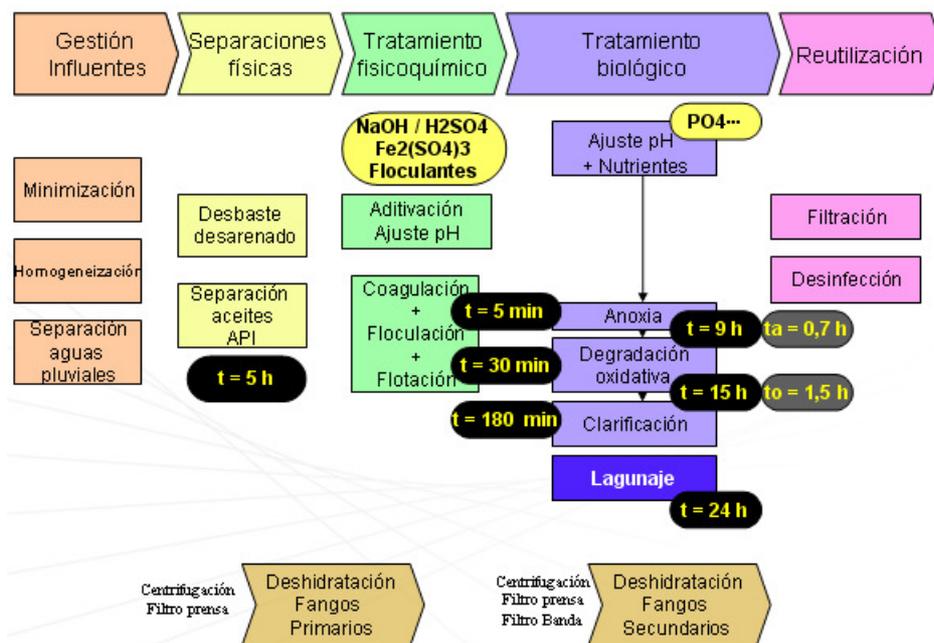


Figura 5: Esquema general del proceso (Zornoza *et al.*, 2008)

Si fuera necesario, como etapa biológica avanzada, se puede descargar posteriormente en una laguna secundaria o laguna aireada (Asociación Alemana de Saneamiento, 1986).

Las aguas residuales purificadas por esta vía se descargan en el cuerpo receptor. El lodo activado que se ha producido en la etapa biológica de tratamiento se separa en una sedimentación secundaria o por medio de instalaciones de tratamiento posteriores. Este lodo activado separado se elimina después junto con otros lodos que se generan en el tratamiento de aguas residuales.

4.4.- Sistema de fangos activos

El proceso de fangos activos es el sistema de tratamiento biológico más habitual en la depuración de las aguas residuales urbanas. Fue desarrollado en Inglaterra, en 1914, por Arden y Lockett, quienes realizaron experimentos con un cultivo biológico en suspensión en un tanque aireado e introdujeron la idea de recircular la biomasa suspendida formada durante la aireación. Esta suspensión fue llamada *fangos activos* y correspondía a la biomasa activa responsable del proceso de depuración. Inmediatamente después de la publicación de su primer trabajo, comenzaron a desarrollarse instalaciones a gran escala en Inglaterra y en Estados Unidos.

Este proceso surgió a partir de la observación de que cualquier agua residual, ya sea doméstica o industrial, aireada durante un cierto periodo de tiempo, reduce su contenido en materia orgánica, al mismo tiempo que se forma un fluido con flóculos de bacterias. Estos flóculos se encuentran formados por una población muy heterogénea de microorganismos. (Soddell y Seviour, 1990; Bitton, 1999).

Los fangos activos constituyen una mezcla de microorganismos, en su mayoría bacterias heterótrofas, que transforman la materia orgánica biodegradable hasta formas más simples y estables. Consiste en un tratamiento aeróbico que oxida la materia orgánica hasta CO_2 , NH_3 y H_2O y forma nueva biomasa celular. La biomasa celular obtenida forma flóculos que sedimentan en el tanque de clarificación o sedimentación. Este procedimiento se utiliza a escala mundial como tratamiento biológico secundario para el tratamiento de aguas residuales domésticas (Bitton, 1999). Parte de los fangos recogidos en el sedimentador secundario se recirculan al reactor y son los que contienen los microorganismos que llevan a cabo la depuración biológica. (Metcalf y Eddy, 2000).

4.4.1.- El flóculo

El flóculo está formado por la unión de microorganismos, partículas orgánicas e inorgánicas, teniendo un tamaño que oscila entre 1 y 1000 μm . Para que el proceso de depuración sea llevado a cabo con éxito es necesaria la formación de un flóculo adecuado de microorganismos en el tanque de aireación. Con ello se permite la separación de los sólidos en suspensión en el tanque de sedimentación produciéndose un sobrenadante fluido y claro. A su

vez, parte de estos sólidos que contienen los flóculos son recirculados al tanque de aireación para así aumentar el nivel de actividad microbiana (Soddell y Seviour, 1990).

Las bacterias filamentosas juegan un papel importante ya que, gracias a ellas, el flóculo adquiere consistencia con lo que se pueden formar flóculos de mayor tamaño y más compactos que resisten mucho mejor las turbulencias del sistema de agitación. También ayudan a capturar y mantener atrapadas pequeñas partículas durante la sedimentación (Kerley y Forster, 1995).

Si no existieran bacterias filamentosas o éstas estuvieran en una proporción muy baja se formarían flóculos llamados “flóculos en punta de alfiler”, los cuales son de pequeño tamaño y de consistencia muy débil con lo que el sistema de aireación los disgregaría, además la sedimentación no se produciría correctamente con lo que se originaría un sobrenadante turbio con muchos sólidos en suspensión. En cambio, si hubiera un crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos se produciría un aumento de volumen de los sólidos sedimentados por compactación defectuosa denominado “bulking” (Bitton, 1999). Si, por el contrario, se produce un crecimiento excesivo de actinomicetos nocardioformes que contienen ácidos micólicos (mycolata) se produce la formación de espumas biológicas, fenómeno conocido como “foaming” (Seviour y Blackall, 1998).

4.4.2.- Composición de la microbiota

El flóculo de los fangos activos contiene un amplio rango de procariotas y eucariotas, muchos de ellos pueden ser observados por las técnicas microscópicas habituales.

Dentro de las bacterias, las Gram-negativas son las más importantes en el flóculo. Son las responsables de la oxidación de la materia orgánica y de la transformación de nutrientes. Se cree que en el flóculo pueden existir cientos de especies bacterianas pero sólo una pequeña fracción puede ser detectada con métodos basados en técnicas de cultivo. Cuando se usan estos métodos se aíslan principalmente *Zooglea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Comamonas*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, así como bacterias filamentosas como *Sphaerotilus* y *Beggiatoa* entre otras, que son responsables del “bulking” (Bitton, 1999).

Introducción

4.4.3.- Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos

El sistema de fangos activos actúa básicamente como un cultivo continuo con una biomasa que recircula. En estos sistemas se produce una presión selectiva sobre los organismos de manera que aquellos que no sean capaces de prevalecer en esas condiciones serán eliminados en el efluente (Seviour y Blackall, 1998). Los factores que hacen que un organismo permanezca dentro de este sistema se discuten a continuación.

4.4.3.1.- Tasa de crecimiento

La tasa específica de crecimiento de un organismo determinará su capacidad para competir con otras poblaciones microbianas. Este parámetro está relacionado con el tiempo medio de residencia celular. La disponibilidad de sustratos necesarios para el crecimiento y otros factores pueden afectar a la tasa de crecimiento y, por lo tanto, al tiempo medio de residencia celular.

Los microorganismos del fango degradadores de materia orgánica requieren fuentes de nitrógeno, sulfuro e iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} para su crecimiento, algunos de los cuales pueden estar en concentraciones limitantes de crecimiento. La capacidad para obtener estos nutrientes afectará claramente a la tasa específica de crecimiento.

4.4.3.2.- Tolerancia a factores abióticos y toxinas

La capacidad de tolerar condiciones abióticas en el reactor como temperatura, pH y potencial redox también puede afectar a la tasa de crecimiento, así como la presencia de determinados productos tóxicos, incluidos metales pesados, que entran en el influente de la planta de tratamiento. Si alguno de estos tóxicos excede el máximo de tolerancia de un organismo se produce la muerte celular (Mazierski, 1995; Seviour y Blackall, 1998). Existen pocos datos experimentales que demuestren *in situ* el efecto tóxico de tales sustancias aunque se ha sugerido que los microorganismos asociados al flóculo pueden estar protegidos de alguna manera de estos tóxicos (Seviour y Blackall, 1998).

4.4.3.3.- Capacidad para contribuir a la formación del flóculo

Los microorganismos de vida libre que viven suspendidos, independientemente de su tasa de crecimiento, serán eliminados del sistema con el efluente después de la sedimentación. Por el contrario, los que forman el flóculo podrán sedimentar tan pronto como éste se haya formado y, por lo tanto, serán recirculados en el reactor. Esto se traduce en un enriquecimiento de microorganismos con capacidad para formar flóculos (Jenkins *et al.*, 2004).

4.5.- Problemas producidos por microorganismos en sistemas de fangos activos

En los sistemas de fangos activos, para que la depuración se lleve a cabo de forma eficiente, es necesaria una buena separación de los sólidos. Existen muchos problemas derivados de la separación de sólidos en los que se ven implicados los microorganismos presentes en el reactor y en el decantador secundario. En la tabla 5 se enuncian los problemas detectados y sus posibles causas.

4.5.1.- Aumento del volumen de los sólidos sedimentables o “Bulking”

Este fenómeno se produce por el crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos no mycolata en el líquido de mezcla. Su presencia provoca que los flóculos biológicos del reactor sean voluminosos y poco consistentes. Estos flóculos no sedimentan bien y suelen ser arrastrados en grandes cantidades en el efluente de los tanques de sedimentación con el consiguiente problema que comporta (Chi *et al.*, 1999).

4.5.2.- Formación de espumas biológicas o “Foaming”

Se produce cuando hay un crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos que contienen ácidos micólicos y a *‘Microthrix parvicella’* (Goodfellow *et al.*, 1996). Aunque pueden existir otros tipos de espumas producidas por tensoactivos de lenta degradación (Jenkins *et al.*, 1993) las espumas producidas por mycolata son espesas, viscosas y muy estables (Figura 6). De todos los microorganismos que pueden producir el foaming los mycolata son los más

Introducción

problemáticos ya que las espumas que originan son de gran consistencia y su eliminación es difícil sin que se altere la calidad del efluente.

Tabla 5: Problemas en estaciones depuradoras de fangos activos: causas y efectos

Problema	Causa	Efecto
Crecimiento disperso	Los microorganismos no forman flóculos, sino que están dispersos, formando sólo pequeños grupos o en células aisladas	Efluente turbio. No hay zona de sedimentación del fango
Limo (Gelatina) Bulking viscoso (también se ha denominado bulking no filamentoso)	Los microorganismos aparecen entre grandes cantidades de limo exocelular. En casos severos este limo confiere al fango activo una consistencia gelatinosa	Reducción de los porcentajes de sedimentación y compactación. En casos severos no hay separación de sólidos y se pierde fango con el efluente del clarificador secundario. En casos más leves suele aparecer una espuma viscosa
Flóculo - alfiler "Pin - flocc" o "Pinpoint flocc"	Se forman flóculos pequeños, compactos, tenues, toscamente esféricos. Los mayores decantan rápidamente. Los menores decantan lentamente	Índice volumétrico del Fango (I.V.F.) bajo y efluente turbio
Espojamiento "Bulking"	Organismos filamentosos se extienden fuera de los flóculos por la solución, interfiriendo en la compactación y decantación del fango activo	I.V.F. alto, sobrenadante muy claro. Concentración del Fango Activo Recirculado (F.A.R.) y del Fango Activo en Exceso (F.A.E.) baja. En casos severos hay pérdidas de fango con el efluente. El proceso de manejo de los sólidos resulta sobrecargado hidráulicamente
Manto ascendente	La desnitrificación en el clarificador secundario libera N ₂ gaseoso poco soluble que se adhiere a los flóculos de fango activo subiéndolos a la superficie del clarificador	Se forma una espuma de fango activo en la superficie del clarificador secundario
Formación de espumas y/o natas	Causado por (I) sobrenadantes no degradables y por (II) la presencia de GALO y, en algunas ocasiones, de <i>Microthrix parvicella</i>	Grandes cantidades de sólidos del fango activo flotan formando espuma en la superficie de los elementos del tratamiento. Las espumas de <i>Gordonia</i> y <i>Microthrix</i> son persistentes y difíciles de eliminar mecánicamente. Se acumulan y pueden pudrirse. Los sólidos pueden pasar al clarificador y al efluente o derramarse de las cubas de aireación

La primera vez que se describió la formación de estas espumas fue en el año 1969. En ese año se realizó un estudio en donde se describió el llamado "misterio de Milwaukee", por ser ésta la localidad en donde se observaron por primera vez estas espumas que contenían gran cantidad de actinomicetos ramificados Gram-positivos. Estas bacterias fueron posteriormente identificadas como pertenecientes al género *Nocardia*, concretamente *N. amarae* y *N.*

rhodochrous (Lechevalier y Lechevalier, 1974), y por ello a estas espumas se les empezó a conocer como “*Nocardia* foams” (Jenkins *et al.*, 1993). Posteriormente, esta especie fue transferida al género *Gordonia* como *G. amarae* (Klatte *et al.*, 1994; Goodfellow *et al.*, 1994). Sin embargo, actualmente, este término hace referencia al problema de espumas producidas por mycolata, ya que otros microorganismos también pueden causar este problema, entre ellos *Rhodococcus*, y *Tsukamurella* (Nam *et al.*, 2003).



Figura 6: Problema real de espumas en depuradora

La formación de espumas en las plantas de fangos activos es un problema muy extendido. En América el 66% de las plantas han experimentado algún tipo de foaming (Seviour y Blackall, 1998). En Australia el 68% de las plantas sufren problemas de espumas (Seviour *et al.*, 1994). Un amplio seguimiento realizado en Francia puso de manifiesto que el 19.8% de las plantas, sobre todo las que utilizan intensa aireación, habían presentado problemas de espumas. Este estudio revela que en una de cada tres plantas con espumas de origen biológico el problema es puramente estético, sin embargo, en el resto se produce un cambio significativo en la calidad del efluente.

La aparición de espumas causa una serie de problemas (Seviour y Blackall, 1998):

- Las espumas pueden llegar a tener más de un metro de espesor y, por tanto, desbordarse en las pasarelas y áreas circundantes donde se originan peligrosas zonas resbaladizas.

Introducción

- Se pierde gran cantidad de sólidos sedimentables, ya que las espumas pueden retener más del 40% de los sólidos en suspensión.
- Son responsables de la disminución de oxígeno transferido a la superficie de los tanques aireados mecánicamente.
- Los sistemas de eliminación de espumas pueden verse bloqueados y éstas pueden entrar, en algunos casos, en el tanque de sedimentación, reduciendo así la calidad del efluente.
- La espuma puede congelarse en climas fríos o pudrirse en climas cálidos.
- La espuma puede introducirse en los digestores anaerobios y ocasionar también problemas de foaming.

Los aerosoles de los organismos formadores de espumas constituyen un peligro potencial para la salud (Goodfellow *et al.*, 1998). Algunos organismos hallados en las espumas son patógenos oportunistas, tales como *Nocardia asteroides* y *Rhodococcus equi* (Prescott, 1991).

4.5.3.- Microorganismos productores de espumas

Antes de los 80, los únicos microorganismos reconocidos como formadores de espumas eran los actinomicetos nocardioformes, sin embargo, algunos trabajos han implicado ciertos tipos de microorganismos filamentosos asociados previamente con el aumento de volumen, especialmente *Microthrix parvicella* (Blackall *et al.*, 1994; Blackall *et al.*, 1996).

Nocardia (Gordonia) es la bacteria filamentososa cuya presencia es más común en fangos activos de EE.UU y la mayoría de espumas biológicas están producidas por este género, aunque diversos estudios en otros países sugieren que la situación es más compleja (Jenkins *et al.*, 1993).

Los mycolata son la causa más importante de foaming en Australia, Sudáfrica, los Países Bajos o Francia. Estudios realizados en Australia remarcan una morfología distinguible como *Skermania piniformis*, que no ha sido identificada en ningún país europeo, sin embargo,

recientemente han sido observadas morfologías PTLO (Pine Tree - Like Organism) en dos plantas de fangos activos en Dinamarca (Eales *et al.*, 2003)

Microthrix parvicella y diversos microorganismos todavía no clasificados, debido a su imposibilidad de ser aislados en cultivo puro, como el tipo 0675, el tipo 0092, *Thiothrix* sp. o *Nostocoida limicola* son, junto a los mycolata, los principales responsables de la formación de espumas en las plantas de fangos activos al crecer en el licor mezcla y posteriormente acumularse en cantidades considerables en la espuma.

Los microorganismos dominantes identificados por microscopía en espumas de fangos activos son:

- ***Gordonia amarae* (GALO):** perteneciente a la familia *Nocardiaceae* y dentro de ésta al género *Gordonia*. Debido a que durante 20 años el principal productor de espumas biológicas era conocido como *N. amarae* y debido a su similitud morfológica todavía existe la tendencia de llamar a estas bacterias NALO (*Nocardia amarae* - Like Organism). Sin embargo, fue transferida desde el género *Nocardia* a este género (Klatte *et al.*, 1994; Goodfellow *et al.*, 1994) por sus propiedades químicas, microbiológicas y secuencia del 16S rDNA, por lo que ahora, estas bacterias, se denominan GALO (*Gordonia amarae* - Like Organism). Desde su primera descripción como *N. amarae* (Lechevalier y Lechevalier, 1974) esta especie ha sido aislada en gran cantidad de plantas depuradoras con sistemas de fangos activos y es uno de los mycolata más frecuentemente implicado en problemas de espumas biológicas. Su abundancia provoca disgregación flocular y presentan una cubierta cérea que forma una suspensión en medio líquido, ya que atrapan burbujas de aire, que causa la aparición de espumas densas en el sobrenadante clarificado. Además, su abundancia está asociada a bajas cargas másicas, alta edad del fango y altas temperaturas.

- ***Skermania piniformis* (PTLO):** perteneciente a la familia *Nocardiaceae* y dentro de ésta al género *Skermania*. Es la única especie con morfología lo suficientemente característica como para identificarla correctamente. Originariamente se llamaba PTLO porque sus ramificaciones se asemejan a las hojas de un pino (Eales *et al.*, 2003 y Ramírez *et al.*, 2005).

Introducción

- ***Rhodococcus***: perteneciente a la familia *Nocardiaceae* y dentro de ésta al género *Rhodococcus*. Generalmente son cocos Gram-positivos que producen espumas filamentosas en diversas plantas de fangos activos australianas.

- ***Microthrix parvicella***: es muy frecuente en plantas de Europa, Australia y Sudáfrica, pero menos frecuente en plantas de EE.UU. Su ubicación taxonómica no está clara todavía aunque su secuencia de 16S rDNA indica un parentesco con los actinomicetos (Blackall *et al.*, 1994). Por ello se ha ubicado en la clase *Actinobacteria*, en una subdivisión denominada "Actinobacterias no clasificadas". Es una bacteria filamentosas, Gram-positiva, con una apariencia irregular y unas necesidades nutricionales que hacen que hasta la fecha no se haya conseguido aislar en cultivo puro. A pesar de que *Microthrix* no es un nombre taxonómicamente válido, debido a la carencia de una caracterización fenotípica detallada, se propuso conservar el nombre, elevando al organismo al estado de *Candidatus*, debido a que esta bacteria filamentosas es muy frecuente en toda la industria del tratamiento de aguas residuales. Por tanto, el género "*Candidatus Microthrix*" se ubica en la clase *Actinobacteria*, en una subclase denominada "*Actinobacterias sin clasificar*". Incluye dos especies, "*Candidatus Microthrix parvicella*" y "*Candidatus Microthrix calida*", y son unas de las bacterias formadoras de espumas más importantes. Es una bacteria constituida por filamentos largos y finos, que crecen atravesando la estructura del flóculo. No presentan ramificaciones ni vaina y son Gram-positivas y con gránulos Neisser positivos.

- **Tipos morfológicos Eikelboom 0092, 0675, 0041**: son bacterias filamentosas que no han podido ser cultivadas, pero se han caracterizado por la morfología de sus filamentos en fangos activos.

Resulta clara la necesidad de encontrar técnicas que permitan identificar a los microorganismos formadores de espumas de una forma más precisa y rápida, ya que, aunque todos están relacionados de forma taxonómica, difieren substancialmente en su fisiología y tasa de crecimiento. *Rhodococcus* crece relativamente rápido, obteniendo colonias aisladas en una media de 2 - 3 días, *Nocardia* en 5 - 7 días, mientras que *G. amarae* tarda más de una semana y *S. piniformis* más de tres semanas. Además, es muy importante conocer si los organismos presentes en las espumas son patógenos debido a su potencial propagación a través de la creación de aerosoles.

Aunque los principales actinomicetos formadores de espumas como *Gordonia amarae* y *Skermania piniformis* no son conocidos como patógenos otros, como *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus equi* y *Tsukamurella paurometabolum*, pueden causar enfermedades, particularmente en pacientes que usan medicación inmunodepresiva o infectados por el virus VIH (Castelli *et al.*, 1994). Las micobacterias, también detectadas en fangos activos aunque no causantes de espumas, pueden representar un peligro potencial para la salud (Dailloux *et al.*, 1999). Además, el personal de la planta se encuentra expuesto a los aerosoles producidos por los nocardioformes que son potencialmente patógenos y cuya ruta de infección es probablemente la inhalación (Goodfellow, 1992).

4.5.4.- Principales factores que influyen en la producción de espumas

La formación de una espuma biológica estable y viscosa en los tanques de aireación en las plantas de tratamiento de aguas residuales implica el enriquecimiento selectivo de los organismos en el licor mezcla mediante un proceso de flotación (Seviour y Blackall, 1998) y resulta de la combinación de elementos relacionados con la flotación de los microorganismos y mecanismos para estabilizar la espuma producida.

Para que se originen estas espumas biológicas es necesaria la presencia conjunta de burbujas de aire y partículas hidrofóbicas. Estos componentes están presentes en la mayoría de plantas de fangos activos con problemas de espumas. Las burbujas de aire son producidas por el sistema de aireación y retenidas por la matriz de bacterias filamentosas. Las partículas hidrofóbicas más importantes en espumas biológicas son los ácidos micólicos contenidos en la pared celular de los mycolata.

4.5.4.1.- Burbujas de aire

El examen de espumas de fangos activos por microscopía muestra que el foaming consiste en burbujas de aire sujetas en una densa matriz de microorganismos filamentosos en cuyo alrededor se encuentran burbujas individuales que contienen material celular (Foot *et al.*, 1993). La formación de burbujas se ve favorecida por los sistemas de agitación. Se ha examinado también la relación entre el foaming y el tamaño de la burbuja.

Introducción

El tamaño de la burbuja de aire no viene determinado únicamente por el método de aireación empleado, sino que depende a su vez de factores físicos como la viscosidad y la tensión superficial del licor mezcla (Seviour y Blackall, 1998). Otros gases, como el CO₂, N₂ y H₂S, también se encuentran presentes en el licor mezcla como resultado del metabolismo de la microbiota presente, pero el aumento producido es insignificante comparado con el ocasionado por la aireación y no contribuyen significativamente a la formación de espumas (Lemmer y Bauman, 1988a y 1988b).

4.5.4.2.- Partículas hidrofóbicas

La mayoría de los microorganismos productores de espumas contienen grandes cantidades de material lipídico hidrofóbico en sus células. El 35% del peso seco de *M. parvicella* es material lipídico y los nocardioformes poseen un elevado contenido de ácidos micólicos en su pared celular, lo que hace que todas las especies exhiban una elevada hidrofobicidad en algún estadio de su ciclo de crecimiento, aunque esta característica varía según las especies y, en algunos casos, con la edad del cultivo y con la riqueza del medio en carbono y nitrógeno. Por ejemplo, se han detectado diferencias en la hidrofobicidad de *Rhodococcus rhodochrous* aislados de espumas y otras especies de *Rhodococcus* incluso sabiendo que sus ácidos micólicos son similares (Sunairi *et al.*, 1997). La composición de los ácidos micólicos de *R. rhodochrous* y de *R. erythropolis* varía con la edad del cultivo, la temperatura de crecimiento y la fuente de carbono (Stratton *et al.*, 1997, Sokolovská *et al.*, 2003).

La técnica comúnmente utilizada para determinar la hidrofobicidad de la superficie celular de una suspensión acuosa de células es la adherencia microbiana a los hidrocarburos. Mediante esta técnica se examinó la hidrofobicidad de fangos de plantas con y sin problemas de espumas, llegando a la conclusión de que la biomasa presente en el licor mezcla era normalmente más hidrofóbica en las plantas de tratamiento con foaming que en la de plantas que no tienen este problema (Rosenberg *et al.*, 1980).

Se ha conseguido medir la hidrofobicidad de diferentes especies de *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia* y *Mycobacterium* observándose una tendencia a su aumento cuanto mayor es la longitud de la cadena de ácidos micólicos, aunque la hidrofobicidad de las especies de *Mycobacterium* estudiadas no ha sido tan elevada como cabría esperar por su larga cadena de ácidos micólicos. Esto se atribuye a efectos contrarios en la hidrofobicidad del resto de

componentes de la superficie celular. Es por ello que la hidrofobicidad de la superficie celular está probablemente determinada por el balance entre componentes hidrofóbicos e hidrofílicos más que por un sólo componente aislado (Stratton *et al.*, 1997).

También se ha comparado la estabilidad de las espumas producidas por *G. amarae* y una especie sin identificar de *Rhodococcus* sp., siendo tres veces más estable la espuma de *Rhodococcus* debido a la mayor longitud de su cadena de ácidos micólicos.

4.5.4.3.- Tensoactivos

Un tensoactivo es una sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones en un sistema, tiene la propiedad de reducir la tensión superficial del agua. Los componentes de la superficie activa se encuentran presentes en fangos activos debido a que ciertos microorganismos, incluyendo los mycolata, producen lípidos que poseen estas propiedades (Seviour y Blackall, 1998). Dichos lípidos producen tanto asociaciones bacteria-tensoactivo, que causan una asociación entre la bacteria y las gotitas de aceite, como tensoactivos extracelulares, que conducen a la emulsión de hidrocarburos en agua. Ambos tipos soportan la entrada de moléculas hidrofóbicas hacia el interior de las células (Goclick *et al.*, 1990).

El licor mezcla procedente de plantas con problemas de foaming muestra menor tensión superficial que el del resto de plantas sin espumas, sugiriéndose, que grandes cantidades de tensoactivos se encuentran presentes en las plantas con foaming (Goddard y Forster, 1991).

4.5.5.- Factores que afectan al crecimiento de los microorganismos productores de espumas

A pesar de que los microorganismos formadores de espumas, los mycolata y *M. parvicella*, están considerados de crecimiento lento, de algún modo, logran competir por los nutrientes y producir grandes cantidades de biomasa en las plantas de fangos activos.

4.5.5.1.- Requisitos nutricionales

Diversos estudios taxonómicos han demostrado que los mycolata son capaces de utilizar un amplio rango de sustratos que va desde los azúcares simples hasta componentes orgánicos

Introducción

muy complejos. Otros trabajos revelan que *Nocardia* y los organismos relacionados son también capaces de metabolizar varios hidrocarburos, lípidos complejos, esteroides y fenoles (Klatte *et al.*, 1994). Los mycolata aislados de fangos activos también muestran esta capacidad para metabolizar un amplio rango de sustratos, incluyendo sustratos inusuales como tiofenos y quinolonas (Seviour y Blackall, 1998).

Todos los mycolata, y especialmente *Rhodococcus*, son extremadamente versátiles en su capacidad para degradar sustratos y, consecuentemente, mostrarían una exitosa competencia contra otros microorganismos con capacidades metabólicas más limitadas, incluso a pesar de que estos últimos crezcan más rápidamente en sustratos sencillos como la glucosa. Un estudio demuestra que los mycolata aislados de fangos activos crecen pobremente en glucosa y acetato, mientras que el crecimiento es mayor con fructosa como fuente de carbono (Kämpfer *et al.*, 1995).

4.5.5.2.- Requisitos de oxígeno

Los mycolata son aerobios estrictos, esto no significa necesariamente que algunos mycolata no sean capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas, como ciertas especies de *Rhodococcus* que pueden metabolizar anaeróbicamente clorofenoles (Uotila *et al.*, 1992).

4.5.5.3.- Temperatura

Es más probable la aparición de mycolata formadores de espumas en climas cálidos (Eikelboom, 1994), mientras que *M. parvicella* es más frecuente en climas fríos (Seviour *et al.*, 1994). Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que los mycolata no puedan crecer a temperaturas más bajas. Los mycolata aislados de fangos activos crecen en un amplio rango de temperaturas. Algunos aislados, particularmente *Rhodococcus*, crecen a temperaturas tan bajas como 5° C, mientras que la temperatura mínima de crecimiento para *G. amarae* es de 15° C.

De estos estudios se deduce que el crecimiento de algunas bacterias formadoras de espumas en las plantas de fangos activos puede tener lugar a bajas temperaturas si otros requisitos metabólicos no son limitantes. La temperatura óptima de estos microorganismos es de 25° C, mientras que las temperaturas máximas de crecimiento son, al igual que las mínimas, muy variadas, algunos no pueden crecer con temperaturas de 30° C o superiores y, sin

embargo, otros lo hacen a más de 40° C. La capacidad para crecer a altas temperaturas puede ser muy significativa en algunas plantas de tratamiento, ya que la temperatura en las secciones donde aparece la espuma puede aumentar por el contacto directo con el sol.

4.5.5.4.- pH

El pH del licor mezcla influye de forma importante en el crecimiento de los filamentos. Se ha determinado que el nivel de pH óptimo para el desarrollo de los mycolata se encuentra entre 6 y 8. La mayoría de *Rhodococcus*, exceptuando *R. rhodnii*, *Gordonia* y *Tsukamurella* crecen también a pH alcalinos superiores a 9 (Goodfellow *et al.*, 1991).

4.5.6.- Métodos de control

La formación de espumas en los sistemas de fangos activos tiene lugar en muchas de las plantas de tratamiento, las cuales difieren significativamente en sus parámetros operacionales. La temperatura, los métodos de aireación, la edad del fango, el nivel de sólidos, etc. puede determinar qué microorganismos crecen particularmente en una planta y resulta, pues, difícil determinar los factores específicos que favorecen el crecimiento de las grandes cantidades de organismos formadores de espumas.

4.5.6.1.- Manipulación de la edad del fango

Debido a que los actinomicetos son considerados microorganismos de crecimiento lento, una reducción en la edad del fango eliminaría al organismo del sistema. Sin embargo, ésta no resulta una medida totalmente efectiva por la variabilidad en la velocidad de crecimiento de los nocardioformes. Aunque esta medida controla el problema en situaciones adversas, la calidad del efluente se ve afectada (Seviour y Blackall, 1998).

4.5.6.2.- Cloración

La cloración es normalmente utilizada como un método de control no específico para los problemas de “bulking” y “foaming”, aunque hoy en día se cree que perjudica a los flóculos que contienen mycolata. Un uso más efectivo de la cloración en el control de espumas reside en su aplicación pulverizando directamente sobre la espuma en el tanque de aireación (Jenkins *et al.*,

Introducción

1993).

4.5.6.3.- Empleo de selectores

Este método se basa en la manipulación del crecimiento del filamento a través de una zona de selección previa al tanque de aireación. En esta zona se crea un ambiente anaeróbico donde los aireadores dejan de funcionar durante determinados períodos de tiempo, favoreciéndose así el crecimiento de bacterias formadoras de flóculos a expensas de los mycolata (Seviour y Blackall, 1998).

4.5.6.4.- Eliminación física

Existen diversas técnicas de eliminación física empleadas en el control del foaming que incluyen la eliminación mecánica de la capa superficial del licor mezcla, el uso de nebulizadores o flotación selectiva mediante el incremento de la aireación y la eliminación selectiva de las espumas originadas (Pagilla *et al.*, 1996). Los nebulizadores son la opción mayoritaria en las plantas americanas, pero presenta el inconveniente de su baja efectividad ante problemas de espumas moderados o severos.

4.5.6.5.- Otros métodos

La adición de compuestos antiespumantes ha tenido poco éxito a la hora de combatir problemas de "foaming", probablemente debido a que estas espumas biológicas son mucho más estables que las espumas contra las que están diseñadas esos antiespumantes (Duchene, 1994). Además, estos compuestos suelen tener un precio excesivo. Se ha ensayado también la dosificación de sales metálicas como $FeCl_3$ o coagulantes basados en aluminio. Pero ensayos de laboratorio realizados muestran que los nocardioformes tienen diferentes niveles de susceptibilidad a los niveles de hierro (Seviour y Blackall, 1998).

Diferentes compañías comercializan mezclas de microorganismos conteniendo además nutrientes y enzimas. Estos productos no tienen aplicación práctica porque obligan a un uso continuado y por lo tanto resultan caros (Soddell y Seviour, 1990). Recientemente se ha propuesto la utilización de actinofagos para controlar las espumas biológicas producidas por

nocardioformes. Miembros de la familia viral *Siphoviridae* han sido aislados de géneros de mycolata presentes en muestras de reactores de fangos activos (Thomas *et al.*, 2002).

4.6.- Identificación de microorganismos filamentosos en fangos activos

La detección de los microorganismos filamentosos presentes en el sistema de fangos activos es importante para la identificación del problema y para encontrar sus posibles soluciones.

Los métodos clásicos se basan en la observación microscópica de las muestras para determinar las características morfológicas. Aunque estos se siguen utilizando, están siendo sustituidos por los métodos moleculares de detección e identificación ya que evitan, en gran medida, los largos tiempos de incubación y se reduce la manipulación.

4.6.1.- Método clásico de identificación de microorganismos filamentosos

La distinción entre los grupos de actinomicetos se ha basado, tradicionalmente, en criterios fisiológicos, morfológicos y quimiotaxonómicos.

Eikelboom (1975), estableció una nomenclatura basada en la observación microscópica de las características morfológicas, que actualizaron posteriormente Jenkins *et al.* (2004). Estos caracteres morfológicos son:

- **Ramificación:** presente o ausente, y si está presente, si es verdadera o falsa. La verdadera ramificación significa que es celular, con un citoplasma continuo entre las ramas. En el fango activo, los únicos organismos que forman tricomas ramificados son los hongos y los mycolata (*Gordonia*, *Nocardia*, *Skermania*, *Rhodococcus*). En la falsa ramificación no hay continuidad citoplasmática entre tricomas, simplemente se han pegado dos tricomas y han crecido hacia fuera. La falsa ramificación se suele observar en el fango activo sólo en *Sphaerotilus natans*, aunque también se ha descrito ocasionalmente en el tipo 1701.

- **Movilidad:** ausente, o si la hay, describirla. Sólo unos pocos organismos filamentosos del fango activo son móviles. *Beggiatoa spp*, *Flexibacter spp*, y algunas bacterias fotosintéticas

Introducción

(*Cyanophyceae*) son móviles por deslizamiento. *Thiothrix spp.* y el Tipo 021N pueden mostrar limitados movimientos de balanceo o de contracción.

- **Forma del filamento:** recto, ligeramente curvo, doblado, irregular “cadena celular”, enrollado o micelial.
- **Color:** transparente, medio, oscuro.
- **Ubicación:** extendiéndose fuera del flóculo, principalmente dentro del flóculo o libre en el líquido interflocular.
- **Crecimiento adherido o de bacterias unicelulares:** presente o ausente. Si existe indicar si es importante o fortuito.
- **Vaina:** presente o ausente.
- **Paredes transversales (septos celulares):** presencia o ausencia.
- **Diámetro del filamento:** debe medirse tanto el diámetro medio como su extensión en μm ; es importante apreciar si el diámetro es mayor o menor de 1 μm .
- **Longitud del filamento:** extensión en μm .
- **Forma celular:** cuadrada, rectangular, ovalada, con forma de barril, discoidal o varilla con extremos redondeados.
- **Tamaño:** anchura y longitud medias de las células en μm .
- **Depósitos de azufre:** presencia o ausencia *in situ* y presencia de gránulos o ausencia tras realizar el “S test”.
- **Otros gránulos:** presentes o ausentes. Los gránulos observados más frecuentemente son de polifosfatos (gránulos Neisser +) y de PHB (confirmados con la tinción PHB).

- **Reacciones de tinción:** cada organismo filamentosos presente debe evaluarse por separado frente a su reacción a las tinciones de Gram y de Neisser.

- **Observaciones adicionales:** dos organismos filamentosos, *Thiothrix spp.* y el Tipo 021N (poco frecuente) pueden presentar rosetas y gonidios. Una roseta se desarrolla cuando los tricomas crecen radialmente desde un origen común. Los gonidios son células ovaladas o con forma de varilla, que aparecen en el ápice del tricoma, con una apariencia claramente distinta a las células vegetativas. Ambos indican un crecimiento rápido de los organismos. También aparecen en condiciones de deficiencia de nutrientes, así como cuando se trata agua séptica.

Sin embargo, la detección e identificación de éstas a través de métodos clásicos, basados en las características morfológicas y en tinciones diferenciales y de estructuras específicas, no son aclaratorias por varias razones:

- Una misma especie puede mostrar polimorfismos o diferentes especies parecer iguales.
- La cuantificación sólo se puede hacer de modo indicativo, ya que los microorganismos filamentosos que se encuentran en el interior del flóculo pueden pasar desapercibidos.
- El método tradicional es subjetivo y depende del nivel de entrenamiento y experiencia del personal que realiza la identificación y/o cuantificación.

5.- Biodegradación

5.1.- Antecedentes

Muy frecuentemente se designa al pasado siglo XX como el siglo de la química orgánica debido al desarrollo de miles de compuestos diferentes utilizados para la elaboración de una infinidad de nuevos productos: fibras sintéticas, plásticos, compuestos farmacéuticos, etc.

Paralelamente, esto ha supuesto el vertido al medio ambiente en forma de efluentes líquidos, sólidos o gaseosos, de un gran número de estas sustancias, con un fuerte impacto asociado sobre el medio receptor. Este impacto está en numerosas ocasiones originado por el

Introducción

papel limitado que pueden jugar estas sustancias en los ciclos naturales de descomposición de la materia debido a su carácter antropogénico y xenobiótico. Un ejemplo claro lo constituye la industria química y petroquímica, que tiene el dudoso honor de ser la principal fuente de este tipo de residuos, completamente diferentes a los residuos generados por el sector agroindustrial (Méndez, 2002).

Por otra parte, uno de los principales puntos que tiene en cuenta la nueva legislación de la Unión Europea es la necesidad de adoptar procesos de producción con “emisión cero”, que pueden desarrollarse a partir de la minimización de la descarga de los contaminantes generados por las actividades industriales. Para alcanzar ese objetivo, la primera prioridad sería la reducción de la emisión de contaminantes en cada etapa del proceso de fabricación, mientras que la segunda se centraría en el tratamiento y reciclaje de productos de desecho (Méndez, 2002).

5.2.- Contaminación por hidrocarburos

En la actualidad ya no se discute que el petróleo y, por lo tanto, sus componentes mayoritarios, los hidrocarburos, tienen su origen en los compuestos que forman parte de los organismos, los denominados compuestos biogénicos.

Una sucesión de reacciones químicas, ocurridas a altas temperaturas y presiones y durante millones de años, que los geoquímicos engloban con el término de procesos diagenéticos y catagenéticos, han conducido a la conversión paulatina de estas estructuras biogénicas en hidrocarburos (Solanas, 2009).

En lugares donde se han encontrado hidrocarburos, se ha podido demostrar la existencia, en etapas geológicas anteriores, de organismos que poseían en sus células compuestos biogénicos como el pigmento eritroafina o el alcaloide veratramina. Este fenómeno supone que los microorganismos, capaces de crecer en sus orígenes solamente a expensas de compuestos biogénicos, como los azúcares o las proteínas, han ido conviviendo a lo largo de millones de años con una serie de compuestos orgánicos que finalmente han dado lugar a los componentes de los crudos de petróleo actuales (Solanas, 2009).

La firme demanda de energía en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados como fuente de energía. Muchos de sus componentes son empleados como materias primas básicas en las industrias químicas y petroquímicas.

El uso masivo y el transporte del petróleo y sus derivados ocasionan fuertes derrames, los cuales cada vez son más frecuentes, por lo que la contaminación por hidrocarburos es una de las principales causas de destrucción de ecosistemas edáficos y acuáticos (Riojas *et al.*, 2010).

Particularmente, en las zonas de producción petroquímica, la superficie del suelo y las aguas están expuestas a contaminaciones debidas a los productos que allí se utilizan. Las aguas residuales de algunas plantas petroquímicas, además de hidrocarburos, contienen químicos clorados (Shokrollahzadeh *et al.*, 2008).

La importancia de la contaminación producida por estos compuestos viene determinada por sus características mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas. Además, su propiedad de escasa solubilidad dificulta aún más la biodegradación natural.

5.2.1.- Composición del crudo del petróleo

El petróleo se define como una mezcla heterogénea de gas natural y aceite crudo (Okoh, 2006). El crudo del petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos.

Los hidrocarburos constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales (Casellas *et al.*, 1995).

El petróleo contiene mayoritariamente alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*-parafinas), en menor cantidad alcanos ramificados, cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Fernández *et al.*, 1992).

Introducción

La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo. Los hidrocarburos están compuestos, casi en su totalidad, por elementos como el hidrógeno y el carbono en una proporción aproximada de dos átomos de hidrógeno por cada átomo de carbono. También abarca elementos que constituyen menos del 3% (v/v) como el nitrógeno, el azufre y el oxígeno. Asimismo, hay una presencia menor del 1% (v/v) de elementos traza que comprenden el fósforo y metales pesados tales como el vanadio y el níquel (Okoh, 2006).

Los principales componentes (Tabla 6) se subdividen y purifican en distintas fracciones: fracción saturada (*n*-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas), fracción aromática (monoaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos o HAPs), fracción de resinas y fracción de asfaltenos, que son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (Speight, 1991).

Tabla 6: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo (Viñas, 2005)

Fracción	Composición
Saturada	<i>n</i> -alcanos Alcanos de cadena ramificada Isoprenoides Cicloparafinas o cicloalcanos Hopanos
Aromática	Hidrocarburos monoaromáticos Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas Agregados de quinolinas Agregados de carbazoles Agregados de tiofenos Agregados de sulfóxidos Agregados de amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP Ácidos nafténicos Sulfuros Ácidos grasos Metaloporfirinas Fenoles polihidratados

No obstante, la composición puede variar con la localización, la antigüedad y la profundidad del yacimiento petrolífero (Okoh, 2006).

5.2.1.1.- Hidrocarburos monoaromáticos

En esta familia se hallan el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos) formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), de gran importancia ambiental debido a su solubilidad en el agua y su elevada toxicidad. Su alto grado de solubilidad contribuye a su movilidad, permitiéndoles migrar al subsuelo y contaminar aguas subterráneas que abastecen a los seres humanos y a los animales (Margesin *et al.*, 2003).

5.2.1.2.- Hidrocarburos poliaromáticos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se definen por ser estructuras formadas por 2 o más moléculas de benceno fusionadas. Se conocen unos 100 HAPs diferentes ya que existe una elevada cantidad de isómeros. Debido a la elevada energía de resonancia negativa que posee el anillo bencénico, estos compuestos adquieren una gran estabilidad termodinámica. Entre los hidrocarburos diaromáticos encontramos el naftaleno y sus alquilados. Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en el crudo.

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno y sus derivados alquilados. Entre los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos encontramos el fluorantreno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), benzo(a)pireno (5 anillos aromáticos) y cororeno (un HAP condensado con 6 anillos).

Asimismo, se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles) ya que muestran características similares. Las peculiaridades 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 con 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 absorberse a las superficies lo que dificulta su biodegradación y facilita su acumulación en la cadena trófica (Clements *et al.*, 1994).

Introducción

Los HAPs existentes en el medio ambiente (atmósfera, suelos y ecosistemas acuáticos) pueden proceder tanto de la naturaleza como de las actividades antropogénicas. Básicamente las fuentes de HAPs se resumen en tres: el petróleo u origen petrogénico, la combustión u origen pirolítico y la síntesis por seres vivos, cuya aportación es minoritaria (Viñas, 2005).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA) ha incluido los HAPs entre sus contaminantes prioritarios. Fundamentalmente se debe a la peligrosidad intrínseca ya que presentan una toxicidad aguda y de tipo teratogénico, mutagénico y carcinogénico. En suma, también se bioacumulan y su biodegradación en general es mucho más lenta, especialmente los HAPs de elevado peso molecular (Kanaly *et al.*, 2000).

5.2.2.- Fuentes de contaminación

Una investigación realizada en 1981 por el instituto americano de petróleo (API) identificó entre las principales fuentes de contaminación (Benavides *et al.*, 2004):

- **Lodos de perforación de tipo inverso y recortes:** estos lodos contienen un tipo de aceite muy similar al diesel en concentraciones de aproximadamente un 10% y son sumamente arcillosos. Este material se deposita en presas, las cuales anteriormente eran construidas con materiales permeables y filtraban los hidrocarburos al medio ambiente.

- **Suelo contaminado por derrames de tuberías corroídas:** existen campos petrolíferos con alrededor de 50 años de antigüedad, ubicados en zonas pantanosas, manglares u otras selvas inundables. Los acueductos de estos campos se instalaron conectando los pozos individuales a baterías de separación y desde ahí hasta las petroquímicas y refinerías, generándose corrosión anaerobia, debido principalmente a bacterias reductoras de sulfato dando como resultado acueductos corroídos y derramamientos. Los tipos de suelos afectados son de zonas bajas con altos contenidos de materia orgánica y arcilla y los menos afectados, son por lo general los más aptos para la agricultura por poseer texturas menos finas y alta fertilidad. Los ubicados en la planicie costera son los que más preocupan en caso de contaminación por el impacto que puede tener sobre los acuíferos, debido a su alta permeabilidad.

- **Tiraderos de desechos aceitosos semisólidos:** se utilizan pozos que nunca produjeron petróleo o pozos antiguos que están tapados y fueron construidos de materiales

impermeables. Muchas veces se termina el espacio disponible y se sigue depositando el relleno sobre la plataforma lo que resulta en escurrimientos e infiltraciones de hidrocarburos al medio ambiente cercano.

- **Sitios contaminados por descargas petroquímicas y refinerías:** estos tienen sistemas antiguos de tratamiento de aguas residuales, las cuales generalmente contienen sales de los yacimientos de petróleo, lo que puede afectar a masas de agua.

5.3.- Biorremediación

La biorremediación se define como el proceso mediante el cual los residuos tóxicos son degradados por medio de plantas, hongos, algas, bacterias naturales o modificadas genéticamente, en condiciones controladas, convirtiéndolos en compuestos inocuos, como el CO₂ y el H₂O, para el ambiente o la salud humana, o reduciendo su concentración por debajo de los límites establecidos por las regulaciones legales (López *et al.*, 2006).

Una de las medidas biocorrectoras más empleada es la utilización de microorganismos para la descontaminación de suelos y aguas. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y como la fuente de energía para sus funciones metabólicas (Torres, 2003).

La biorremediación utiliza la habilidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos. Esta tecnología está basada en el uso de organismos naturales o mejorados genéticamente para recuperar sitios contaminados y proteger el ambiente (Poindexter y Miller, 1994). Marivela *et al.* (2002) señalan que el proceso de biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico en los siguientes tipos:

- **Fitorremediación:** consiste en el uso de plantas verdes para contener, eliminar o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleidos. Un ejemplo de la fitorremediación la constituye el uso de la especie *Thlaspi caurulencens* en suelos contaminados con zinc y cadmio (Vázquez *et al.*, 1992).

Introducción

- **Biorremediación animal:** existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados.

- **Biorremediación microbiana:** existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas y cianobacterias para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

De entre todos los tipos de contaminantes, los hidrocarburos son los que han mostrado mejores resultados en la aplicación de la tecnología de la biorremediación (Rosenberg *et al.*, 1992).

Dado que los productos petrolíferos son mezclas complejas de hidrocarburos y derivados, la biodegradación es selectiva ya que los microorganismos no degradan por igual las distintas familias de hidrocarburos (Alexander, 2004).

Después de un proceso de biorremediación pueden quedar concentraciones residuales de algunos hidrocarburos. Es entonces cuando se plantea la necesidad de revisar que la concentración de estos hidrocarburos residuales no sea el único criterio para establecer su descontaminación.

Cuando hablamos de biodegradación microbiana de hidrocarburos nos referimos al hecho de que los microorganismos pueden crecer a expensas de la utilización de estos compuestos químicos.

Aunque pueda sorprendernos que un organismo sea capaz de alimentarse a expensas de compuestos tan extraños para el ser humano como el benceno, naftaleno o el pireno, las investigaciones llevadas a cabo por geoquímicos y microbiólogos nos ofrecen una explicación. Observando los sucesos que han ocurrido a lo largo de los tiempos geológicos desde la formación de la Tierra hasta nuestros días, vemos que los microorganismos están en la Tierra desde hace más de 3.500 millones de años, mientras que los organismos superiores desde hace

menos de 1000 millones de años y el hombre desde hace sólo 6 millones de años, un instante a escala de tiempos geológicos (Solanas, 2009).

5.3.1.- Factores condicionantes de la biorremediación microbiana

Generalmente, en un ambiente con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado a favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo (Viñas, 2005).

Si nos centramos en los genes, la presencia de módulos discretos como los operones y de elementos móviles como los transposones y los plásmidos, favorecen la adaptación del microorganismo a agentes contaminantes, permitiéndole desarrollar estrategias para la obtención de energía de prácticamente cualquier compuesto en condiciones aerobias o anaerobias, adoptando de este modo vías metabólicas con sistemas enzimáticos especializados para degradar compuestos complejos (Díaz, 2004).

Principalmente los factores que más influyen en las tasas de biodegradación del petróleo son los nutrientes y las variables ambientales (Figura 7).

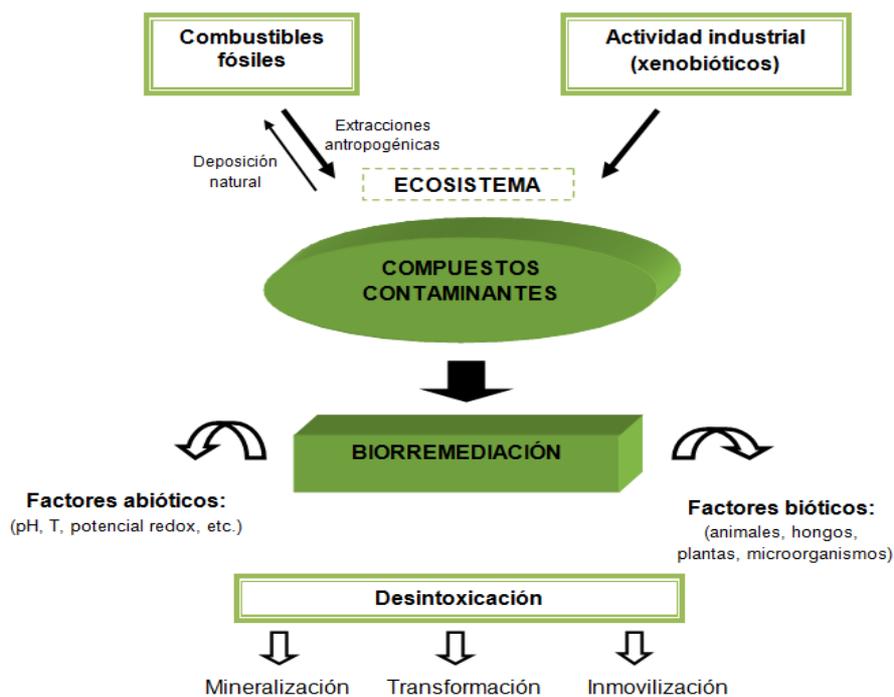


Figura 7: Factores condicionantes en la biorremediación microbiana (Díaz, 2004)

Introducción

5.3.1.1.- Nutrientes

Los microorganismos dependen de diversos nutrientes para su supervivencia. A pesar de que los requerimientos son diferentes en función del tipo de microorganismo de que se trate, todos necesitan nitrógeno, fósforo y carbono.

En la descomposición del fuel, la fuente de carbono no representa ninguna limitación ya que proviene de las propias moléculas orgánicas. Existe cierta confusión y conflicto cuando se analiza la limitación de la biodegradación de petróleo debido a la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en agua de mar. Mientras que un gran número de investigadores han afirmado que se trata de nutrientes limitantes (Ahn *et al.*, 1998; Head y Swannell, 1999) aunque con distintas conclusiones acerca de la proporción C / N, C / P necesaria, otros han llegado a la conclusión opuesta debido a que, cuando se consideran hidrocarburos solubles, la solubilidad de estos es tan baja que imposibilita que se dé un ratio C / N o C / P desfavorable (Atlas, 1981).

Según Ahn *et al.* (1998) el naftaleno podría ser tóxico para *Pseudomonas putida* cuando no existe una fuente de nitrógeno y/o oxígeno. Estos dos elementos son claves en la biodegradación del naftaleno y probablemente de otros HAPs, no solamente para el mantenimiento del metabolismo que conduce a la degradación, sino para la supresión de la toxicidad que podría ocurrir si el naftaleno no es metabolizado y se acumula hasta niveles tóxicos.

La fuente de nitrógeno podría influir en los productos finales o intermedios del metabolismo del naftaleno. Diferentes fuentes de nitrógeno durante la oxidación del naftaleno pueden dar lugar a diferencias en la morfología celular, acumulación de ácido salicílico, evolución de CO₂ y producción de un color amarillo en el medio (Aranha y Brown, 1981).

5.3.1.2.- Variables ambientales

Además de estos factores nutricionales existen variables ambientales que influyen en la degradación de los contaminantes orgánicos, tanto en sistemas terrestres como acuáticos. Estas variables incluyen la temperatura, pH, salinidad y, en particular, la disponibilidad de oxígeno (Bauer y Capone, 1985). A continuación se comentan algunas de las condiciones ambientales

que pueden afectar al crecimiento y, por tanto, a la efectividad del proceso de biodegradación de los hidrocarburos:

5.3.1.2.1.- Oxígeno

Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias implican la oxidación del sustrato mediante oxigenasas, las cuales requieren oxígeno molecular. Normalmente no existen condiciones limitantes en la superficie de la columna de agua o en las capas superficiales de los ecosistemas bentónicos marinos.

Tradicionalmente se ha considerado que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos tiene lugar a tasas despreciables y que, por lo tanto, la importancia ecológica es limitada. No obstante, posteriores investigaciones han puesto de manifiesto la trascendencia de las rutas catabólicas anaeróbicas en la biorremediación (Leahy y Colwell, 1990).

En el caso concreto de la degradación del naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 se ha demostrado que la carencia de oxígeno provocaba la muerte de la misma en presencia de naftaleno (Ahn *et al.*, 1998).

5.3.1.2.2.- Salinidad

Cuando la concentración de sal en las zonas afectadas por un vertido es elevada, la eliminación de contaminantes con métodos de biorremediación convencionales resulta difícil. Concentraciones de sal elevadas provocan alteraciones en las membranas de las células, pueden desnaturalizar los enzimas implicados en el proceso o provocar la desecación osmótica de las células provocándoles su muerte (Kargi y Dincer, 2000).

El número de estudios que analiza el efecto de la salinidad en la degradación microbiológica de fueles es escaso, aunque su efecto perjudicial sobre la actividad microbiana sí ha sido descrito. No obstante, se han obtenido diversos microorganismos capaces de vivir y mantener las tasas de biodegradación en condiciones de salinidad elevadas (Diaz *et al.*, 2000).

Introducción

5.3.1.2.3.- Temperatura

La temperatura es un parámetro fundamental a considerar en la biorremediación *in situ*, ya que tanto la biodisponibilidad como la solubilidad de los compuestos más hidrofóbicos dependen de este parámetro. Un incremento de temperatura provoca un descenso de la viscosidad y, por tanto, afecta al grado de dispersión y al aumento de las tasas de difusión de los compuestos orgánicos.

Temperaturas altas incrementan la metabolización de los hidrocarburos normalmente hasta un máximo entorno a los 30 - 40° C, por encima de la cual la toxicidad de los hidrocarburos aumenta para la membrana celular (Leahy y Colwell, 1990).

En comparación con los ecosistemas mesofílicos, hay pocos ejemplos de biorremediación de lugares contaminados sometidos a bajas temperaturas. Se han caracterizado diversos microorganismos adaptados a las bajas temperaturas capaces de degradar hidrocarburos. El umbral para una degradación significativa es de 0° C (Siron *et al.*, 1995). De la misma manera, a temperaturas elevadas, como por ejemplo en las zonas litorales de regiones semiáridas, también se han encontrado microorganismos termófilos que poseen un determinado potencial para la conversión de hidrocarburos.

En general, la tasa de degradación decrece cuando baja la temperatura, lo cual se cree que está relacionado con la disminución de la actividad enzimática (Leahy y Colwell, 1990). Además, la solubilidad del oxígeno depende de la temperatura y éste, como ya se ha comentado, es un factor fundamental en la biodegradación aeróbica.

5.3.1.2.4.- pH

Afecta a la solubilidad de muchos compuestos y, por tanto, a la disponibilidad de productos que pueden afectar a la actividad biológica. El pH óptimo para la actividad del sistema enzimático naftaleno dioxigenasa, que cataliza el primer paso de la ruta catabólica del naftaleno es 7. Según Dorn *et al.*, (2003) el catabolismo del naftaleno está influenciado por el pH.

5.3.1.2.5.- Concentración de sustancias contaminantes

En aquellos casos en los que la concentración de hidrocarburos es demasiado elevada se produce una reducción en la cantidad de oxígeno y nutrientes disponibles. Esto crea una situación de estrés para los microorganismos que puede reducir su capacidad para degradar el fuel.

5.3.1.3.- Características del producto petrolífero

Si bien los microorganismos pueden degradar una parte importante de un crudo de petróleo, tienen preferencias por algunos hidrocarburos. Los crudos de petróleo están formados, como se ha comentado anteriormente, por cuatro familias de compuestos o fracciones: los hidrocarburos alifáticos, los hidrocarburos aromáticos, las resinas y los asfaltenos.

Los microorganismos degradan con facilidad los hidrocarburos lineales de la fracción alifática, especialmente los que contienen menos de 28 carbonos, aunque se han llegado a describir biodegradaciones de hidrocarburos de hasta 44 carbonos. Los isoprenoides y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados más lentamente que los lineales. Respecto a los hidrocarburos aromáticos, a medida que aumenta el número de anillos y los sustituyentes alquilo, por tanto su peso molecular, aumenta su resistencia a la biodegradación (Prince, 2005).

Otro aspecto importante relacionado con las características de los productos petrolíferos es su hidrofobicidad y su facilidad para adsorberse en partículas del suelo como las arcillas o absorberse en la materia orgánica. Estos fenómenos, así como la difusión en microporos dan lugar a una disminución de su biodisponibilidad hacia los microorganismos que deben degradarlos.

5.3.1.4.- Factores relacionados con los microorganismos

Por lo que respecta a los factores relacionados con los microorganismos, se define el período de aclimatación como aquel tiempo que requieren las poblaciones microbianas presentes en un emplazamiento para empezar a degradar los contaminantes.

Introducción

En este sentido, se conocen distintos factores que pueden disminuir o aumentar este tiempo pero en términos generales están relacionados con el historial de contaminación del emplazamiento.

Si la contaminación es remota los microorganismos están muy adaptados a la presencia de los contaminantes y pueden dar una respuesta rápida a una bioestimulación sin prácticamente un período de aclimatación. En el caso de contaminaciones accidentales, este período podría alargarse.

Sin embargo, cabe señalar que en el caso de la contaminación por hidrocarburos, al tratarse de unos contaminantes prácticamente omnipresentes desde la década de 1860 en que se construye el primer motor de combustión interna, se ha podido constatar que se encuentran microorganismos degradadores de hidrocarburos en prácticamente cualquier emplazamiento.

5.3.2- Microorganismos degradadores

En Long Beach (California), aplicaron la biorremediación *in situ* en suelos contaminados con aceite diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos complementada con la adición de nutrientes y oxígeno en el suelo (Cunningham y Philp, 2000) e inoculación de una mezcla enriquecida de consorcios bacterianos previamente extraída del mismo suelo.

Esto permitió encontrar consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos identificados por secuenciación de genes 16S rDNA, demostrando la presencia de *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas* sp. (Téllez y Valderrama, 2000).

Los microorganismos aislados en suelos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación de algunas fracciones del petróleo (Rich *et al.*, 2000). Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos haciéndolos susceptibles a ataques secundarios y facilitando su conversión a CO₂ y H₂O (Van Hamme *et al.*, 2000; Torres, 2003).

El suborden *Corynebacterineae* alberga un gran número de degradadores xenobióticos. Especies del género *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* son bien conocidas por su

versatilidad metabólica y capacidad para degradar sustancias químicas peligrosas para el medio ambiente (Bell *et al.*, 1998; Arenskötter *et al.*, 2004; Larkin *et al.*, 2005).

Las micobacterias son organismos metabólicamente muy versátiles. No solamente crecen en sustratos comunes tales como azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos, sino que también lo hacen sobre una gran variedad de hidrocarburos, incluyendo los aromáticos y cíclicos. Además, también degradan hidrocarburos policíclicos aromáticos como el pireno (Heitkamp *et al.*, 1988a; Heitkamp *et al.*, 1988b) y el fenantreno. Muchas micobacterias crecen sobre compuestos de carbono simple tales como el metanol y las metilaminas (Kato *et al.*, 1988; Urakami y Yano, 1989).

Un área de la biotecnología que tiene muchas aplicaciones comerciales utilizando las micobacterias es la biotransformación de esteroides. Estos procesos incluyen la modificación de los esteroides y la degradación selectiva de las cadenas de esteroides tales como el colesterol y el β – sitosterol (Martin, 1984).

El uso de micobacterias en la biorremediación de sedimentos contaminados también está siendo cada vez más habitual. La adición de cepas de *Mycobacterium* degradadoras de pireno en sedimentos mejora las tasas de mineralización de muchos hidrocarburos aromáticos.

Varias cepas de la especie *Mycobacterium chlorophenolicum* degradan los tri-, tetra-, y pentaclorofenoles (Apajalahti y Salkinoja-Salonen, 1987; Häggblom *et al.*, 1988). Micobacterias de rápido crecimiento que degradaban tolueno fueron aisladas de la superficie de rocas en arroyos contaminados con este compuesto (Tay *et al.*, 1998).

En general, la desventaja de las micobacterias es su baja tasa de crecimiento y sus bajas actividades catalíticas. Sin embargo, las micobacterias juegan un rol muy importante como fuentes de interesantes capacidades biocatalíticas.

Uno de los géneros bacterianos más explotados en bioprocesos no convencionales es *Rhodococcus*, un grupo único consistente en microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos (Flavio *et al.*, 1999). Además, son capaces de sobrevivir en

Introducción

hábitats contaminados bajo condiciones de inanición (Warhust y Fewson, 1994; Acharya y Desai, 1997)

Las características bioquímicas encontradas en algunas cepas son la producción de poli-3- hidroxialcanoatos, acumulación de metales pesados y enzimas útiles como la fenilalanina, deshidrogenasas y endoglucosidasas.

El género *Rhodococcus* posee una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos, incluyendo las actividades de di-oxigenasa y mono-oxigenasa sobre anillos, así como la actividad de ruptura de catecol. Algunas cepas presentan también la vía del 3-oxoadipato. Lo anterior sumado a su capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes, la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental las hacen excelentes candidatas para los tratamientos de biorremediación (Flavio *et al.*, 1999).

Rhodococcus sp. utiliza el dibenzotiofeno (DBT) como única fuente de azufre (Matsui *et al.*, 2002). En México, investigadores del Instituto Mexicano del Petróleo, han aislado cepas de *Rhodococcus* de sitios contaminados con petróleo, capaces de desulfurar muestras de diesel. Otros microorganismos reportados como capaces de utilizar el DBT como fuente de azufre son los pertenecientes al género *Gordonia* (Li *et al.*, 2006).

Dentro de las aplicaciones industriales y ambientales, se incluye la producción de ácido acrílico y acrilamida, conversión de esteroides, biorremediación de hidrocarburos clorados y fenoles, a lo que se añade su gran capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos halogenados y numerosos compuestos aromáticos, como los HAPs (Eriksson *et al.*, 2003), evidenciándose que tanto *Rhodococcus rhodochrous* como *Rhodococcus erythropolis* demostraron ser una excepción, pues la degradación de naftaleno por parte de estos no es significativa, debido a que la actividad degradadora de HAPs por parte de estos microorganismos se ve regulada por las proteobacterias del medio afectado (Kästner *et al.*, 1998; Hideki *et al.*, 2000; Carla *et al.*, 2004).

Los hidrocarburos alifáticos y aromáticos son químicamente tóxicos y resistentes a la degradación biológica. Aunque muchos organismos son capaces de degradar el benceno, solamente unos pocos *Rhodococcus* pueden utilizar este sustrato (Zaitsev *et al.*, 1993; Rehfuß y Urban, 2005)

Muchas especies de *Rhodococcus* son consideradas buenas biosurfactantes (Blackall y Marshall, 1988a; Lang y Philp, 1988; Choi *et al.*, 1999). Los *Rhodococcus* responden a la presencia de alcanos produciendo biosurfactantes que les ayudan a usar componentes hidrofóbicos como sustratos (McDonald *et al.*, 1981; Wagner *et al.*, 1983; Kurane *et al.*, 1995).

La versatilidad degradadora del género *Rhodococcus* puede ser debida a la presencia de múltiples plásmidos que poseen genes para la degradación de diferentes componentes (Van der Geize y Dijkhuizen, 2004; König *et al.*, 2004). La presencia de múltiples rutas catabólicas y genes también contribuye a la versatilidad catabólica del género (Larkin *et al.*, 2005).

Mucho menos se ha referenciado sobre las habilidades degradadoras del género *Gordonia*, posiblemente porque el taxón fue establecido como tal mucho más tarde que el género *Mycobacterium* o el género *Rhodococcus*.

Los aislados de *Gordonia* utilizan benceno, tolueno, xileno, pireno, diésteres de eftalato y alcanos como única fuente de carbono y energía y, además, transforman varios componentes del sulfato (Kumeer *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000).

Una de las propiedades más interesantes del género *Gordonia* es su habilidad para degradar isoprenos naturales o sintéticos del caucho, así como también diferentes eftalatos (Chatterjee y Dutta, 2003). Varias cepas de este género desintegran y mineralizan el caucho natural y los guantes de látex (Linos *et al.*, 1999).

Además, el género *Gordonia* también se caracteriza por ser un buen degradador de compuestos tales como el fenol. Un estudio reciente descubre la capacidad degradadora de *Gordonia kroppenstedtii* (Kim *et al.*, 2009). Ésta es una especie nueva, aislada de un arroyo contaminado con fenol, en Corea.

El género *Pseudonocardia* se caracteriza por tener varias especies con una gran capacidad degradadora. Así podemos encontrar *Pseudonocardia asaccharolytica* y *Pseudonocardia sulfidoxydans*, dos especies capaces de degradar el dimetil disulfuro (Reichert *et al.*, 1998); *Pseudonocardia benzenivorans*, degradadora de benceno (Kämpfer y Kroppenstedt, 2004); *Pseudonocardia chloroethenivorans*, capaz de degradar el cloroetano (Lee *et al.*, 2004); *Pseudonocardia dioxanivorans*, degradadora del 1,4-dioxano (Mahendra y Álvarez-

Introducción

Cohen, 2005); *Pseudonocardia ammonioxydans*, capaz de oxidar el amonio (Liu *et al.*, 2006); *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans*, capaz de oxidar tetrahidrofuranos (Kämpfer *et al.*, 2006) y *Pseudonocardia carboxydivorans*, capaz de oxidar el monóxido de carbono (Park *et al.*, 2008).

En cuanto al género *Microbacterium* encontramos *Microbacterium dextranolyticum*, capaz de degradar polisacáridos producidos por bacterias (Yokota *et al.*, 1993) o *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, capaz de degradar hidrocarburos (Schippers *et al.*, 2005).

5.4.- Biodegradación de fenol y naftaleno

5.4.1- Fenol

Recibe el nombre de fenol, el alcohol monohidroxílico derivado del benceno, además de todos los compuestos que tengan un radical oxidrílico unido al anillo bencénico. El fenol es conocido también como ácido fénico o ácido carbólico. Puede sintetizarse mediante la oxidación parcial del benceno.

El fenol en forma pura es un sólido cristalino de color blanco-incoloro a temperatura ambiente. Su fórmula química es C_6H_5OH , y tiene un punto de fusión de $43^\circ C$ y un punto de ebullición de $182^\circ C$. El fenol es una sustancia manufacturada. El producto comercial es un líquido. Tiene un olor dulce y alquitranado.

El fenol fue obtenido por Ruge en 1834. Separó del asfalto lo que él llamó ácido carbólico, nombre con el que se conoció hasta principios de este siglo. En 1914 Meyers y Bergius, proponen hidrolizar el monoclorobenceno con hidróxido de sodio. Proceso que se generalizó pocos años después. En 1930, se transforma el proceso de hidrólisis del monoclorobenceno, obteniéndose el fenol en fase vapor, hidrolizando el monoclorobenceno con agua, en lo que se conoce como proceso de Rashig-Hooker. Actualmente se obtiene mediante oxidación de cumeno (isopropil benceno) a hidroperóxido de cumeno, que posteriormente, en presencia de un ácido, se escinde en fenol y acetona, que se separan por destilación.

El fenol se usa principalmente en la producción de resinas fenólicas. También se usa en la manufactura de nylon y otras fibras sintéticas. Es muy utilizado en la industria química,

farmacéutica y clínica como un potente fungicida, bactericida, sanitizante, antiséptico y desinfectante, también para producir agroquímicos, bisfenol A (materia prima para producir resinas epoxi y policarbonatos), en el proceso de fabricación de ácido acetilsalicílico (aspirina) y en preparaciones médicas como enjuagues bucales y pastillas para el dolor de garganta. Los fenoles son sustancias tóxicas frecuentemente encontradas en los ambientes acuáticos como resultado de la contaminación a partir de una gran variedad de fuentes (industriales, biogeoquímicas o degradación de pesticidas, entre otras) (Patterson, 1995).

La alta toxicidad de los compuestos fenólicos ha hecho que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA) y la Comunidad Económica Europea, los consideren como contaminantes prioritarios (Di Corcia *et al.*, 1993; Wild *et al.*, 1993). En tal sentido, la eliminación de fenoles de las aguas residuales, tanto urbanas como industriales, tiene gran importancia ambiental.

El tratamiento biológico ha sido utilizado eficientemente en la depuración de aguas residuales que contienen compuestos orgánicos peligrosos (Brenner *et al.*, 1992; Yoong y Lant, 2001). Si bien los compuestos tóxicos, como el fenol, contribuyen a la inestabilidad de los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, estos compuestos también son usados como fuentes de carbono y energía por ciertos grupos de microorganismos (Yoong y Lant, 2001). Con este tipo de tratamiento, el fenol es eliminado y convertido en compuestos inocuos de bajo peso molecular. Sin embargo no es una tarea fácil debido a las propiedades tóxicas que este compuesto ejerce hacia los microorganismos (Barrios *et al.*, 2006).

En la industria petroquímica, incluso en bajas concentraciones, los compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento de microorganismos. Para concentraciones superiores, la degradación de fenol no se produce por completo, provocando la inhibición o baja eliminación de nutrientes (Barrios *et al.*, 2006).

La ruta metabólica (Figura 8) típica para la degradación de fenol ocurre mediante la vía de los derivados del catecol, antes de la división del anillo a través de la oxidación *-orto* o *-meta*, para, posteriormente convertirse en acetaldehído, succinato o piruvato, según la oxidación seguida (Barrios *et al.*, 2006).

Introducción

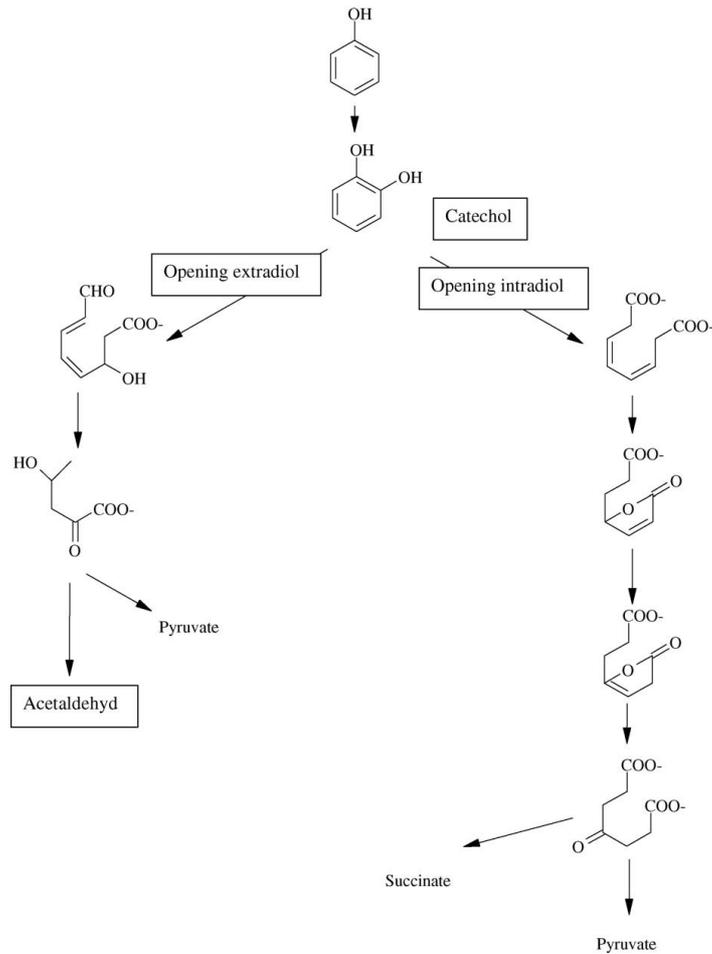


Figura 8: Rutas metabólicas para la degradación del fenol (Barrios *et al.*, 2006)

La degradación de los compuestos fenólicos puede ser llevada a cabo por organismos procariontas y eucariotas, tanto en condiciones aeróbicas (oxígeno como aceptor final de electrones) como anaeróbicas (nitrato, sulfato, iones metálicos o dióxido de carbono como aceptores finales de electrones) (Lovley y Lonergan, 1990).

5.4.2- Naftaleno

El naftaleno es el hidrocarburo aromático policíclico de menor tamaño y mayor solubilidad. Se trata de un hidrocarburo aromático de bajo peso molecular con dos anillos bencénicos. Es moderadamente volátil con un punto de ebullición de 218° C y una solubilidad en agua de 31,7 mg/l a 25° C. (Preuss *et al.*, 2003).

El naftaleno es un sólido blanquecino que predomina fundamentalmente en los combustibles fósiles. Posee un olor fuerte pero no desagradable, es bastante inflamable y fácilmente evaporable.

Cuando se encuentra expuesto al aire es degradado por la humedad, la luz solar y por determinadas bacterias. Es insoluble en agua, pero bastante soluble en disolventes orgánicos como el tolueno y el benceno.

Se obtiene generalmente de la pirólisis de la gasolina o de aceites residuales de la pirólisis mediante destilación fraccionada. El contenido de naftaleno en el producto asciende como mínimo al 95%, siendo los componentes restantes impurezas tales como los metilindenos.

El naftaleno y sus derivados metilados (metilnaftalenos) suelen ser los HAPs dominantes en la mayoría de los fueles y crudos, y también los que antes se pierden por disolución.

Su degradación fue una de las primeras rutas estudiadas (Figura 9), comprobándose desde el principio que el crecimiento sobre este sustrato permitía aislar salicilato y 1,2-dihidro-1,2- dihidroxinaftaleno del medio de cultivo. Por inducción secuencial se demostró que ambos son compuestos intermedios en el metabolismo del naftaleno (Silva *et al.*, 2003). A partir de la conversión a catecol entran en juego, como en el caso del fenol, las dioxigenasas que permiten degradar este compuesto y transformarse en acetaldehído, succinato o piruvato, según la oxidación seguida (Barrios *et al.*, 2006).

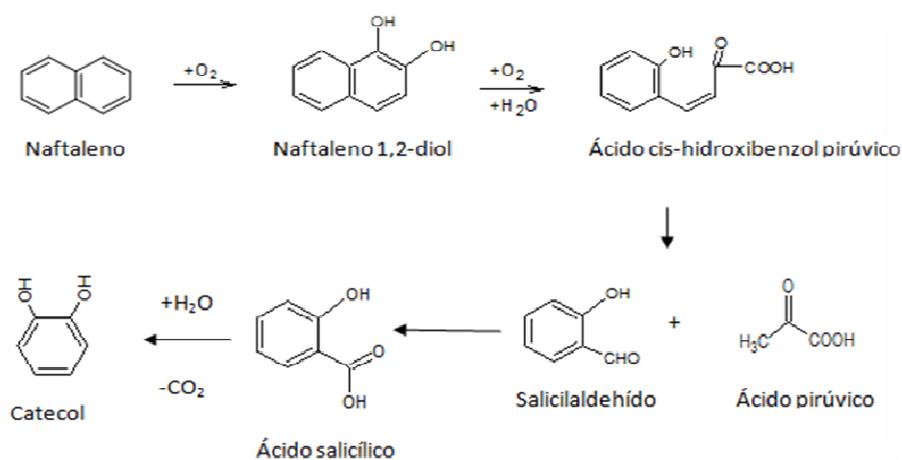


Figura 9: Ruta metabólica para la degradación del naftaleno (Atlas *et al.*, 2008)

5.5.- Gen de la catecol 1,2-dioxigenasa

La presencia de genes catabólicos determina el potencial de biodegradación de las comunidades microbianas. Por lo tanto, desde un punto de vista práctico, las técnicas moleculares son necesarias para la identificación y seguimiento de los microorganismos que intervienen en las muestras de los procesos de biorremediación en ambientes contaminados (Táncsics *et al.*, 2007).

A través del desarrollo y las aplicaciones de las técnicas moleculares se ha llegado a una mayor comprensión de los procesos catabólicos de hidrocarburos y, en suma, nuevos mecanismos catalíticos han sido caracterizados (Van Hamme *et al.*, 2003).

Las rutas de biodegradación aeróbica de compuestos aromáticos tales como el fenol, naftaleno o benzoato convergen en la escisión del anillo del catecol. La escisión del anillo aromático está catalizada por dioxigenasas y ocurre mediante la división en *orto* o *meta* de este anillo (Vesely *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2009; Matera *et al.*, 2010).

Las dioxigenasas que están implicadas en la ruptura del anillo se subdividen en extradiol dioxigenasas si la apertura del anillo aromático dihidroxilado se lleva a cabo mediante un proceso de *meta*-escisión (entre los carbonos 2 y 3) como es el caso de la catecol 2,3-dioxigenasa o intradiol dioxigenasas si la apertura del anillo aromático dihidroxilado se lleva a cabo mediante un proceso de *orto*-escisión (entre los carbonos 1 y 2) como es el caso de la catecol 1,2-dioxigenasa (Táncsics *et al.*, 2007).

El gen *catA* codifica para la catecol 1,2-dioxigenasa y está involucrado en el primer paso de la catálisis del anillo aromático, llevando a cabo la apertura del anillo mediante un proceso de *orto*-escisión. En esta ruptura en *orto* (Figura 10) interviene el gen *catA* (que codifica para la catecol 1,2-dioxigenasa), seguido por el gen *catB* (que codifica para la cis,cis-muconato cicloisomerasa) y el gen *catC* (que codifica para la muconolactona isomerasa), resultando en la degradación del catecol a β -keto adipato (Vesely *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009). Finalmente los productos intermedios generados entran a formar parte del ciclo del citrato (Vesely *et al.*, 2007).

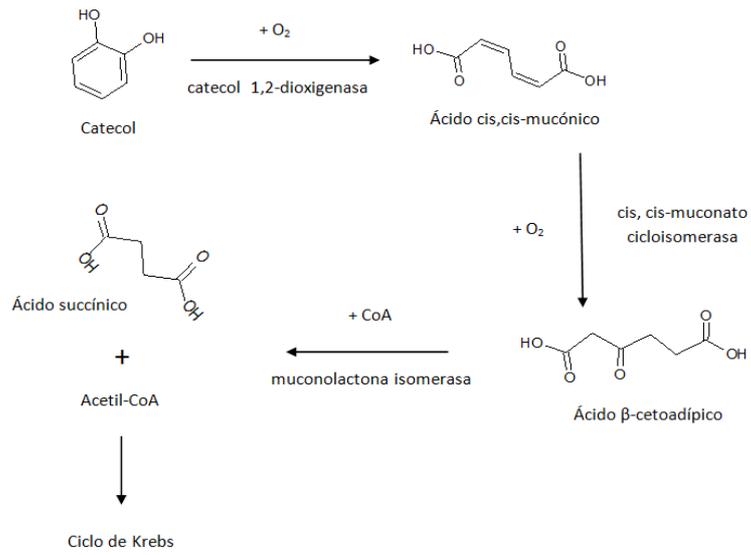


Figura 10: Degradación del catecol mediante la escisión orto del anillo aromático (Shen *et al.*, 2009)

OBJETIVOS

La depuración de aguas residuales por el sistema de fangos activos es un proceso biotecnológico donde intervienen multitud de parámetros operacionales, todos ellos interrelacionados. Tradicionalmente se han controlado los parámetros físico-químicos como si de un sistema inerte se tratara, aunque actualmente se conoce el papel crucial que realizan los microorganismos.

Según se ha explicado en la introducción, el crecimiento indeseado de actinomicetos filamentosos que contienen ácidos micólicos puede interferir seriamente en el funcionamiento correcto del sistema de fangos activos. En muchas plantas de tratamiento europeas, australianas y americanas se han estudiado con detalle estos microorganismos. En las plantas de tratamiento españolas no existe ningún estudio que vaya más allá de la observación microscópica de la muestra de fango activo.

Por ello, es importante conocer la diversidad de especies que se encuentran en las plantas de tratamiento y que son potenciales productoras de espumas.

Además, actualmente, generamos gran cantidad de residuos que inevitablemente van a parar a los ecosistemas que nos rodean. Sin embargo existe muy poca bibliografía acerca de la capacidad de biodegradación de microorganismos aislados de las EDAR.

Por lo tanto, en el presente trabajo nos planteamos utilizar la taxonomía polifásica para estudiar la biodiversidad de los actinomicetos productores de espumas, además de estudiar la capacidad de biodegradación sobre ciertos productos tóxicos. Los objetivos parciales son:

1.- Aislamiento en cultivo puro de actinomicetos de las plantas depuradoras de aguas residuales domésticas, de las refinerías de petróleo y de las plantas químicas. Se seleccionarán los aislados más representativos y se caracterizarán morfológicamente.

2.- Caracterización quimiotaxonómica de las cepas mediante la extracción y análisis de ácidos micólicos, la determinación de los isómeros del ácido diaminopimérico (DAP) y la extracción de los azúcares predominantes de la pared celular.

Objetivos

3.- Identificación a nivel de especie mediante análisis de la secuencia del 16S rDNA, por medio de la realización de árboles filogenéticos, para establecer las relaciones evolutivas entre los aislados y realizar el análisis de las matrices de similitud nucleotídica.

4.- Caracterización fenotípica de las cepas mediante la realización de una serie de tests fenotípicos.

5.- Realización de estudios de biodegradación de las especies identificadas mediante taxonomía polifásica para poder dar una solución práctica y real a los problemas ocasionados por las diferentes sustancias tóxicas.

6.- Detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa para determinar qué aislados poseen el potencial catabólico para degradar hidrocarburos aromáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Cepas bacterianas de referencia

Para familiarizarnos con la morfología típica de este tipo de bacterias se utilizaron un total de 30 cepas de referencia suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ). Las cepas elegidas incluían las principales especies encontradas en estaciones depuradoras de aguas residuales, pertenecientes todas ellas al suborden *Corynebacterineae*.

Entre las cepas del género *Gordonia* se encuentra la especie *Gordonia amarae* que es la especie aislada con más frecuencia en muestras de espumas. De los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* se incluyen las especies patógenas *Nocardia asteroides* y *Rhodococcus equi*. En la tabla 7 se muestra la relación de cepas de referencia utilizadas.

Tabla 7: Microorganismos de referencia utilizados

Cepa	Número de la colección*	Cepa	Número de la colección*
<i>Corynebacterium xerosis</i>	CECT 4160	<i>Nocardia farcinica</i>	CECT 3053
<i>Dietzia maris</i>	CECT 4617	<i>Nocardia nova</i>	CECT 3056
<i>Gordonia alkanivorans</i>	CECT 7017	<i>Nocardia soli</i>	CECT 3375
<i>Gordonia amarae</i>	CECT 5704	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	DSMZ 44752
<i>Gordonia defluvii</i>	DSMZ 44981	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	CECT 5751
<i>Gordonia hirsuta</i>	CECT 7018	<i>Rhodococcus equi</i>	CECT 555
<i>Gordonia hydrophobica</i>	CECT 7021	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	CECT 3013
<i>Gordonia malaquae</i>	DSMZ 45064	<i>Rhodococcus percolatus</i>	DSMZ 44240
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	DSMZ 44604	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	DSMZ 44812
<i>Gordonia rubropertincta</i>	CECT 5393	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	DSMZ 44555
<i>Gordonia terrae</i>	CECT 5707	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	CECT 5750
<i>Mycobacterium phlei</i>	CECT 3009	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	CECT 5749
<i>Nocardia asteroides</i>	CECT 3051	<i>Skermania piniformis</i>	CECT 3057
<i>Nocardia brasiliensis</i>	CECT 3052	<i>Tsukamurella spumae</i>	DSMZ 44113
<i>Nocardia carneae</i>	CECT 3374	<i>Williamsia maris</i>	DSMZ 45037

*CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

*DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Todas las cepas se incubaron en medio ISP-2 (Anexo 1), en condiciones de aerobiosis, de 5 a 10 días dependiendo de la cepa. En el caso de *Skermania piniformis* se utilizó el medio 180 según recomienda la CECT. Esta especie necesita un tiempo de incubación de 20 - 25 días para obtener colonias visibles.

Material y Métodos

Para su almacenamiento se mantuvieron en crioviales con caldo nutritivo con un 20% de glicerol a - 80° C. Antes de proceder a su congelación, así como después de recuperar una cepa, se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción Gram, para comprobar que no hubiera habido ningún tipo de contaminación. El estudio previo de estas cepas de referencia, tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico, facilitó la posterior caracterización morfológica de los aislados estudiados en este trabajo.

2.- Caracterización de muestras de fangos activos

2.1.- Toma de muestras y aislamiento

La toma de muestras fue realizada por el propio personal de las plantas. Se tomaron muestras de las espumas del reactor biológico en recipientes estériles y se enviaron al laboratorio donde se guardaron en refrigeración a 4° C y se procesaron dentro de las 48 horas siguientes. Todas las plantas estudiadas realizan el proceso basado en el sistema de fangos activos.

Para realizar el aislamiento se utilizaron 3 medios de cultivo diferentes para aumentar la diversidad. Estos 3 medios fueron el medio Sauton, el medio Czapeck modificado y el medio GYEA (Anexo 1). Una vez recibidas las muestras se procesaron realizando una serie de diluciones seriadas para rebajar la carga microbiana y poder seleccionar posteriormente, de forma mucho más clara, los aislados que más nos interesaban.

Una vez sembradas las placas con 0.1 ml de cada dilución se dejaron en estufa a 28° C durante 7 - 21 días. Transcurrido este tiempo se procedió a elegir los aislados que fueran lo más representativos posibles seleccionando aquellos que presentaron mayor diversidad morfológica y una mayor abundancia.

Estos aislados se sembraron nuevamente, pero esta vez en medio ISP-2, y se volvieron a introducir en estufa a 28° C durante 7 - 21 días. Este paso se realizó un mínimo de 3 veces hasta que se obtuvo un cultivo puro y sin ningún tipo de contaminación.

A continuación, en la tabla 8 se muestran las plantas estudiadas en el presente trabajo y los aislados obtenidos.

Tabla 8: Aislados obtenidos

EDAR	Fecha	Aislados
Alcoy	2004	P54
Algemesí	2004	P145
Algorós	2004	P152
Benidorm	2004	P72
Benissa	2004	P108
Camp de Turia	2004	P135
Carcaixent	2004	E9
Carraixet	2008 - 2009	Ca3.1, Ca7.2, Ca9.1, Ca10.1, Ca16.1, Ca17.1, Ca19.1, Ca20.2, Ca21.1, Ca22.2, Ca27.1
Castellón	2005 / 2009	N16-9, CS1.1, CS3.1, CS5.1, CS6.1, CS6.2, CS7.1, CS8.1, CS8.2, CS9.1, CS9.2, CS10.1, CS10.2, CS10.3, CS11.1, CS11.2, CS12.1, CS12.2, CS12.3, CS13.1, CS16.1, CS16.2, CS17.1, CS17.3, CS18.1, CS18.2, CS18.3, CS19.2, CS20.1, CS20.2, CS20.3, CS20.4, CS21.3, CS21.4, CS24.2, CS25.1, CS26.1, CS26.2, CS27.1, CS27.2, CS28.1, CS28.3, CS28.4, CS32.1, CS32.2, CS32.3, CS32.4, CS33.1
Denia	2004 / 2009	P158, D1.1, D1.2, D2.1, D2.2, D2.3, D3.2, D6.1, D7.1, D8.1, D8.2, D9.1, D11.1, D11.2, D12.2, D12.3, D13.1, D15.1, D15.2, D16.1, D16.2
Formentera	2005	N4
Jijona	2009	J4.1
Lloc Nou	2005	L2, L10
Mancomunada	2004	P175
Mora d'Ebre	2005	N5
Pinedo	2004 / 2009	P48b, P1.1, P1.2, P2.1, P2.2, P2.3
Quart Benàger	2004 / 2009	P26, QB2.1, QB2.2, QB6.1, QB7.1, QB7.2, QB8.1, QB8.2, QB10.1, QB10.2, QB13.1, QB16.1, QB16.2, QB17.2, QB18.1, QB18.2, QB19.1, QB19.2, QB20.1, QB21.1, QB21.2, QB22.1
Rincón de León	2004	P39
Rojales	2005	N1
Torres Torres	2004	P166
Torrevieja	2004	P141
Vall d'Uxó	2005	N9-1
Vinalopó	2004 / 2008	P46p, 8V
Viver	2005	N17-4
Planta Química 1	2008	C5.1a, C5.1b, C5.6, C5.5a, PA.2, PA.3, PB.1, PB.3, PB.6, PB7, PC4
Refinería 1	2008	C2.1, C2.2, C2.3, R1, R5, LR-4
Planta química 2	2008	CQG-5a
Refinería 2	2008	C4.1, C4.5, 54B, RG4-a, RG4-b

En total se estudiaron 28 plantas depuradoras de aguas residuales pertenecientes a las provincias de Alicante, Cádiz, Castellón, Huelva y Valencia. Cuatro de ellas, las pertenecientes a las provincias de Cádiz y Huelva, eran depuradoras de aguas residuales industriales pertenecientes al sector petroquímico.

Material y Métodos

Se obtuvieron un total de 152 aislados, la mayor parte pertenecientes a las depuradoras de Carraixet, Castellón, Denia y Quart Benáger ya que fue en éstas donde se realizó un estudio pormenorizado durante todo el año 2009 con recepción de muestras cada 15 días. El resto de aislados se obtuvo en los años 2004, 2005 y 2008.

2.2.- Caracterización fenotípica basada en características morfológicas

Para cada aislado se realizó una observación macroscópica y una observación microscópica. Con esto se comprobó que los resultados obtenidos coincidieran con el trabajo previo realizado. La observación macroscópica se fundamenta en el aspecto de las colonias aisladas: dimensión, color, contorno regular o irregular, textura, superficie lisa o rugosa, opacidad, color reverso, consistencia...etcétera. Además, se efectuó la prueba de la catalasa para comprobar que fueran catalasa positivos.

Para la observación microscópica se realizó una tinción Gram para comprobar que tuvieran una morfología típicamente nocardioforme. La microscopía directa está basada en que determinados grupos de mycolata tienen una morfología peculiar que se puede utilizar para identificarlos:

- **Morfología cocobacilar irregular:** ausencia de ramificaciones o muy escasas ramificaciones.
- **Morfología GALO (*Gordonia amarae*-Like-Organism):** presenta ramificaciones en ángulo recto producidas por especies de *Gordonia* y de *Nocardia*.
- **Morfología PTLO (Pine-Tree-Like-Organism):** presenta ramificaciones en ángulo agudo para el caso de *Skermania*.

2.3.- Caracterización quimiotaxonómica

Para esta caracterización se llevaron a cabo tres pruebas fundamentales:

- Extracción y análisis de ácidos micólicos.

- Determinación de los isómeros del ácido diaminopimérico (DAP).
- Extracción y análisis de los azúcares predominantes de la pared celular (WCS).

Estos tres marcadores quimiotaxonómicos son los que mejor definen al grupo de los mycolata.

2.3.1.- Extracción y análisis de ácidos micólicos

2.3.1.1.- Materiales

Para realizar este análisis se preparó previamente:

- **TBAH (hidróxido de tetrabutil amonio):** al 5%, mediante la dilución, con agua destilada y estéril, de TBAH al 40%.
- **Ácido molibdofosfórico:** al 5%, mediante la dilución de ácido molibdofosfórico al 10% con etanol absoluto. La solución adquiere un color verdoso. Es necesario mantener a 4° C.

En el ensayo se empleó una placa de celulosa TLC de 20x20 cm (Merck 1.05554).

2.3.1.2.- Metodología

La detección de ácidos micólicos se ha realizado siguiendo el método propuesto por Hamid *et al.* (1993). En primer lugar se añadió, en criotubos de 2 ml., 1000 µl de TBAH y aproximadamente 100 mg de perlas de vidrio (<106 µ). Posteriormente, a partir de los cultivos en ISP-2 de los actinomicetos, se agregó un asa de siembra de cada muestra a cada criotubo y, tras agitar en vórtex durante 30 segundos como mínimo, se incubaron en termoblock a 100° C durante 4 horas.

Tras las 4 horas de incubación, los criotubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo criotubo, al que se le añadió 1 ml de diclorometano y 25 µl de yodometano (todo ello se realizó en la cámara de extracción de gases) para, posteriormente, homogeneizarlo en un tuborotador a 40 rpm durante 30 minutos.

Material y Métodos

Pasados estos 30 minutos, se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos y se transfirió la capa inferior a un nuevo tubo eppendorf. Esos tubos eppendorf se depositaron en termoblock a una temperatura constante de 55° C hasta que estuvieron completamente secos y, seguidamente, se redisolviéron con 75 µl de éter de petróleo. Una vez preparadas las muestras se procedió a aplicar 5 µl de cada una de ellas en una placa de celulosa.

Esta placa de celulosa se colocó en una cubeta de vidrio que contenía éter de petróleo y acetona (95:5) y se mantuvo allí hasta que el frente estuvo aproximadamente a 1 cm del final de la placa. A continuación se dejó secar la placa y se pulverizó, en la cámara extractora de gases, con ácido molibdofosfórico al 5%. Finalmente se incubó en estufa a 100° C durante 5 - 10 minutos y se procedió a su lectura.

2.3.2.- Determinación de los isómeros del ácido diaminopimélico (DAP)

2.3.2.1.- Materiales

Para realizar esta prueba se tuvo que preparar anteriormente:

- **50 ml de sistema disolvente:** añadiendo 33,3 ml de metanol, 11 ml de agua destilada y esterilizada, 1,6 ml de HCl 6N y 4,1 ml de piridina. La mezcla se conservó a 4° C en cámara frigorífica hasta su utilización.
- **100 ml de control:** disolviendo 0,0019 g del patrón de DAP (Sigma) en 10 ml de agua destilada y esterilizada.

En el ensayo se empleó una placa de celulosa TLC de 20x20 cm (Merck 1.05716).

2.3.2.2.- Metodología

La detección de la presencia de ácido diaminopimélico (DAP) y la identificación de sus isómeros es uno de los procedimientos más utilizados para bacterias Gram-positivas del grupo de los actinomicetos.

El principal componente de la pared celular en las bacterias Gram-positivas es el peptidoglicano, que puede contener uno de los isómeros del DAP, estos son, L-DAP o *meso*-DAP. Estos isómeros pueden ser determinados por análisis del hidrolizado ácido de la célula total y separación por cromatografía en capa fina (Staneck y Roberts, 1974).

Para llevar a cabo dicha determinación, en primer lugar, se añadieron 500 µl de HCl 6N a criotubos de 2 ml conteniendo aproximadamente 100 mg de perlas de vidrio (<106 µ). A continuación, y a partir de los cultivos en ISP-2 de los actinomicetos, se añadió un asa de siembra de cada una de las cepas a cada criotubo y, tras agitar en vórtex durante 6 minutos, se incubaron en termoblock a 100° C durante 4 horas.

Transcurridas las 4 horas de incubación, los criotubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf. Estos eppendorf se incubaron en termoblock a 100° C hasta el secado del sobrenadante y, una vez seco, se añadieron 500 µl de agua destilada estéril, resuspendiendo la mezcla mediante vórtex. De nuevo, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 4000 rpm y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf, que se llevaron a incubar a 100° C hasta que el sobrenadante se secó por completo. Transcurrido el tiempo necesario para su secado, se redisolvió con 75 µl de agua destilada. Una vez preparadas las muestras, se procedió a aplicar 3 µl de cada una de ellas y 1 µl del control en la placa de celulosa.

Realizado esto, la placa se colocó en una cubeta de vidrio conteniendo 50 ml del sistema disolvente previamente preparado y se mantuvo allí durante 5 horas. Al cabo de esas 5 horas se dejó secar la placa y se pulverizó, en la cámara extractora de gases, con ninidrina en acetona al 0,2%. A continuación, se incubó en estufa a 100° C durante 5 - 10 minutos y se procedió a su lectura.

2.3.3.- Extracción y análisis de los azúcares predominantes de la pared celular

2.3.3.1.- Materiales

Para realizar esta prueba se preparó anteriormente:

Material y Métodos

- **Reactivo de eftalato de anilina:** se preparó con 3,25 g de ácido eftálico, que se añadieron a 100 ml de agua saturada en butanol y 2 ml de anilina. Se mantuvo a 4° C en cámara frigorífica hasta su utilización.
- **Agua saturada en butanol:** se añadieron agua y n-butanol en una proporción de 1:1.
- **Azúcar estándar en piridina al 1%:** en nuestro caso arabinosa y galactosa.

En el ensayo se utilizó una placa de celulosa TLC de 10x20 cm (Merck 1.05552).

2.3.3.2.- Metodología

El estudio de los constituyentes mayoritarios de la pared celular de los actinomicetos tiene una importancia taxonómica considerable. Es por ello por lo que consideramos que esta prueba es fundamental. Para llevarla a cabo se utilizó el protocolo propuesto por Hasegawa *et al.*, 1983.

En primer lugar se añadieron 0,1 ml de HCl 0,25N a cada criotubo. Posteriormente, y a partir de los cultivos puros de cada cepa, se añadió media asa de siembra a cada criotubo y se autoclavaron durante 15 minutos a 121° C.

Después de dejar enfriar a temperatura ambiente se añadieron, a la placa de celulosa TLC, 1 µl de la preparación estándar de los azúcares (arabinosa y galactosa) y 3 µl de cada muestra.

Hecho esto, la placa se introdujo en una cubeta de vidrio conteniendo 10 n-butanol : 6 H₂O : 6 piridina : 1 tolueno y se dejó desarrollar hasta que el frente estuvo a 1 cm del final de la placa. Posteriormente, se dejó secar fuera de la cubeta y se metió de nuevo en la cubeta durante 2 horas aproximadamente.

Una vez transcurridas esas 2 horas se dejó secar la placa fuera de la cubeta y se roció, en la cámara extractora de gases, con el reactivo de eftalato de anilina. A continuación se incubó en estufa a 100° C durante 4 minutos y se procedió a su lectura.

2.4.- Caracterización genotípica

Para ello, partiendo de un cultivo puro de cada una de las cepas, se procedió a la extracción del DNA mediante el protocolo del CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide). Además se utilizó un kit de extracción comercial (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA extraído de las muestras fue amplificado mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando los iniciadores específicos (Lane, 1991):

- **27f** (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, siendo M = C, A)
- **1492r** (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT, siendo Y = C, T)

Finalmente, los productos obtenidos de la PCR se purificaron y secuenciaron para, posteriormente, analizar la secuencia e identificar cada cepa a nivel de especie.

2.4.1.- Extracción de DNA. Protocolo del CTAB

Los nocardioformes filamentosos forman agrupaciones de hifas fuertemente unidas que es necesario disgregar para conseguir rendimientos adecuados en la extracción de DNA. Además, muchas especies crecen fuertemente adheridas al agar debido al micelio de sustrato que producen. En este caso las cepas se cultivan en medio líquido en agitación a 28° C durante 3-5 días, se recogen las células por centrifugación, se lavan y se homogeneizan en tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM) en un tubo de vidrio con tapón de rosca con perlas de vidrio para deshacer agregados de hifas. Estas células se someten a dos pasos de congelación para ayudar a romper la pared.

En las cepas que no forman micelio y que no se adhieren al agar se puede suspender las células directamente del medio sólido en tampón TE sin perlas de vidrio.

Una vez suspendidas en 500 µl de tampón TE, las células se lisaron añadiendo 100 µl de lisozima (50 mg/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37° C, agitando cada 5 - 10 minutos en vórtex para deshacer agregados y facilitar la acción de la lisozima. Posteriormente, se añadieron 30 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Los tubos eppendorf se agitaron e incubaron nuevamente, esta vez durante 30 minutos a 37° C.

Material y Métodos

Pasado este tiempo se añadieron 100 µl de NaCl 5 M, se agitó y se añadieron 80 µl de una solución de CTAB/NaCl (CTAB 10% en NaCl 0.7M), se agitaron bien en vórtex y se incubaron a 65° C durante 10 minutos.

La purificación del DNA se realizó añadiendo un volumen de 700 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), agitando y centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar los complejos formados por el CTAB. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se añadió un volumen de 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se agitó la muestra y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos de complejos con el CTAB (proteínas y polisacáridos).

A continuación, el sobrenadante, que contiene los ácidos nucleicos, se transfirió a otro tubo eppendorf y se adicionó el mismo volumen de isopropanol frío para precipitar el DNA. El DNA precipitado se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar el isopropanol y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol frío al 70%, agitando suavemente. Finalmente, se centrifugó para eliminar el etanol, se secó en una secadora de vacío durante 15 minutos y se resuspendió en 50 µl de tampón TE. Para eliminar los restos de RNA extraído se añadió 1 µl de RNAsa (25 mg/ml). Las muestras se conservaron a 4° C durante 24 horas, tras las cuales se realizó un gel de comprobación de la extracción.

2.4.2.- Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la adecuada extracción del DNA se analizaron las muestras (3 µl de cada una de ellas) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en tampón TAE 1X. Para ello se añadió 1,2 g de agarosa en 100 ml de TAE 1X, preparado a partir de la adición de 20 ml de TAE 50X (48,9 g de Tris base, 7,44 g de Na₂EDTA· 2H₂O y 1,42 ml de ácido acético glacial a 1000 ml de agua MiliQ, ajustando el pH a 8,5) y 980 ml de agua MiliQ.

Una vez solidificado el gel, se procedió a cargarlo con los 3 µl de cada muestra, a los que anteriormente se mezclaron un tampón de carga. Además, se debe disponer en los extremos del gel un marcador que, en nuestro caso, es de 100 pb. Una vez cargado el gel, se le somete a un voltaje de 90 V durante 45 minutos. Los fragmentos de DNA se visualizaron con un transiluminador de UV tras teñirlos con bromuro de etidio. Finalmente, las muestras se conservaron a - 20° C hasta su utilización.

2.4.3.- Amplificación por PCR

La amplificación del 16S rDNA se realizó mediante PCR, utilizando los iniciadores 27f y 1492r (Lane, 1991). La reacción se realizó en un volumen total de 50 μ l, conteniendo 1.5 μ M de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs (mezcla equimolar de los cuatro nucleótidos), 0.4 μ M de cada iniciador, 1.25 U del enzima *Taq* polimerasa (Ecogen) con su correspondiente tampón y 3 μ l de DNA. En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo en el que el DNA se substituyó por agua estéril.

A continuación, se realizó la reacción de amplificación (Tabla 9) que comienza con una fase inicial de desnaturalización (95° C, durante 5 minutos), seguida de 35 ciclos compuestos por la desnaturalización (95° C, durante 1 minuto), la unión de iniciadores (55° C, durante 1 minuto) y la elongación (72° C, durante 1 minuto). Por último, se produce un ciclo final de extensión (72° C, durante 10 minutos).

El DNA amplificado por la PCR (8 μ l) se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa del modo descrito anteriormente.

Tabla 9: Ciclos de la reacción de amplificación de la PCR para el gen 16S rDNA

1 ciclo	95° C	5 min.	Desnaturalización
35 ciclos	95° C	1 min.	Desnaturalización
	55° C	1 min.	Unión de iniciadores
	72° C	1 min.	Elongación
1 ciclo	72° C	10 min.	Extensión

2.4.4.- Purificación del DNA

El 16S rDNA obtenido tras la PCR se purificó utilizando el kit de purificación GenElute (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, los productos purificados (3 μ l) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa del modo descrito anteriormente.

Material y Métodos

2.4.5.- Obtención y análisis de las secuencias del 16S rDNA

La secuenciación de los productos obtenidos tras la PCR fue realizada en el Laboratorio de Secuenciación del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) de la Universitat Politècnica de València (UPV). Para la realización de las reacciones de secuenciación se utilizó el kit ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction (versión 3.1). Estas reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar en un secuenciador automático “Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer”.

La secuencia de bases de cada fragmento, con una longitud aproximada de 600 a 700 nucleótidos, se obtuvo en un archivo de texto electrónico desde el electroferograma mediante la aplicación científica CHROMAS (versión 1.43). Las secuencias del 16S rDNA fueron ensambladas manualmente, utilizando el programa informático PHYDIT, a partir de la combinación de fragmentos separados generados con los iniciadores 27f y 1492r que amplifican el segmento 16S en sentidos opuestos. Los segmentos inicial y final (alrededor de 25 nucleótidos de longitud) de cada secuencia parcial, debido a que suelen presentar una baja fiabilidad, fueron eliminados antes de ensamblar la secuencia completa. Las secuencias parcialmente alineadas se unieron para generar una secuencia completa del gen del 16S rDNA.

La probable identidad de cada una de las cepas secuenciadas se determinó mediante la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en Internet a partir del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Jones, 2006).

2.4.6.- Árboles filogenéticos

A partir de las secuencias se obtienen los árboles filogenéticos de cada género, para así poder caracterizar mejor cada especie encontrada. Como se ha comentado anteriormente, lo que nos aporta el BLAST (Basic Local Alignment Tool) es la posible identidad, con un alto porcentaje de validez, de cada cepa secuenciada.

Para realizar dichos árboles filogenéticos se utilizó el programa informático PHYDIT y, dentro de él, la herramienta llamada CLUSTAL X. Previamente se seleccionaron las especies validadas de cada género (Euzéby, 2011) y se obtuvo la secuencia del 16S rDNA de cada especie en el banco de datos del NCBI. Posteriormente se escogieron las especies tipo de cada

género del suborden *Corynebacterineae*. Por último, se escogió una especie alejada de ellas que sirviera como raíz para así poder dar validez al árbol filogenético.

Una vez realizado esto, se procedió a generar los árboles filogenéticos mediante la herramienta PHYDIT package (Chun, 1995). Primero se dedujeron los árboles usando el método del algoritmo Neighbour-Joining. Posteriormente se evaluaron por el análisis del “bootstrap” (Felsenstein, 1993) utilizando el método del Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). Por último, se utilizó el programa informático TREECONW para generar los árboles filogenéticos.

2.4.7.- Matrices de similitud

Una vez realizados los árboles filogenéticos se procede a confeccionar las matrices de similitud que indican el porcentaje de similitud que existe entre las cepas aisladas y las cepas más representativas que componen el árbol filogenético. Las matrices de similitud se realizan mediante el programa informático PHYDIT, utilizando la herramienta Sim Table.

2.5.- Caracterización fenotípica basada en características metabólicas

Se han realizado una serie de test fenotípicos, basados en la degradación de diversos compuestos, crecimientos en diferentes fuentes de carbono y crecimientos en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Además se realizaron tests de tolerancia para comprobar los crecimientos a diferentes temperaturas.

2.5.1.- Crecimiento a diferentes temperaturas

En este test fenotípico se realizó la siembra de las cepas en medio GYEA (Anexo 1) y se incubaron a 10° C, 28° C (control) y 37° C. Las placas a 28° C y 37° C se examinaron a los 7 y 14 días, mientras que las placas incubadas a 10° C se examinaron a las 4 semanas. El crecimiento en las placas indicaba un resultado positivo.

La nomenclatura que se utilizó fue: - para describir que no hay crecimiento, + para describir que existe un crecimiento bajo, ++ para un crecimiento medio y +++ para un crecimiento alto, todo ello tomando como referencia las cepas incubadas a 28° C.

Material y Métodos

2.5.2.- Pigmentación de colonias

La pigmentación de las colonias se determinó observando las placas utilizadas para el examen morfológico. Para determinar los colores se utilizaron los métodos propuestos por Shirling y Gottlieb (1966).

2.5.3.- Actividades metabólicas

2.5.3.1.- Esculina

La hidrólisis de la esculina se determinó en el medio basal de Williams (Anexo 1). Para ello se suplementó este medio con esculina (0.1%). Todo ello se vertió en placas, las cuales se inocularon con las cepas a estudiar. Posteriormente cada una de ellas fue examinada después de 7 y 14 días. Si el medio se ennegrecía indicaba un resultado positivo.

2.5.3.2.- L- Tirosina

Este test se realizó utilizando el medio GYEA al que se le añadió L-Tirosina (0.5%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo la presencia de halos en las placas.

2.5.3.3.- Nitratos

Para la reducción de nitratos se utiliza como medio de cultivo el agua de peptona nitrato, que se distribuye en tubos con campana Durham. Se inocula el microorganismo y se incuba a 28° C durante 2-7 días. Los resultados se leen añadiendo a los tubos 1 ml de los reactivos I y II de Griess-Ilosvay. La presencia de nitrito se manifiesta por el desarrollo de un color rojo en el plazo de unos minutos. La presencia de gas en la campana de Durham indica la formación de nitrógeno gaseoso y, por tanto, la completa reducción del nitrato.

2.5.3.4.- Urea

Para realizar este test, las colonias se siembran en el medio Urea Agar Base. Se mantienen en estufa a 28° C durante 2 semanas aproximadamente. Los microorganismos que hidrolizan la urea producen iones amonio que viran el medio a rojo.

2.5.4.- Uso de fuentes de carbono (1%): azúcares

Para estas pruebas se realizó un control positivo que consistió en incubar las cepas en medio GYEA a 28° C durante 7, 14 y 21 días.

2.5.4.1.- D+Lactosa

Este test se realizó utilizando el medio Stevenson (Anexo 1) al que se le añadió D-Lactosa (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.4.2.- D+Maltosa

Este test se realizó utilizando el medio Stevenson al que se le añadió D+Maltosa (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.4.3.- D-Arabinosa

Para realizar este test se utilizó el medio Stevenson al que se le añadió D-Arabinosa (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

Material y Métodos

2.5.4.4.- D+Fructosa

Este test utilizó el medio Stevenson al que se le añadió D+Fructosa (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.4.5.- D-Galactosa

Para realizar este test se utilizó el medio Stevenson al que se le añadió D-Galactosa (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.4.6.- D-Glucosa

Este test utilizó el medio Stevenson al que se le añadió D-Glucosa (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.4.7.- D-Manitol

Este test utilizó el medio Stevenson al que se le añadió D-Manitol (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.4.8.- meso-inositol

Para realizar este test se utilizó el medio Stevenson al que se le añadió meso-inositol (1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.5.- Uso de fuentes de carbono y nitrógeno (0.1%): aminoácidos

Para estas pruebas se realizó un control positivo que consistió en incubar las cepas en medio GYEA a 28° C durante 7, 14 y 21 días.

2.5.5.1.- L-Alanina

En este test se utilizó el medio Stevenson al que se le añadió L-Alanina (0.1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.5.2.- L-Histidina

Para realizar este test se utilizó el medio Stevenson al que se le añadió L-Histidina (0.1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

2.5.5.3.- L-Prolina

En este test se utilizó el medio Stevenson al que se le añadió L-Prolina (0.1%). Después de verter el medio en las placas e inocularlo con las cepas, se examinaron a los 7, 14 y 21 días, indicando un resultado positivo cuando el crecimiento es mayor o igual que en la placa de control

Material y Métodos

positivo GYEA y un resultado negativo cuando el crecimiento es menor que en las placas de control positivo GYEA.

3.- Biodegradación de compuestos derivados del petróleo

3.1.- Ensayos biodegradación

Antes de realizar los ensayos de biodegradación del fenol y del naftaleno, a fin de aumentar la capacidad de éxito de los mismos, se efectúa una revisión bibliográfica de los medios de cultivo minerales utilizados con anterioridad por otros investigadores en dicho tipo de ensayos. Los medios seleccionados fueron el M9, el BHM y el MSM (Anexo 1) (Rehfuss *et al.*, 2005; Okoh *et al.*, 2006; y Auffret *et al.*, 2009).

En primer lugar se realiza un cultivo de aclimatación previa de los microorganismos a estos tres medios de cultivo que mejore su posterior siembra en los mismos medios suplementados con los diferentes compuestos tóxicos. Este es un paso fundamental ya que, si sembráramos directamente los microorganismos, se podrían producir inhibiciones en el crecimiento al pasar de un medio rico en nutrientes, como es el medio ISP2, a cualquiera de los medios elegidos que no son tan ricos en nutrientes. Lo que se hace es sembrar las cepas en cada medio de cultivo suplementado con glucosa al 0,1% como única fuente de carbono.

La elección del fenol y del naftaleno para los ensayos de biodegradación se debe a que en las depuradoras donde se obtuvieron las cepas, principalmente las del sector petroquímico, estos compuestos son los predominantes.

Las cepas, durante el proceso de aclimatación se mantienen durante 14 días a 28° C. Una vez transcurridos estos 14 días de aclimatación, las cepas se siembran en los tres medios seleccionados, los cuales se suplementan con fenol al 0,1% y naftaleno al 0,1%.

Se utiliza como control positivo una resiembra en los diferentes medios suplementados únicamente con glucosa al 0,1%. Seguidamente se incuban a 28° C durante 14 días, tiempo en el que se realiza una primera lectura, y se dejan durante 7 días más, hasta llegar a los 21 días de incubación, fecha en la cual se realiza la segunda y definitiva lectura de crecimiento.

La nomenclatura que se utiliza es la siguiente: - para describir que no hay crecimiento, + para describir que existe un crecimiento bajo, ++ para un crecimiento medio y +++ para un crecimiento alto o máximo, similar al que se obtiene en los medios únicamente suplementados con glucosa.

Por último, se realizaron unos ensayos para comprobar que las cepas estudiadas no presentaran autotrofia y poder confirmar que los resultados obtenidos en los ensayos de biodegradación eran válidos.

Para ello se utilizó la misma metodología. Se sembraron las cepas a partir de las placas de aclimatación en los medios de cultivo elegidos, pero esta vez sin ninguna fuente de carbono presente. Así se comprueba si los aislados son capaces de crecer en condiciones autótrofas utilizando el CO₂ como fuente de carbono.

3.2.- Detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa

La detección del gen catecol 1,2-dioxigenasa se realiza por medio de la amplificación mediante PCR de dicho gen. En este caso se utilizan los iniciadores C120f y C120r (Shen *et al.*, 2009).

- **C120f** (5' – GGCACCAAGGGCAGCATCGAGGGCCCGTACTAC - 3')
- **C120r** (5' – CAGGTGCAGGTGCGCGGGCCGCCACGGATGGCC – 3')

La reacción de amplificación (Tabla 10) comienza con una fase inicial de desnaturalización (95° C, durante 5 minutos), seguida de 30 ciclos compuestos por la desnaturalización (95° C, durante 30 segundos), la unión de iniciadores (66° C, durante 45 segundos) y la elongación (72° C, durante 1 minuto). Por último, se produce un ciclo final de extensión (72° C, durante 7 minutos).

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl conteniendo 2 µM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs (mezcla equimolar de los cuatro nucleótidos), 1 µM de cada iniciador, 0.4 U del enzima *Taq* polimerasa (Ecogen) con su correspondiente tampón y 3 µl de DNA. En cada

Material y Métodos

reacción de amplificación se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua estéril. El DNA amplificado por la PCR (8 μ l) se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa del modo previamente descrito en el apartado 2.4.2.

Tabla 10: Ciclos de la PCR para el gen catecol 1,2-dioxigenasa (Shen *et al.*, 2009)

1 ciclo	95° C	5 min.	Desnaturalización
30 ciclos	95° C	30 seg.	Desnaturalización
	66° C	45 seg.	Unión de iniciadores
	72° C	1 min.	Elongación
1 ciclo	72° C	7 min.	Extensión

En cada reacción de amplificación se incluye el DNA de dos cepas de referencia (*Gordonia amarae*, CECT 5704; *Gordonia amicalis*, DSMZ 44461) suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ). Estas cepas se utilizan como control negativo y como control positivo respectivamente. A su vez, en cada reacción, se dispone de un blanco en el que el DNA se sustituye por agua estéril.

3.2.1.- Purificación del DNA

Igualmente que en la purificación del 16S rDNA, el DNA obtenido tras la PCR se purificó utilizando el mismo kit de purificación GenElute (Sigma). Posteriormente, para comprobar la calidad de los productos purificados (3 μ l) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa mediante el modo descrito anteriormente.

3.2.2.- Obtención y análisis de las secuencias del gen *catA*

Una vez purificados los productos de PCR se enviaron, como en el caso de los productos del 16S rDNA, al Laboratorio de Secuenciación del IBMCP de la Universitat Politècnica de València. Para la realización de las reacciones de secuenciación se utilizó el mismo kit ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction (versión 3.1) y las reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar en un secuenciador automático "Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer".

Como la secuencia de bases poseía una longitud de aproximadamente 400 bases no hizo falta el ensamblaje previo de los dos fragmentos (forward y reverse). Simplemente se eliminaron los segmentos iniciales y finales que poseían mala calidad de secuencia (alrededor de 25 nucleótidos de longitud). Las secuencias se analizaron realizando un BLAST, con lo que se obtuvo una identificación del gen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Caracterización de muestras de fangos activos

1.1.- Aislamiento

Se realizaron 189 muestreos en 28 estaciones depuradoras diferentes, obteniéndose un total de 152 aislados con una gran variabilidad morfológica. De estos, 147 pertenecían al suborden *Corynebacterineae*, 4 al suborden *Pseudonocardineae* y 1 al suborden *Micrococcineae*. En las figuras 11, 12 y 13 se pueden observar algunas placas donde se realizaron los aislamientos.

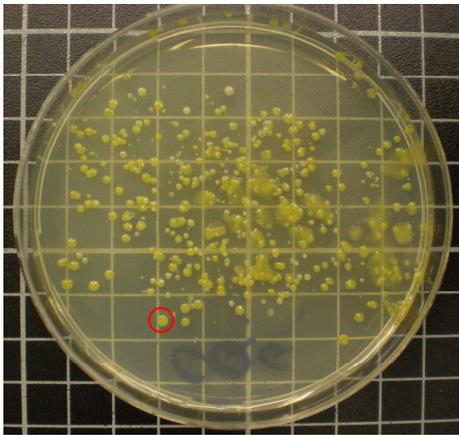


Figura 11: Placa aislado CQG-5a

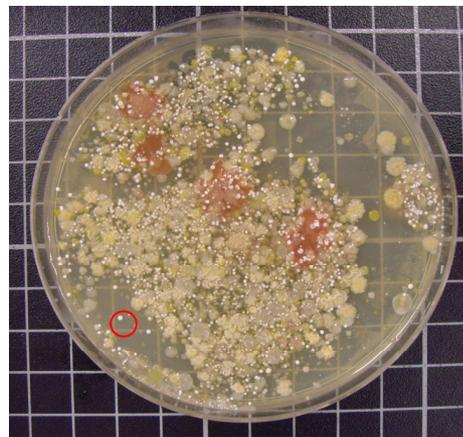


Figura 12: Placa aislado PA.3

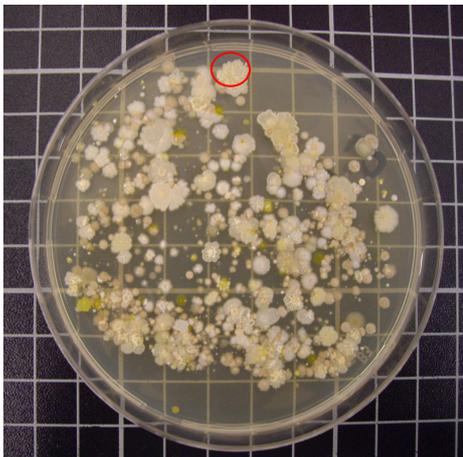


Figura 13: Placa aislado P175

Resultados y Discusión

1.2.- Caracterización fenotípica basada en características morfológicas

Para realizar la caracterización morfológica se realizó una observación macroscópica directa en placa y, posteriormente, una observación microscópica mediante tinción Gram. Además se realizó la prueba de la catalasa. En las tablas 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 11: Descripción macroscópica de los aislados

Aislado	Descripción macroscópica
QB2.1	Colonias pequeñas, rugosas, mates y amarillas
QB8.1	Colonias pequeñas, rugosas, mates y amarillo pálido
P46p	Colonias medianas, mucosas, brillantes y naranjas
P26	Colonias pequeñas, mucosas, brillantes y naranjas
P39, L10	Colonias pequeñas, rugosas, mates y naranjas
QB7.1, QB13.1, QB17.2, QB21.2, QB22.1, J4.1, P1.2, CS3.1, CS6.1, CS8.1, CS8.2, CS9.1, CS9.2, CS12.2, CS16.1, CS18.1, CS20.3, CS21.4, CS24.2, CS25.1, CS27.1, P152	Colonias medianas, rugosas, mates y amarillo pálido
QB19.1, QB19.2, CS10.3	Colonias pequeñas, rugosas, mates y color ocre
CS6.2, CS11.1	Colonias pequeñas, rugosas, mates y naranjas
QB8.2	Colonias pequeñas, rugosas, mates y blancas
P158	Colonias medianas, rugosas, mates y color ocre
QB6.1, QB18.2, P2.3, D11.2, D12.3, CS5.1, CS11.2, CS12.1, CS12.3, CS16.2, CS18.2, CS19.2, CS20.4, CS21.3, CS26.1, CS27.2, CS28.1, CS28.4, Ca10.1, Ca17.1	Colonias pequeñas, rugosas, mates y de color blanco
QB10.1, QB10.2, QB16.1, QB20.1, QB21.1, D8.1, D8.2, CS10.1, CS32.3, Ca22.2	Colonias pequeñas, rugosas, mates y de color amarillo pálido
QB18.1, P2.2, D1.1, D2.2, D7.1, D12.2, D15.1, CS13.1, CS17.3, CS18.3, Ca16.1, P175	Colonias medianas, rugosas, mates y ocre
C2.1, C2.2, LR-4, R1, R5, C5.6	Colonias medianas, rugosas, mates y naranjas
D16.1, CS7.1, CS32.4, P54, P141, D11.1	Colonias pequeñas, rugosas, mates y anaranjadas
Ca9.1	Colonias medianas, rugosas, mates y naranjas
E9, D13.1, D15.2, CS17.1, CS20.2, CS28.3, CS32.1, CS32.2, Ca3.1, Ca21.1, P48b	Colonias pequeñas, rugosas, mates y de color rosa
Ca19.1, Ca27.1, P108	Colonias pequeñas, lisas, mucosas y naranjas
CQG-5a	Colonias pequeñas, lisas, mucosas y amarillas
D6.1, D9.1, P72	Colonias pequeñas, lisas, mucosas y amarillas
D3.2	Colonias medianas, rugosas, mates y amarillo pálido
CS33.1	Colonias pequeñas, rugosas, mates y blancas
C2.3, C5.1a, C5.1b, C4.1, C4.5, PA.2, PB.6, PB.7	Colonias pequeñas, rugosas, mates y ocre
RG4-a, RG4-b	Colonias pequeñas, lisas, mucosas y amarillas
D16.2, Ca7.2	Colonias pequeñas, lisas, mucosas y amarillas
PA.3, PB.1, PB.3, PC.4	Colonias pequeñas, rugosas, mates y blancas
54B, C5.5a, P135	Colonias medianas, lisas, mucosas y naranjas
D1.2	Colonias pequeñas, rugosas, mates y asalmonadas
P1.1, P2.1, D2.3, CS26.2, Ca20.2	Colonias medianas, rugosas, mates y ocre
QB7.2, QB16.2, 8V, CS20.1, P145, N1, N4, N5, N9-1, N17-4	Colonias medianas, rugosas, mates y naranjas
CS10.2	Colonias medianas, rugosas, mates y naranjas
D2.1, P166, L2	Colonias medianas, rugosas, mates y naranjas
QB2.2, N16-9	Colonias medianas, rugosas, mates y naranjas
CS1.1	Colonias pequeñas, lisas, mucosas y asalmonadas

Tabla 12: Descripción microscópica de los aislados

Aislado	Descripción microscópica
QB2.1	Cocos medianos, ovalados y regulares
QB8.1	Bacilos pequeños, gruesos y regulares
P46p	Cocos pequeños redondos y regulares
P26	Cocos pequeños, redondos y regulares
P39, L10	Cocos pequeños, ovalados y regulares
QB7.1, QB13.1, QB17.2, QB21.2, QB22.1, J4.1, P1.2, CS3.1, CS6.1, CS8.1, CS8.2, CS9.1, CS9.2, CS12.2, CS16.1, CS18.1, CS20.3, CS21.4, CS24.2, CS25.1, CS27.1, P152	Bacilos ramificados en ángulo recto
QB19.1, QB19.2, CS10.3	Bacilos pequeños, cortos, estrechos y regulares
CS6.2, CS11.1	Bacilos pequeños, cortos, estrechos y regulares
QB8.2	Bacilos pequeños, gruesos y regulares
P158	Cocobacilos pequeños, estrechos e irregulares
QB6.1, QB18.2, P2.3, D11.2, D12.3, CS5.1, CS11.2, CS12.1, CS12.3, CS16.2, CS18.2, CS19.2, CS20.4, CS21.3, CS26.1, CS27.2, CS28.1, CS28.4, Ca10.1, Ca17.1	Cocos pequeños, redondos y regulares
QB10.1, QB10.2, QB16.1, QB20.1, QB21.1, D8.1, D8.2, CS10.1, CS32.3, Ca22.2	Bacilos pequeños, cortos, gruesos e irregulares
QB18.1, P2.2, D1.1, D2.2, D7.1, D12.2, D15.1, CS13.1, CS17.3, CS18.3, Ca16.1, P175	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
C2.1, C2.2, LR-4, R1, R5, C5.6	Bacilos pequeños, cortos, gruesos y regulares
D16.1, CS7.1, CS32.4, P54, P141, D11.1	Bacilos pequeños, gruesos y regulares
Ca9.1	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
E9, D13.1, D15.2, CS17.1, CS20.2, CS28.3, CS32.1, CS32.2, Ca3.1, Ca21.1, P48b	Cocos pequeños, ovalados y regulares
Ca19.1, Ca27.1, P108	Bacilos pequeños, cortos y regulares
CQG-5a	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
D6.1, D9.1, P72	Cocos pequeños, ovalados e irregulares
D3.2	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
CS33.1	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
C2.3, C5.1a, C5.1b, C4.1, C4.5, PA.2, PB.6, PB.7	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
RG4-a, RG4-b	Bacilos pequeños e irregulares
D16.2, Ca7.2	Cocos pequeños, redondos y regulares
PA.3, PB.1, PB.3, PC.4	Cocobacilos pequeños, cortos y regulares
54B, C5.5a, P135	Bacilos pequeños, cortos, finos y regulares
D1.2	Cocos pequeños, redondos y regulares
P1.1, P2.1, D2.3, CS26.2, Ca20.2	Bacilos pequeños, finos e irregulares
QB7.2, QB16.2, 8V, CS20.1, P145, N1, N4, N5, N9-1, N17-4	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
CS10.2	Bacilos pequeños, estrechos, cortos y regulares
D2.1, P166, L2	Bacilos pequeños, estrechos y regulares
QB2.2, N16-9	Bacilos estrechos, cortos y regulares
CS1.1	Cocos pequeños, ovalados e irregulares

Resultados y Discusión

En las figuras 14,15 y 16 se observan ejemplos de cepas de diferentes géneros:

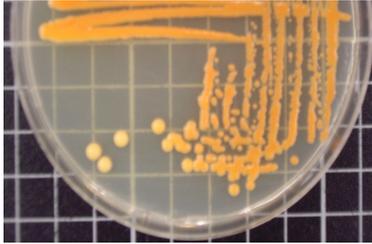


Figura 14: *Rhodococcus ruber* (54B)

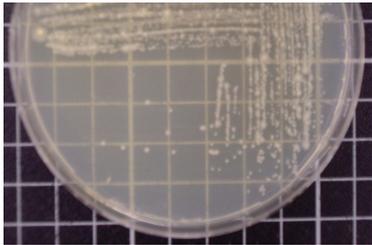


Figura 15: *Mycobacterium smegmatis* (PB.6)

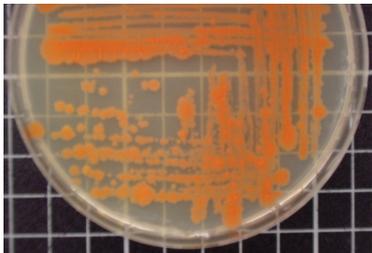


Figura 16: *Gordonia paraffinivorans* (C2.2)

Con la tinción Gram se comprobó que todas las cepas estudiadas eran Gram-positivas. Por último, para la prueba de la catalasa se demostró que todas las cepas estudiadas eran catalasa positivas.

1.3.- Caracterización quimiotaxonómica

Para realizar esta caracterización se utilizan tres marcadores quimiotaxonómicos que definen correctamente a los aislados dentro del suborden *Corynebacterineae*.

En primer lugar se realizó la extracción y análisis de los ácidos micólicos de la pared celular. Con ello se comprueba su pertenencia al suborden, ya que si no poseen estos ácidos no se podrían incluir en él. La segunda prueba realizada fue la determinación de los isómeros del ácido diaminopimélico (DAP). Todas las especies pertenecientes al suborden *Corynebacterineae* deben tener la forma *meso*-DAP. Por último se determinaron los azúcares predominantes de la pared celular. En nuestro caso se debe obtener un tipo de pared celular IV, siendo los constituyentes distintivos mayoritarios arabinosa y galactosa.

A continuación (Tabla 13) se muestran los resultados obtenidos para los tres parámetros tras la separación cromatográfica en placa de celulosa.

Tabla 13: Resultados pruebas quimiotaxonómicas

Aislado	Ácidos micólicos	DAP	Azúcares predominantes
QB2.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB8.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P46p	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P26	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P39	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
L10	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB7.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB13.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB17.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB21.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB22.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
J4.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P1.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS3.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS6.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS8.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS8.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS9.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS9.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS12.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS16.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS18.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS20.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS21.4	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS24.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS25.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS27.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P152	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB19.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB19.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS10.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS6.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS11.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB8.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P158	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB6.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB18.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P2.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D11.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D12.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS5.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS11.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS12.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS12.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS16.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS18.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS19.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS20.4	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa

Resultados y Discusión

Tabla 13 (continuación): Resultados pruebas quimi taxonómicas

Aislado	Ácidos micólicos	DAP	Azúcares predominantes
CS21.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS26.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS27.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS28.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS28.4	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca10.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca17.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB10.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB10.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB16.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB20.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB21.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D8.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D8.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS10.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS32.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca22.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
E9	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB18.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P2.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D1.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D2.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D7.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D12.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D15.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS13.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS17.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS18.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca16.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P175	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C2.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C2.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
LR-4	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
R1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
R5	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C5.6	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D16.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS7.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS32.4	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P54	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P141	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D11.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca9.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D13.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D15.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS17.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS20.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS28.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Cs32.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS32.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca3.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca21.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P48b	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa

Tabla 13 (continuación): Resultados pruebas quimiotaconómicas

Aislado	Ácidos micólicos	DAP	Azúcares predominantes
Ca19.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca27.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P108	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CQG-5a	-	-	-
D6.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D9.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P72	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D3.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS33.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C2.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C5.1a	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C5.1b	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C4.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C4.5	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
PA.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
PB.6	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
PB.7	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
RG4-a	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
RG4-b	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D16.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca7.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
PA.3	-	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
PB.1	-	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
PB.3	-	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
PC.4	-	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
54B	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
C5.5a	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P135	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D1.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P1.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P2.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D2.3	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS26.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
Ca20.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB7.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB16.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
8V	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS20.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P145	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
N1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
N4	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
N5	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
N9-1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
N17-4	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS10.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
D2.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
P166	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
L2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
QB2.2	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
N16-9	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa
CS1.1	+	<i>meso</i> -DAP	Arabinosa y Galactosa

Resultados y Discusión

Como se puede observar en la tabla 13, de las 152 cepas estudiadas, 147 de ellas poseen ácidos micólicos. Las 5 restantes (CQG-5a, PA.3, PB.1, PB.3 y PC.4) pertenecen a subórdenes diferentes al suborden *Corynebacterineae*, sin embargo, debido a la abundancia que mostraron en las placas de aislamiento, así como también a su morfología, se decidió aislarlas y comprobar sus características quimiotaxonómicas. Se utilizó un sistema de separación cromatográfica en capa fina (Figuras 17 y 18). El control positivo que se utilizó fue la cepa *Gordonia amarae* CECT 5704 y el control negativo fue la cepa *Streptomyces albus* CECT 3077, que no posee ácidos micólicos, ambas suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo.

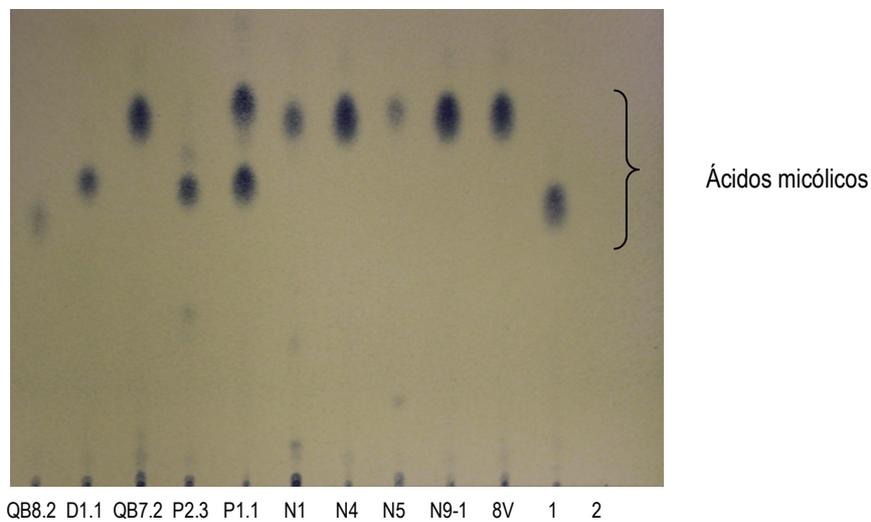


Figura 17: Cromatoplaqa de ácidos micólicos de los aislados QB8.2, D1.1, QB7.2, P2.3, P1.1, N1, N4, N5, N9-1 y 8V. *Gordonia amarae* (CECT 5704) (1) y *Streptomyces albus* (CECT 3051) (2).

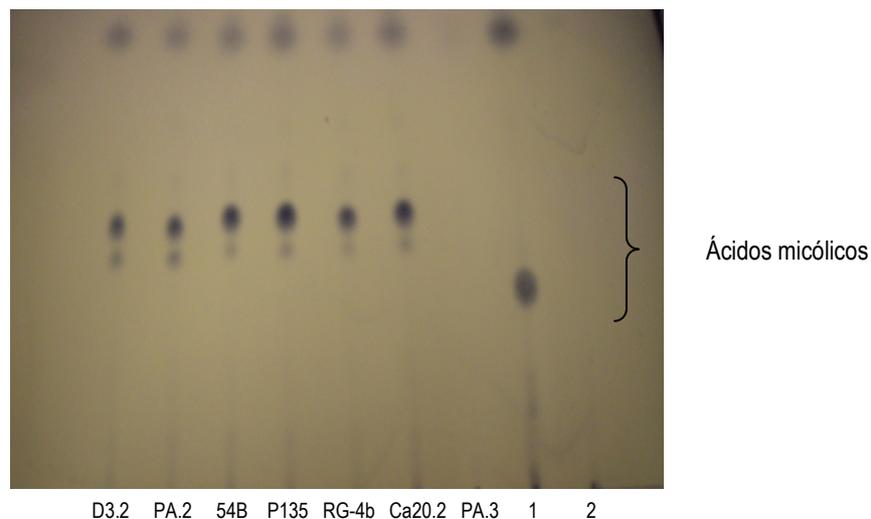


Figura 18: Cromatoplaqa de ácidos micólicos de los aislados D3.2, PA.2, 54B, P135, RG-4b, Ca20.2 y PA.3. *Gordonia amarae* (CECT 5704) (1) y *Streptomyces albus* (CECT 3051) (2).

Tal y como se observa en la tabla 13, de las 152 cepas estudiadas, tan solo 1 no posee la forma *meso*-DAP (CQG-5a). En la figura 19 se observa la forma *meso*-DAP en algunos de los aislados.

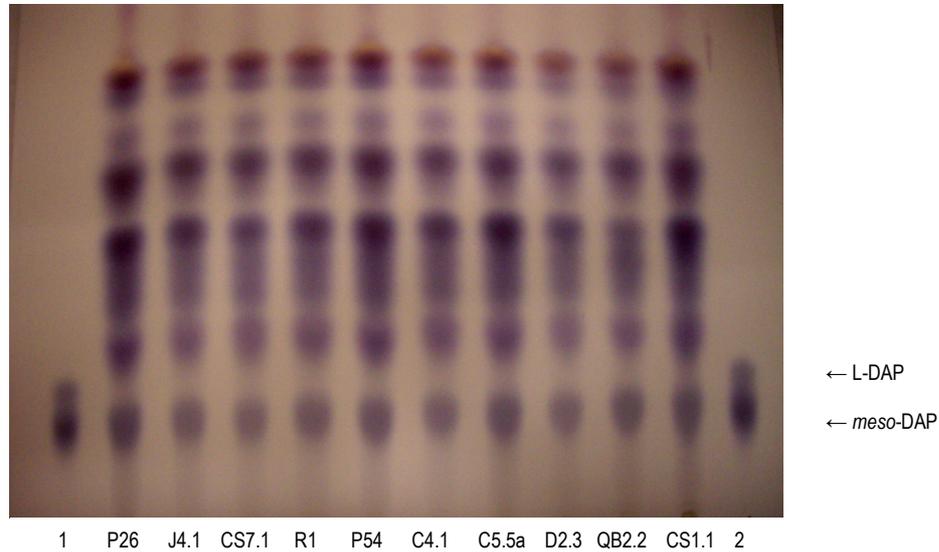


Figura 19: Cromatopla de isómeros del DAP de los aislados P26, J4.1, CS7.1, R1, P54, C4.1, C5.5a, D2.3, QB2.2 y CS1.1. En los extremos (1 y 2) se observan los patrones de las formas L-DAP y *meso*-DAP.

En la determinación de los azúcares se toma como referencia la arabinosa y la galactosa, ya que son estos azúcares los predominantes en la pared celular de los mycolata. Como se observa en la tabla 13 todos los aislados contienen arabinosa y galactosa como azúcares predominantes, a excepción de 1 de ellos (CQG-5a). En la figura 20 se observan los azúcares de algunos de los aislados, arabinosa (color granate) y galactosa (color verdoso).

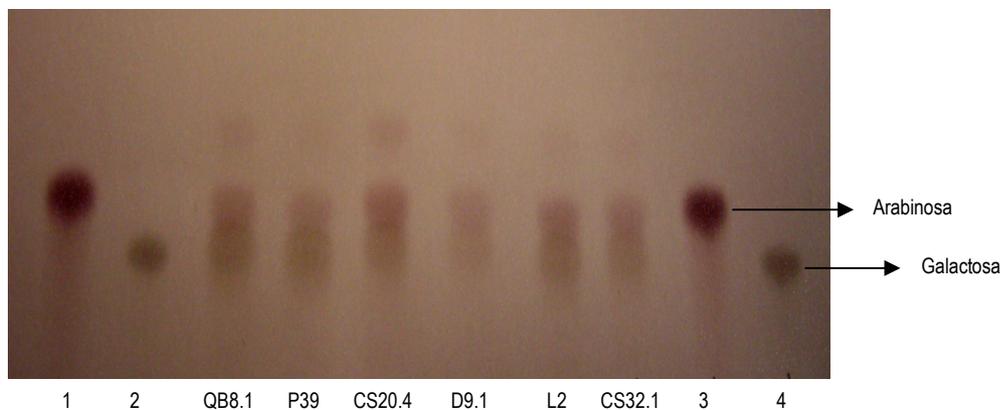


Figura 20: Cromatopla de los azúcares predominantes de los aislados QB8.1, P39, CS20.4, D9.1, L2 y CS32.1. En los extremos (1, 2, 3 y 4) se observan los patrones de arabinosa y galactosa.

Resultados y Discusión

1.4.- Caracterización genotípica

Para extraer el DNA de las cepas aisladas se empleó el método del CTAB, descrito previamente, y un kit de extracción (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la extracción de DNA, se comprobó la cantidad y calidad del mismo antes de llevar a cabo la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Figura 21). Después de realizar la separación electroforética, se procedió a la tinción del gel con bromuro de etidio.

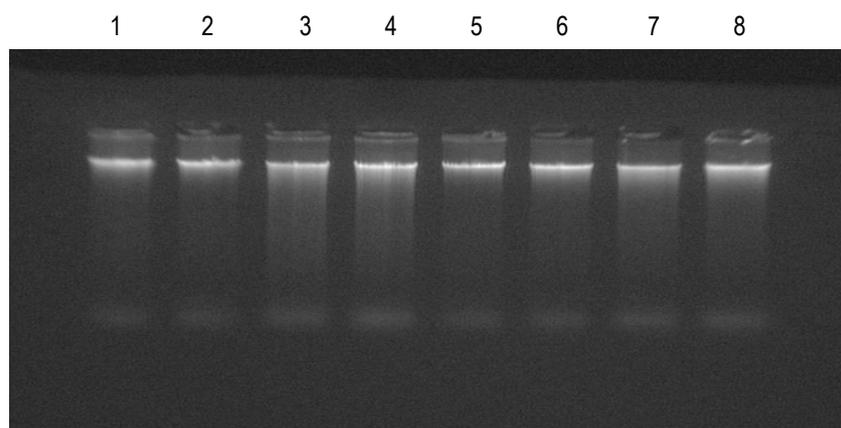


Figura 21: Comprobación extracción DNA.
1: CQG-5a; 2: L10; 3: CS25.1; 4: D7.1; 5: CS27.2; 6: CS32.3; 7: PB.7; 8: PA.3

La extracción se llevó a cabo con éxito para las 152 cepas aisladas. Posteriormente se realizó la PCR de cada una de las cepas. Para todas ellas se comprobó el fragmento amplificado tenía un tamaño aproximado de 1500 pares de bases.

La PCR para cada aislado se realizó por triplicado. Con esto nos asegurábamos la obtención de un volumen suficiente después del proceso de purificación para, posteriormente, llevar a cabo con éxito la secuenciación. La detección de los fragmentos amplificados obtenidos tras la PCR se realizó también mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 22).

Los productos de la PCR se purificaron utilizando el kit de purificación GenElute (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante, y se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Para la realización de las reacciones de secuenciación se utilizó el kit ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction (versión 3.1). Estas reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar en un secuenciador automático “Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer”.

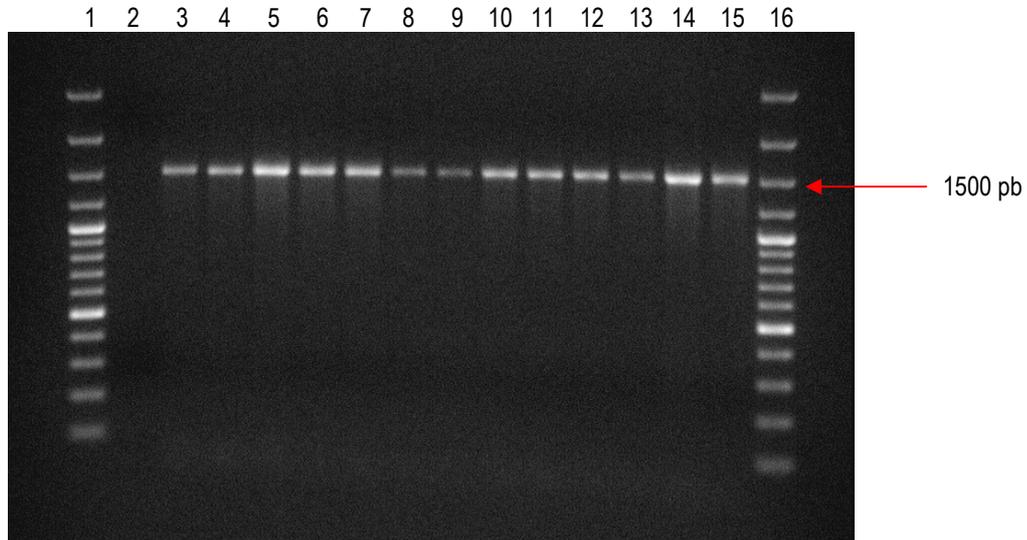


Figura 22: Gel de PCR con los productos de amplificación del 16S rDNA. 1 y 16: Marcador de peso molecular; 2: Blanco sin DNA; 3: P26; 4: QB17.2; 5: P1.2; 6: D1.1; 7: CS5.1; 8: Ca10.1; 9: RG4b; 10: C2.1; 11: C5.6; 12: C4.5; 13: 54B; 14: CS20.1; 15: N16-9

Las secuencias completas, obtenidas con ayuda de los programas informáticos CHROMAS y PHYDIT, se analizaron mediante el programa BLAST (NCBI) para obtener la posible identificación a nivel de especie.

Con estos resultados se obtiene una identificación a nivel de género al 100% y una posible identificación a nivel de especie. Esto es así porque el Blast utiliza un algoritmo muy rápido pero, a la vez, se pierde exactitud en los alineamientos. Para conseguir una identificación a nivel de especie es necesario realizar los respectivos árboles filogenéticos y las matrices de similitud de nucleótidos.

1.4.1.- Árboles filogenéticos y matrices de similitud

Los árboles filogenéticos son el resultado del alineamiento de las secuencias del 16S rDNA de los aislados con las especies validadas de cada género. A partir de ellos se generan las tablas de similitud nucleotídica que nos identifican la cepa a nivel de especie.

Resultados y Discusión

En la tabla 14 se observan los datos de identificación a nivel de especie con su respectivo porcentaje de similaridad. Los resultados marcados en verde poseen un porcentaje menor del 98.70% y los marcados en naranja un porcentaje comprendido entre el 98.70% y el 99%.

De los 152 aislados seleccionados se obtuvieron 9 géneros distintos (*Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y *Williamsia*) y 37 especies diferentes:

- **Género *Corynebacterium*:** *Corynebacterium freneyi* y *Corynebacterium variabile*.
- **Género *Dietzia*:** *Dietzia cercidiphylli* y *Dietzia maris*.
- **Género *Gordonia*:** *Gordonia alkanivorans*, *Gordonia amarae*, *Gordonia araii*, *Gordonia bronchialis*, *Gordonia cholesterolivorans*, *Gordonia effusa*, *Gordonia hirsuta*, *Gordonia hydrophobica*, *Gordonia jacobaea*, *Gordonia malaquae*, *Gordonia paraffinivorans*, *Gordonia polyisoprenivorans*, *Gordonia rhizosphera*, *Gordonia sputi* y *Gordonia terrae*.
- **Género *Microbacterium*:** *Microbacterium lacus*.
- **Género *Mycobacterium*:** *Mycobacterium astroafricanum*, *Mycobacterium fallax*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium vaccae* y *Mycobacterium vanbalenii*.
- **Género *Pseudonocardia*:** *Pseudonocardia assacharolytica*.
- **Género *Rhodococcus*:** *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Rhodococcus zopfii*.
- **Género *Tsukamurella*:** *Tsukamurella pseudospumae*, *Tsukamurella pulmonis*, *Tsukamurella spongiae*, *Tsukamurella spumae*, *Tsukamurella strandjordii* y *Tsukamurella tyrosinosolvens*.
- **Género *Williamsia*:** *Williamsia muralis*.

Tabla 14: Identificación obtenida mediante matrices de similitud de la secuencia del 16S rDNA

Aislado	Identificación	Similitud (%)
QB2.1	<i>Corynebacterium freneyi</i>	99.33 %
QB8.1	<i>Corynebacterium variabile</i>	100 %
P46p	<i>Dietzia cercidiphylli</i>	100 %
P26	<i>Dietzia maris</i>	99.85 %
P39	<i>Gordonia alkanivorans</i>	100 %
L10	<i>Gordonia alkanivorans</i>	99.86 %
QB7.1	<i>Gordonia amarae</i>	99.03 %
QB13.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.82 %
QB17.2	<i>Gordonia amarae</i>	99.04 %
QB21.2	<i>Gordonia amarae</i>	98.95 %
QB22.1	<i>Gordonia amarae</i>	99.04 %
J4.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.82 %
P1.2	<i>Gordonia amarae</i>	98.71 %
CS3.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.75 %
CS6.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.89 %
CS8.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.68 %
CS8.2	<i>Gordonia amarae</i>	99.85 %
CS9.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.66 %
CS9.2	<i>Gordonia amarae</i>	98.89 %
CS12.2	<i>Gordonia amarae</i>	98.75 %
CS16.1	<i>Gordonia amarae</i>	99.03 %
CS18.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.97 %
CS20.3	<i>Gordonia amarae</i>	98.75 %
CS21.4	<i>Gordonia amarae</i>	98.82 %
CS24.2	<i>Gordonia amarae</i>	98.97 %
CS25.1	<i>Gordonia amarae</i>	99.18 %
CS27.1	<i>Gordonia amarae</i>	98.89 %
P152	<i>Gordonia amarae</i>	99.93 %
QB19.1	<i>Gordonia araii</i>	98.00 %
QB19.2	<i>Gordonia araii</i>	97.93 %
CS10.3	<i>Gordonia araii</i>	98.50 %
CS6.2	<i>Gordonia bronchialis</i>	99.78 %
CS11.1	<i>Gordonia bronchialis</i>	99.70 %
QB8.2	<i>Gordonia cholesterolivorans</i>	98.51 %
P158	<i>Gordonia effusa</i>	98.89 %
QB6.1	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
QB18.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
P2.3	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.42 %
D11.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
D12.3	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS5.1	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS11.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS12.1	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.00 %
CS12.3	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS16.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS18.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.72 %
CS19.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.99 %
CS20.4	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.79 %
CS21.3	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.94 %
CS26.1	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS27.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS28.1	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
CS28.4	<i>Gordonia hirsuta</i>	98.01 %
Ca10.1	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.35 %

Resultados y Discusión

Tabla 14 (continuación): Identificación obtenida mediante matrices de similitud de la secuencia del 16S rDNA

Aislado	Identificación	Similaridad (%)
Ca17.1	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.35 %
Ca22.2	<i>Gordonia hirsuta</i>	97.28 %
QB10.1	<i>Gordonia hydrophobica</i>	99.11 %
QB10.2	<i>Gordonia hydrophobica</i>	98.89 %
QB16.1	<i>Gordonia hydrophobica</i>	99.11 %
QB20.1	<i>Gordonia hydrophobica</i>	99.11 %
QB21.1	<i>Gordonia hydrophobica</i>	99.04 %
D8.1	<i>Gordonia hydrophobica</i>	99.10 %
D8.2	<i>Gordonia hydrophobica</i>	99.11 %
CS10.1	<i>Gordonia hydrophobica</i>	97.47 %
CS32.3	<i>Gordonia hydrophobica</i>	99.11 %
QB18.1	<i>Gordonia malaquae</i>	98.15 %
P2.2	<i>Gordonia malaquae</i>	98.08 %
D1.1	<i>Gordonia malaquae</i>	99.25 %
D2.2	<i>Gordonia malaquae</i>	98.08 %
D7.1	<i>Gordonia malaquae</i>	99.26 %
D12.2	<i>Gordonia malaquae</i>	100 %
D15.1	<i>Gordonia malaquae</i>	98.08 %
CS13.1	<i>Gordonia malaquae</i>	98.08 %
CS17.3	<i>Gordonia malaquae</i>	98.75 %
CS18.3	<i>Gordonia malaquae</i>	99.63 %
Ca16.1	<i>Gordonia malaquae</i>	99.63 %
P175	<i>Gordonia malaquae</i>	99.26 %
C2.1	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	99.78 %
C2.2	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	99.78 %
LR-4	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	99.78 %
R1	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	99.78 %
R5	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	99.78 %
C5.6	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	99.78 %
D16.1	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	98.53 %
CS7.1	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	98.53 %
CS32.4	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	98.52 %
P54	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	98.52 %
P141	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	98.52 %
D11.1	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	98.01 %
Ca9.1	<i>Gordonia rhizosphaera</i>	98.66 %
E9	<i>Gordonia sputi / jacobaea</i>	99.00 %
D13.1	<i>Gordonia sputi / jacobaea</i>	99.93 %
D15.2	<i>Gordonia sputi</i>	100 %
CS17.1	<i>Gordonia sputi / jacobaea</i>	99.93 %
CS20.2	<i>Gordonia sputi / jacobaea</i>	99.85 %
CS28.3	<i>Gordonia sputi</i>	99.93 %
CS32.1	<i>Gordonia sputi</i>	100 %
CS32.2	<i>Gordonia sputi / jacobaea</i>	99.93 %
Ca3.1	<i>Gordonia sputi</i>	99.93 %
Ca21.1	<i>Gordonia sputi / jacobaea</i>	99.93 %
P48b	<i>Gordonia sputi</i>	100 %
Ca19.1	<i>Gordonia terrae</i>	99.93 %
Ca27.1	<i>Gordonia terrae</i>	99.93 %
P108	<i>Gordonia terrae</i>	98.97 %
CQG-5a	<i>Microbacterium lacus</i>	99.04 %
D6.1	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	100 %
D9.1	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	100 %
P72	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	100 %
D3.2	<i>Mycobacterium fallax</i>	100 %

Tabla 14 (continuación): Identificación obtenida mediante matrices de similitud de la secuencia del 16S rDNA

Aislado	Identificación	Similitud (%)
CS33.1	<i>Mycobacterium mageritense</i>	100 %
C2.3	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
C5.1a	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
C5.1b	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
C4.1	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
C4.5	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
PA.2	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
PB.6	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
PB.7	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 %
RG4-a	<i>Mycobacterium vaccae</i>	99.48 %
RG4-b	<i>Mycobacterium vaccae</i>	99.48 %
D16.2	<i>Mycobacterium vanbalenii</i>	100 %
Ca7.2	<i>Mycobacterium vanbalenii</i>	100 %
PA.3	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i>	97.48 %
PB.1	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i>	97.47 %
PB.3	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i>	97.47 %
PC.4	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i>	97.47 %
54B	<i>Rhodococcus ruber</i>	100 %
C5.5a	<i>Rhodococcus ruber</i>	100 %
P135	<i>Rhodococcus ruber</i>	99.93 %
D1.2	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	97.78 %
P1.1	<i>Rhodococcus zopfii</i>	100 %
P2.1	<i>Rhodococcus zopfii</i>	98.67 %
D2.3	<i>Rhodococcus zopfii</i>	99.93 %
CS26.2	<i>Rhodococcus zopfii</i>	98.68 %
Ca20.2	<i>Rhodococcus zopfii</i>	98.58 %
QB7.2	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	99.93 %
QB16.2	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	100 %
8V	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	99.93 %
CS20.1	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	100 %
P145	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	100 %
N1	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	99.93 %
N4	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	100 %
N5	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	100 %
N9-1	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	99.93 %
N17-4	<i>T. pseudospumae / spongiae</i>	100 %
CS10.2	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	99.85 %
D2.1	<i>T. spumae / strandjordii</i>	100 %
P166	<i>T. spumae / strandjordii</i>	100 %
L2	<i>T. spumae / strandjordii</i>	99.16 %
QB2.2	<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i>	99.78 %
N16-9	<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i>	99.78 %
CS1.1	<i>Williamsia muralis</i>	99.93 %

En cuanto a los porcentajes de similitud nucleotídica observamos como varían desde el 97.28%, como porcentaje más bajo, hasta el 100%. En la tabla 15 se observan los porcentajes de similitud diferenciados por géneros.

Resultados y Discusión

Tabla 15: Porcentaje de similitud del 16S rDNA diferenciado por géneros

Género	% Similitud (min – max %)
<i>Corynebacterium</i>	99.33 - 100
<i>Dietzia</i>	99.85 - 100
<i>Gordonia</i>	97.28 - 100
<i>Microbacterium</i>	99.04
<i>Mycobacterium</i>	99.48 - 100
<i>Pseudonocardia</i>	97.47 - 97.48
<i>Rhodococcus</i>	97.78 - 100
<i>Tsukamurella</i>	99.16 - 100
<i>Williamsia</i>	99.93

Desde el principio de los años 90, el límite con que un par de especies se podían considerar la misma especie correspondía a un 97% como valor mínimo. Sin embargo, estudios realizados por Stackebrandt y Ebers (2006) demuestran que este porcentaje no es el idóneo y lo elevan casi un 2%, hasta llegar a valores comprendidos entre 98.70% y 99%, debido a que porcentajes de similitud nucleotídica menores al 98.5% correspondían a porcentajes menores del 70% en la hibridación DNA:DNA. Si ese porcentaje de hibridación DNA:DNA es inferior se puede afirmar que ese par de especies corresponden a especies diferentes (Figura 23).

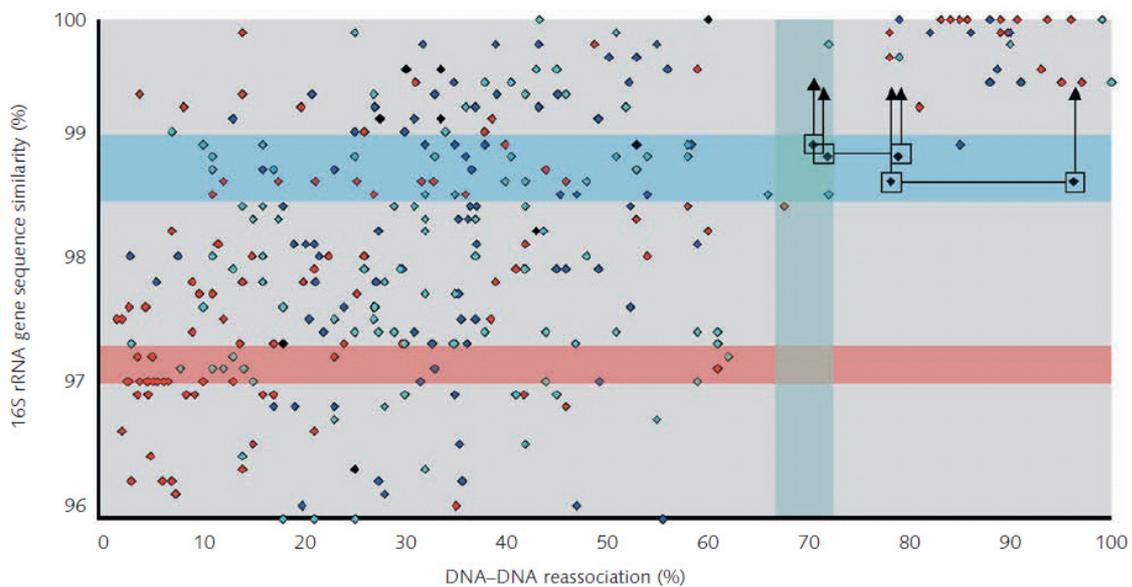


Figura 23: Comparación de la similitud de las secuencias del gen 16S rDNA y los valores de hibridación DNA:DNA (Stackebrandt y Ebers, 2006)

Es por ello que observando la tabla 14 podemos decir que, atendiendo a este criterio, 65 especies podrían ser consideradas como nuevas especies. Las marcadas en verde (48 especies) poseen un porcentaje menor del 98.70% y las marcadas en naranja (17 especies)

poseen un porcentaje comprendido entre el 98.70% y el 99%. Para comprobar esta hipótesis se debería realizar una hibridación DNA:DNA y diversas pruebas confirmatorias tales como menaquinonas, ácidos grasos, lípidos polares, contenido en G + C y diferentes tests fenotípicos que diferenciaran el aislado de la especie de referencia filogenéticamente más próxima.

1.4.1.1.- Género *Corynebacterium*

Mediante el programa PHYDIT se ha construido el árbol filogenético del género *Corynebacterium*, que actualmente cuenta con 85 especies validadas (Anexo 4). Este programa realiza un alineamiento múltiple, esto es, un alineamiento entre las secuencias de las cepas de estudio y las secuencias de las especies validadas del género, para lograr alcanzar la máxima similitud entre ellas. Esto se logra introduciendo *gaps* o huecos que representan sustituciones, inserciones o deleciones ocurridas durante el proceso evolutivo y así obtener un modelo hipotético para explicar este tipo de mutaciones ocurridas durante la evolución. Sin embargo, no es posible saber incuestionablemente cual es el mejor alineamiento.

El out-group o raíz es una secuencia relacionada con las secuencias objeto de análisis de la cual sabemos que presenta una mayor divergencia evolutiva. La inclusión de un out-group permite mejorar la capacidad predictiva del árbol siempre y cuando la divergencia evolutiva no sea excesiva. En nuestro caso la secuencia del 16S rDNA de *Turicella otitidis* (X73976) es la elegida, debido a que es una bacteria coreniforme próxima a los aislados estudiados pero lo suficientemente alejada como para dar validez al árbol filogenético. Además se han incluido todas las especies tipo de las familias que componen el suborden *Corynebacterineae* para así mostrar la posición de este género con respecto a los demás y dar, más aún si cabe, validez al árbol filogenético.

La técnica de bootstrapping consiste en remuestrear las secuencias analizadas mediante la combinación aleatoria de distintas columnas y la generación de nuevos alineamientos y árboles. Un valor de "bootstrap" > 70% suele considerarse significativo. El "bootstrap" utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%).

Los números de secuencia ("accession numbers") se muestran en paréntesis. La escala del árbol filogenético indica 0.1 sustituciones por posición de nucleótido, esto es, nos indica los cambios que han sucedido a través del tiempo en una zona determinada de la secuencia.

Resultados y Discusión

La figura 24 muestra el árbol filogenético parcial del género *Corynebacterium* basado en las secuencias del 16S rDNA obtenido mediante el método del Neighbour-Joining, que es un método que utiliza matrices de distancia, esto es, crea los árboles filogenéticos en función de las distancias genéticas entre las secuencias de estudio, obteniendo los resultados en función del “vecino más cercano”. En este árbol se muestra la posición de las cepas QB2.1 (*Corynebacterium freneyi*) y QB8.1 (*Corynebacterium variabile*) con respecto a sus parientes filogenéticos más cercanos.

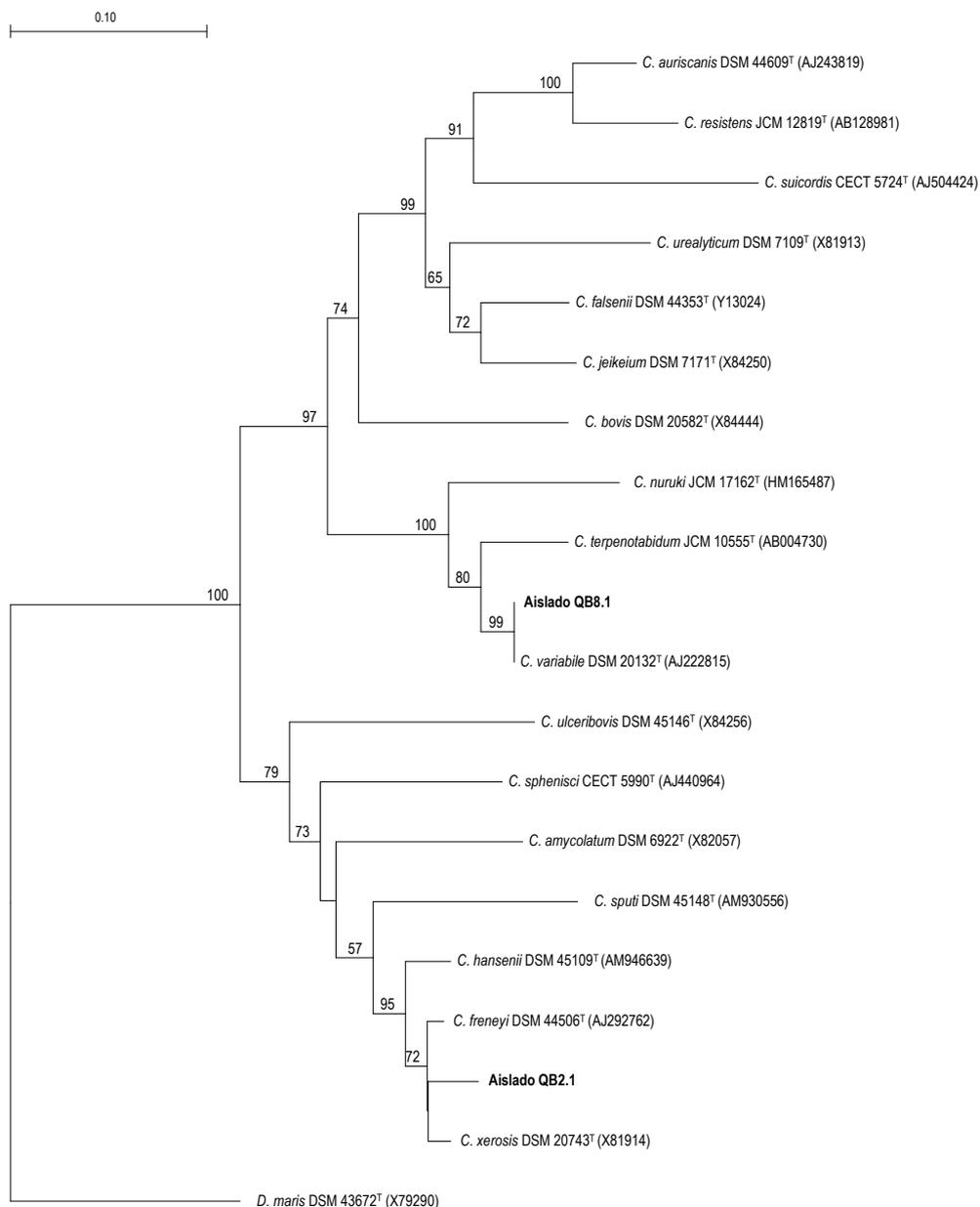


Figura 24: Árbol filogenético parcial del género *Corynebacterium* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Analizando ya el árbol, observamos que la cepa QB8.1 forma un único cluster con *Corynebacterium variabile*, siendo el porcentaje de similitud nucleotídica del 100% y 0 el número de nucleótidos diferentes para un total de 1353.

Para la cepa QB2.1 podemos observar que los parientes filogenéticos más cercanos son *Corynebacterium freneyi*, *Corynebacterium xerosis* y *Corynebacterium hansenii*. Sin embargo, la matriz de similitud nos indica que su pariente filogenético más próximo es *Corynebacterium freneyi* con un porcentaje de similitud del 99.33%, siendo 9 el número de nucleótidos diferentes para un total de 1351.

1.4.1.2.- Género *Dietzia*

Para el género *Dietzia*, que cuenta con 12 especies validadas, encontramos dos aislados, P26 (*Dietzia maris*) y P46p (*Dietzia cercidiphylli*). El árbol filogenético completo del género se muestra en el anexo 5, obtenido igualmente por el método del Neighbour-Joining.

De igual modo que en el género anterior la secuencia del 16S rDNA de *Turicella otitidis* (X73976) se utiliza como out-group o raíz del árbol y se muestran las especies tipo de las familias correspondientes al suborden al que pertenecen todos los aislados.

Los números de secuencia ("accession numbers") se muestran entre paréntesis. El "bootstrap" utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Analizando el árbol parcial (figura 25) observamos que la cepa P46p está filogenéticamente próxima a *Dietzia cercidiphylli*, *Dietzia natronolimnaea* y *Dietzia psychralcaliphila*. Sin embargo, la matriz de similitud indica que esta cepa corresponde a *Dietzia cercidiphylli* con un porcentaje de similitud del 100% y 0 nucleótidos diferentes para un total de 1351. Si nos fijamos en el cluster formado por estas tres especies junto con el aislado P46p, observamos como la escala, esto es, el número de sustituciones nucleotídicas a lo largo del tiempo, es menor con *Dietzia cercidiphylli* que con las otras dos especies.

Para la cepa P26, se observa un cluster formado por ésta y las especies *Dietzia kunjamensis*, *Dietzia maris*, y *Dietzia schimae*. Lo que nos indica la matriz de similitud

Resultados y Discusión

nucleotídica es que la cepa P26 muestra una mayor similaridad (99.85%) con *Dietzia maris* que con las otras dos y que el número de nucleótidos diferentes es de 2 sobre un total de 1351. Al igual que ocurría con el aislado anterior, la escala del árbol nos muestra como nuestra cepa de estudio está más próxima filogenéticamente a la especie con mayor porcentaje de similaridad que con respecto a las otras 2.

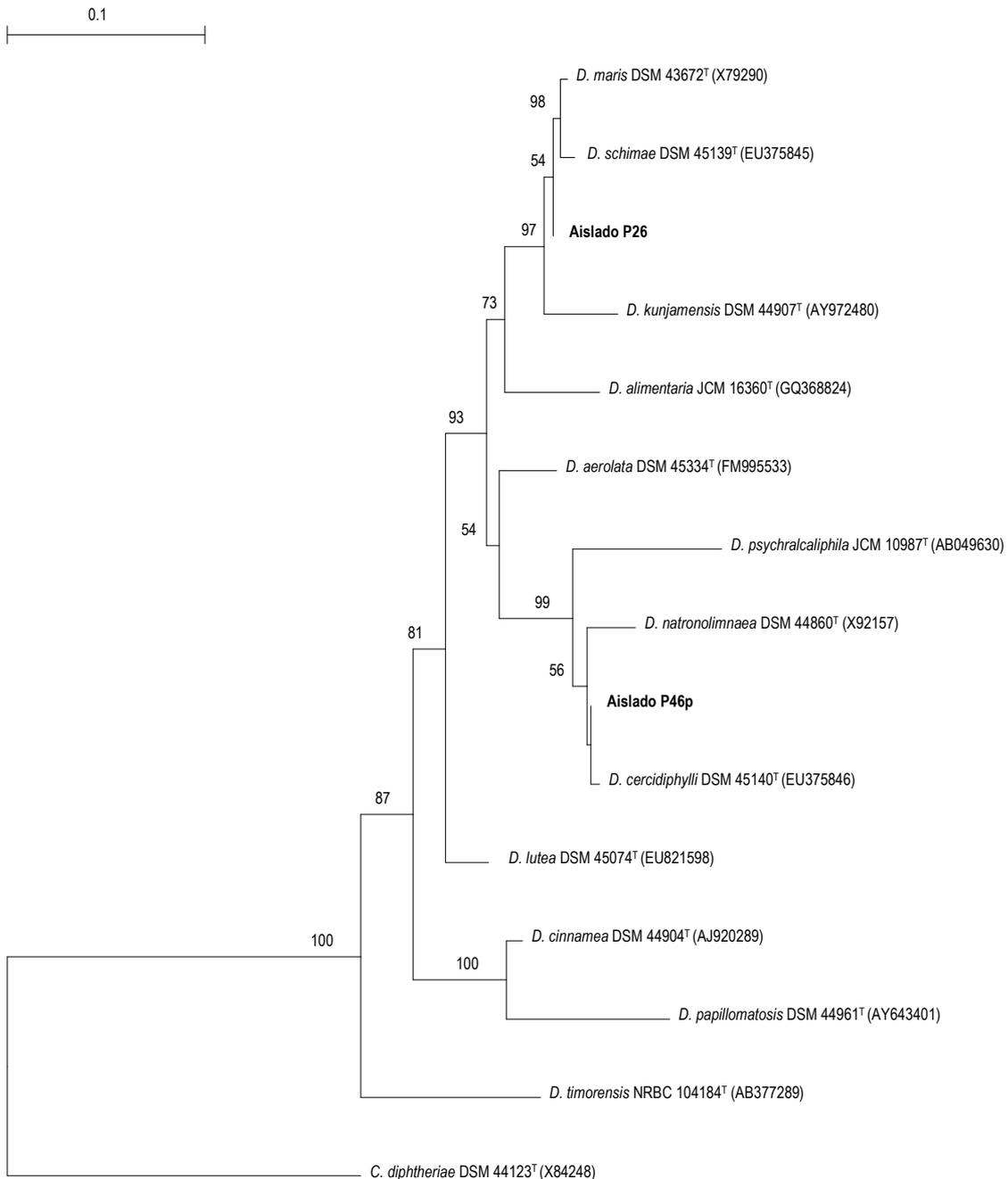


Figura 25: Árbol filogenético parcial del género *Dietzia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

1.4.1.3.- Género *Gordonia*

Para este género se obtuvieron 100 aislados. El árbol filogenético completo del género, con 33 especies validadas, se muestra en el anexo 6, obtenido igualmente por el método del Neighbour-Joining.

La secuencia del 16S rDNA de *Turicella otitidis* (X73976) se utiliza como out-group y están incluidas todas las especies tipo de las familias correspondientes al suborden al que pertenecen todos los aislados.

Los números de secuencia ("accession numbers") se muestran entre paréntesis. El "bootstrap" utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Las cepas P39 y L10 forman un cluster con la especie *Gordonia alkanivorans*. El porcentaje de similitud es idéntico para ambos aislados (99.93%), mostrando un nucleótido diferente de un total de 1347.

Las cepas CS3.1, CS6.1, CS8.1, CS8.2, CS9.1, CS9.2, CS12.2, CS16.1, CS18.1, CS20.3, CS21.4, CS24.2, CS25.1, CS27.1, J4.1, P1.2, P152, QB7.1, QB13.1, QB17.2, QB21.2 y QB22.1 forman un único cluster con *Gordonia amarae*. Podemos observar como 2 cepas (CS8.1 y CS9.1) no cumplen los requisitos propuestos por Stackebrandt y Ebers (2006) y que 14 de ellas (CS3.1, CS6.1, CS9.2, CS12.2, CS18.1, CS20.3, CS21.4, CS24.2, CS27.1, J4.1, P1.2, QB13.1 y QB21.2) se encuentran en el límite de dicho criterio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16.

Gordonia araii forma un cluster con las cepas CS10.3, QB19.1 y QB19.2, siendo los porcentajes de similitud del 98.50%, 98.00% y 97.93% respectivamente, con lo que estaríamos ante tres posibles especies nuevas. El número de nucleótidos diferentes es de 20 sobre 1344 para la cepa CS10.3, 27 sobre 1352 para la cepa QB19.1 y de 28 sobre 1352 para la cepa QB19.2.

Las cepas CS6.2 y CS11.1 forman un único cluster con *Gordonia bronchialis*, siendo los porcentajes de similitud del 99.78% y 99.70% respectivamente. La cepa CS6.2 tiene 3

Resultados y Discusión

nucleótidos diferentes sobre un total de 1357 y la cepa CS11.1 tiene 4 nucleótidos diferentes sobre 1355.

Tabla 16: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a *Gordonia amarae*

Aislado	Similaridad	Nucleótidos ≠
CS3.1	98.75 %	17 / 1356
CS6.1	98.89 %	15 / 1354
CS8.1	98.68 %	18 / 1360
CS8.2	99.85 %	2 / 1358
CS9.1	98.66 %	18 / 1348
CS9.2	98.89 %	15 / 1354
CS12.2	98.75 %	17 / 1357
CS16.1	99.03 %	13 / 1347
CS18.1	98.97 %	14 / 1355
CS20.3	98.75 %	17 / 1358
CS21.4	98.82 %	16 / 1352
CS24.2	98.97 %	14 / 1355
CS25.1	99.18 %	11 / 1339
CS27.1	98.89 %	15 / 1354
J4.1	98.82 %	16 / 1355
P1.2	98.71 %	12 / 1345
P152	99.93 %	1 / 1354
QB7.1	99.03 %	13 / 1346
QB13.1	98.82 %	11 / 1351
QB17.2	99.04 %	13 / 1350
QB21.2	98.95 %	14 / 1337
QB22.1	99.04 %	13 / 1356

Gordonia cholesterolivorans, *Gordonia hydrophobica*, *Gordonia neofelifaecis* y *Gordonia sihwensis* forman un cluster con la cepa QB8.2. Sin embargo, el porcentaje de similitud nucleotídica nos indica que la especie a la que está más próxima, filogenéticamente hablando, es *Gordonia cholesterolivorans* con un porcentaje del 98.51%, con lo que podríamos estar ante una posible especie nueva. El número de nucleótidos diferentes es de 20 sobre un total de 1343.

La cepa P158 forma un único cluster con *Gordonia effusa* y, pese a ello, el porcentaje de similitud es del 98.89%, límite en el cual podríamos estar hablando de una especie nueva. 15, sobre un total de 1353, son los nucleótidos que diferencian la especie aislada de la especie con la cual se ha identificado.

Un total de 22 aislados (Ca10.1, Ca17.1, Ca22.2, CS5.1, CS10.1, CS11.2, CS12.1, CS12.3, CS16.2, CS18.2, CS19.2, CS20.4, CS21.3, CS26.1, CS27.2, CS28.1, CS28.4, D11.2, D12.3, P2.3, QB6.1 y QB18.2) forman un único cluster con *Gordonia hirsuta*. Los porcentajes de similitud y número de nucleótidos diferentes se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a *Gordonia hirsuta*

Aislado	Similaridad	Nucleótidos ≠
Ca10.1	97.35 %	36 / 1356
Ca17.1	97.35 %	36 / 1356
Ca22.2	97.28 %	37 / 1359
CS5.1	98.01 %	27 / 1356
CS10.1	97.39 %	35 / 1342
CS11.2	98.01 %	27 / 1356
CS12.1	98.00 %	27 / 1352
CS12.3	98.01 %	27 / 1355
CS16.2	98.01 %	27 / 1354
CS18.2	97.72 %	31 / 1362
CS19.2	97.99 %	27 / 1345
CS20.4	97.79 %	30 / 1357
CS21.3	97.94 %	28 / 1356
CS26.1	98.01 %	27 / 1356
CS27.2	98.01 %	27 / 1356
CS28.1	98.01 %	27 / 1356
CS28.4	98.01 %	27 / 1356
D11.2	98.01 %	27 / 1356
D12.3	98.01 %	27 / 1356
P2.3	97.42 %	35 / 1358
QB6.1	98.01 %	27 / 1356
QB18.2	98.01 %	27 / 1358

Si observamos la tabla 17 veremos como los porcentajes de similitud no cumplen con los requisitos para ser la misma especie, por tanto podríamos considerarlas como especies nuevas a falta de un estudio más profundo.

También hay que destacar que, pese a que la cepa CS10.1 está incluida en el árbol en el cluster de *Gordonia hirsuta*, el porcentaje de similitud con *Gordonia hydrophobica* (97.47%) es mayor que el porcentaje con *Gordonia hirsuta* (97.39%). Realmente, al estar muy por debajo del umbral propuesto por Stackebrandt y Ebers (2006), no debe suponernos un problema en saber si es una especie u otra ya que, con toda seguridad, se trata de una especie nueva.

Gordonia cholesterolivorans, *Gordonia hydrophobica*, *Gordonia neofelifaecis* y *Gordonia sihwensis* forman un cluster con las cepas CS32.3, D8.1, D8.2, QB10.1, QB10.2, QB16.1, QB20.1, QB21.1. Los porcentajes de similitud indican que estos aislados pertenecen a la especie *Gordonia hydrophobica*, siendo los porcentajes de similitud del 99.11%, 99.10%, 99.11%, 99.11%, 98.89%, 99.11%, 99.11% y 99.04% respectivamente. Como hemos comentado anteriormente la cepa CS10.1 que forma grupo con los aislados de *Gordonia hirsuta* posee un porcentaje del 97.47% con *Gordonia hydrophobica* por lo que se consideraría especie nueva.

Resultados y Discusión

Los nucleótidos diferentes son, respectivamente, 12 / 1345, 12 / 1339, 12 / 1354, 12 / 1354, 15 / 1351, 12 / 1355, 12 / 1354 y 13 / 1354.

Las cepas Ca3.1, Ca21.1, CS17.1, CS20.2, CS28.3, CS32.1, CS32.2, D13.1, D15.2, E9 y P48b forman un cluster con las especies *Gordonia jacobaea*, *Gordonia aichiensis* y *Gordonia sputi*. Sin embargo, los porcentajes de similaridad indican que los aislados pertenecen a la especie *G. sputi* y, en algunos casos, poseen el mismo porcentaje entre ésta y *G. jacobaea*. De forma aclaratoria, en la tabla 18 se pueden observar los resultados ya que, en este caso como se ha dicho anteriormente, existen varias cepas (*) que poseen el mismo porcentaje de similaridad nucleotídica con *G. jacobaea* que con *G. sputi*. Para saber con seguridad qué especie es cada cepa se debería hacer una hibridación DNA:DNA y comprobar qué porcentaje es el más elevado.

Tabla 18: Porcentaje de similaridad del 16S rDNA respecto a *G. jacobaea* y *G. sputi*

Aislado	Similaridad	Nucleótidos ≠
Ca3.1	99.93 %	1 / 1358
Ca21.1 *	99.93 %	1 - 1 / 1357
CS17.1 *	99.93 %	1 - 1 / 1357
CS20.2 *	99.85 %	2 - 2 / 1357
CS28.3	99.93 %	1 / 1357
CS32.1	100 %	0 / 1357
CS32.2 *	99.93 %	1 - 1 / 1358
D13.1 *	99.93 %	1 - 1 / 1357
D15.2	100 %	0 / 1357
E9 *	99.00 %	14 - 14 / 1405
P48b	100 %	0 / 1355

Gordonia malaquae forma un cluster con las cepas Ca16.1, CS13.1, CS17.3, CS18.3, D1.1, D2.2, D7.1, D12.2, D15.1, P2.2, P175 y QB18.1, siendo los porcentajes de similaridad los que se detallan en la tabla 19. Tal y como se observa en la tabla, 5 aislados (CS13.1, D2.2, D15.1, P2.2, y QB18.1) podrían ser nuevas especies y 1 aislado (CS17.3) estaría en el límite propuesto.

Los aislados C2.1, C2.2, C5.6, LR-4, R1 y R5 forman un cluster con la especie *Gordonia paraffinivorans*. El porcentaje de similaridad para todos ellos es de 99.78% y el número de nucleótidos diferentes es de 3 sobre un total 1340. El aislado C5.6 proviene de una planta depuradora diferente al resto, por tanto, podríamos considerar a las demás como la misma cepa al provenir todas de la misma estación depuradora.

Tabla 19: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a *Gordonia malaquae*

Aislado	Similaridad	Nucleótidos #
Ca16.1	99.63 %	5 / 1356
CS13.1	98.08 %	26 / 1354
CS17.3	98.75 %	17 / 1355
CS18.3	99.63 %	5 / 1349
D1.1	99.25 %	10 / 1342
D2.2	98.08 %	26 / 1352
D7.1	99.26 %	10 / 1351
D12.2	100 %	0 / 1339
D15.1	98.08 %	26 / 1354
P2.2	98.08 %	26 / 1354
P175	99.26 %	10 / 1351
QB18.1	98.15 %	25 / 1354

Las cepas CS7.1, CS32.4, D16.1, P54 y P141 forman un cluster (ver Anexo 6) con la especie *Gordonia polyisoprenivorans*, siendo los porcentajes de similitud del 98.53% y 20 nucleótidos diferentes de un máximo de 1354 aproximadamente.

La cepa D11.1, pese a que forma un cluster con *Gordonia sinesedis*, posee un porcentaje de similitud más alto con respecto a *Gordonia polyisoprenivorans* (98.01% y 27 nucleótidos diferentes de un total de 1353) que con respecto a *Gordonia sinesedis* (97.19% y 38 nucleótidos diferentes de un total de 1354). Sin embargo, al estar estos porcentajes por debajo del límite propuesto en 2006, estaríamos hablando de una posible especie nueva.

La especie *Gordonia rhizosphaera* forma un cluster con el aislado Ca9.1, siendo el porcentaje de similitud del 98.66% y 18 los nucleótidos diferentes. Para comprobar si es esa especie se debería hacer una hibridación DNA:DNA.

Por último, las cepas Ca19.1, Ca27.1 y P108 forman un cluster con la especie *Gordonia lacunae* y con la especie *Gordonia terrae*. Sin embargo, la matriz de similitud indica que pertenecen a la segunda, *Gordonia terrae*, con 99.93%, 99.93% y 98.97% de similitud respectivamente. Los nucleótidos diferentes fueron 1 sobre 1348 para Ca19.1, 1 sobre 1362 para Ca27.1 y 14 sobre 1356 para P108, siendo esta última cepa una posible especie nueva a la que deberíamos realizar una hibridación DNA:DNA.

En las figuras 26 y 27 podemos observar los árboles parciales para el género *Gordonia* y así tener una mayor comprensión acerca de los resultados obtenidos.

Resultados y Discusión

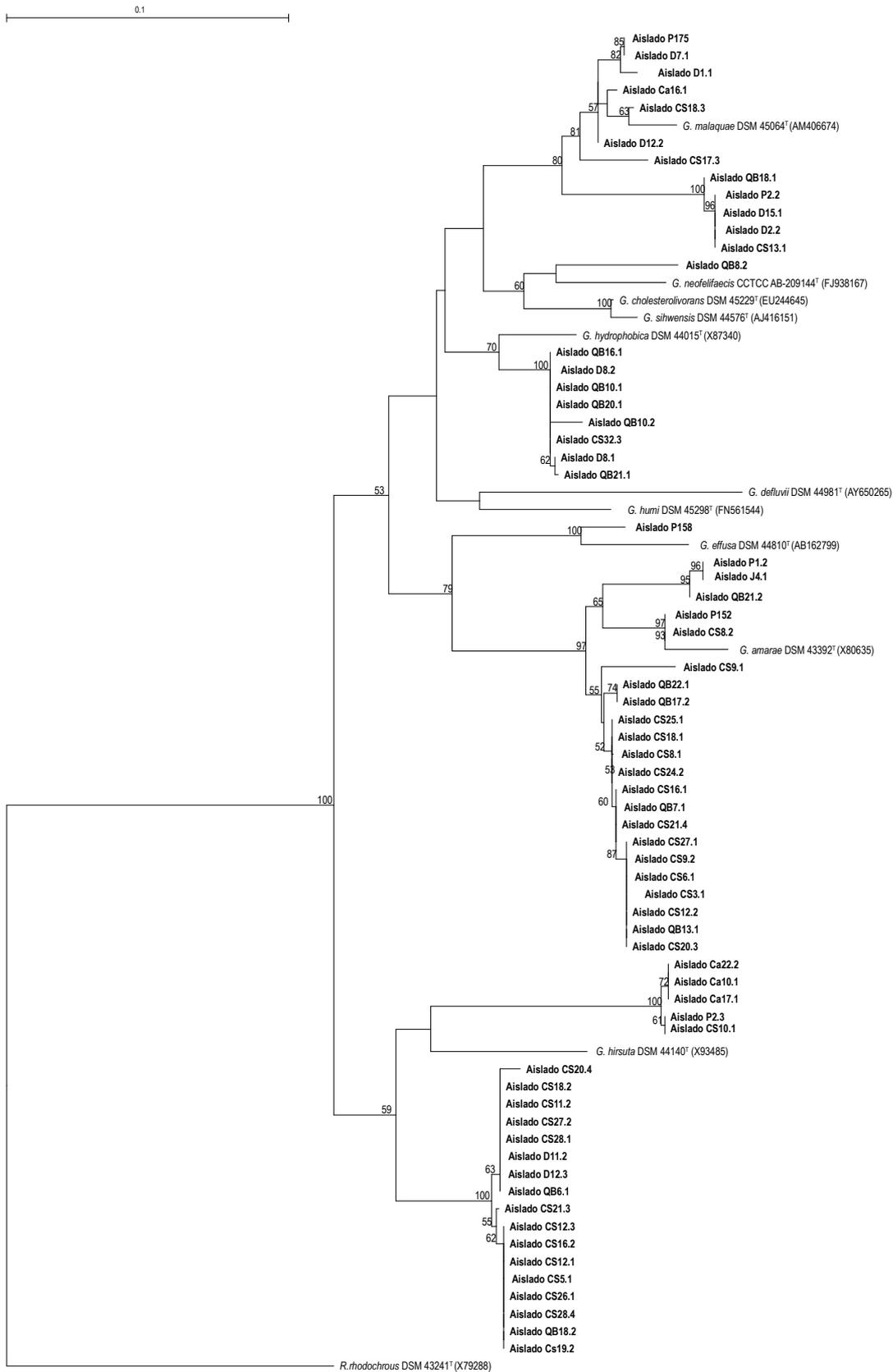


Figura 26: Árbol filogenético parcial (I) del género *Gordonia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

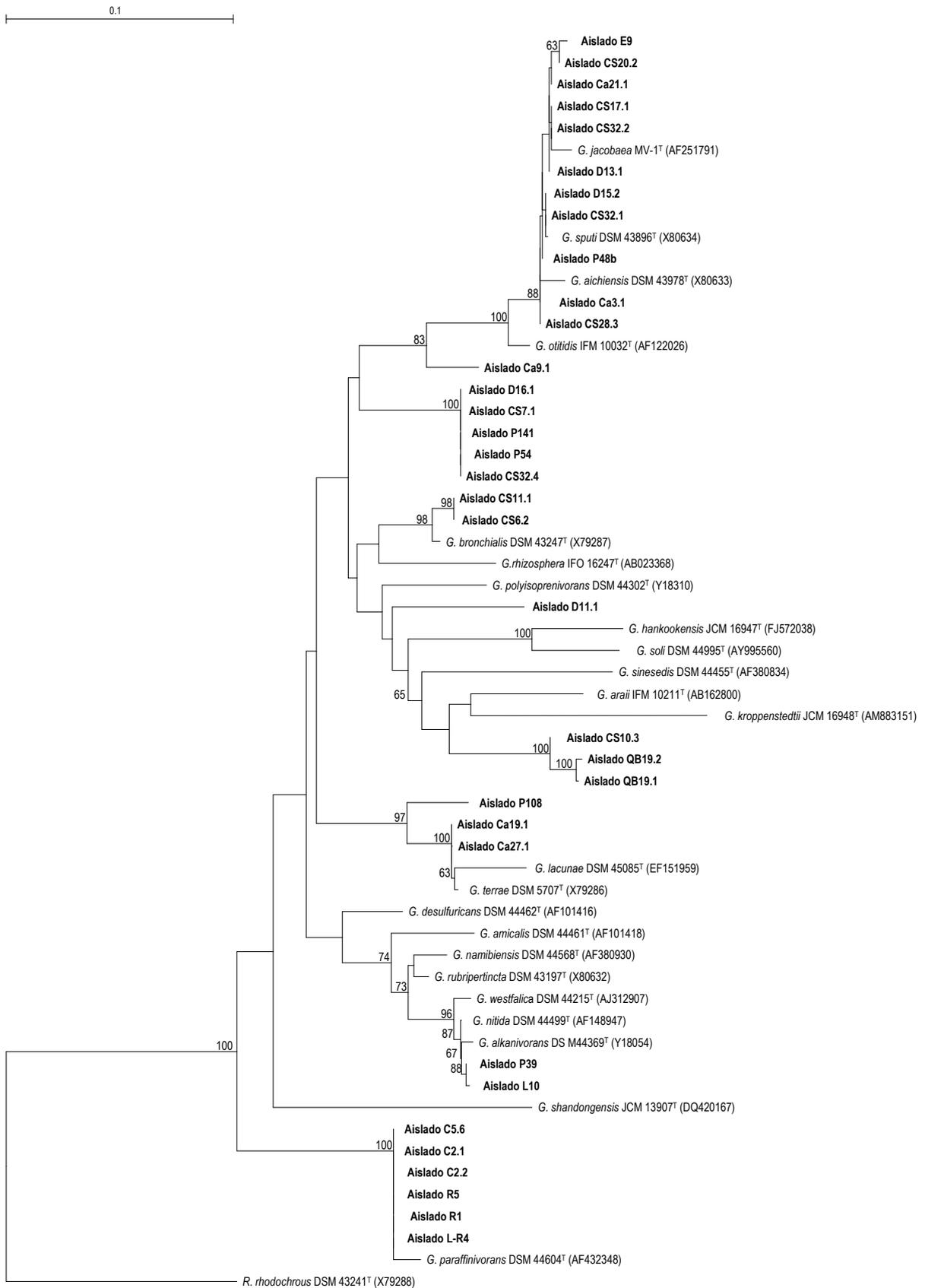


Figura 27: Árbol filogenético parcial (II) del género *Gordonia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Resultados y Discusión

1.4.1.4.- Género *Microbacterium*

El árbol filogenético completo, obtenido mediante el método del Neighbour-Joining, del género *Microbacterium*, que actualmente cuenta con 72 especies validadas, se muestra en el Anexo 7. El árbol parcial, para una mayor comprensión, se muestra en la figura 28. En este árbol encontramos únicamente 1 aislado, el CQG-5a (*Microbacterium lacus*).

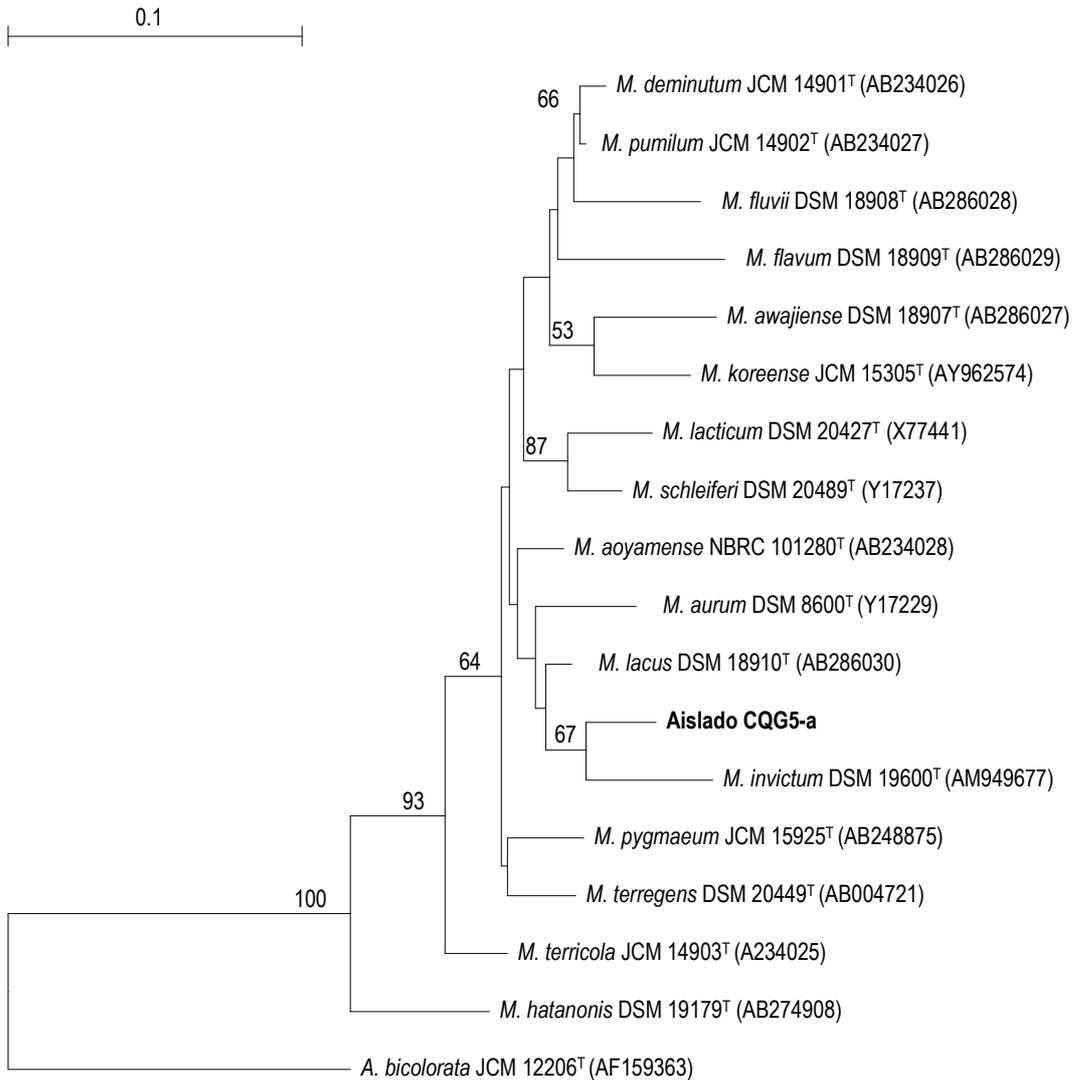


Figura 28: Árbol filogenético parcial del género *Microbacterium* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

La secuencia del 16S rDNA de *Agreia bicolorata* (AF159363) se utiliza como out-group o raíz del árbol. Los números de secuencia (“accession numbers”) se muestran entre paréntesis. El

“bootstrap” utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

En el árbol observamos como la cepa de estudio, CGQ-5a, forma un cluster con *Microbacterium invictum* con un porcentaje de similitud del 98.75% y 17 nucleótidos diferentes de un total de 1356. Sin embargo, el porcentaje de similitud más próximo dado por la matriz es con la especie *Microbacterium lacus* con 99.04% y 13 nucleótidos diferentes de un total de 1355.

El porcentaje de similitud con cualquiera de las especies es bastante bajo por lo que sería conveniente realizar la hibridación DNA:DNA con las especies con las que tenga mayor porcentaje ya que podríamos estar hablando de una posible especie nueva.

1.4.1.5.- Género *Mycobacterium*

Actualmente este género cuenta con un total de 145 especies validadas. En el árbol filogenético de este género (Anexo 8), obtenido por el método del Neighbour-Joining, se muestran los 17 aislados que se encontraron en los diferentes muestreos.

La secuencia del 16S rDNA de *Turicella otitidis* (X73976) se utiliza como out-group y están incluidas todas las especies tipo de las familias correspondientes al suborden al que pertenecen todos los aislados.

Los números de secuencia (“accession numbers”) se muestran entre paréntesis. El “bootstrap” utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

En la figura 29 se observa que *Mycobacterium austroafricanum* forma un cluster con las cepas D6.1, D9.1 y P72. El porcentaje de similitud de los tres aislados con respecto a esa especie es del 100%, siendo 0, de un total de 1356, el número de nucleótidos diferentes.

La cepa D3.2 forma un único cluster con *Mycobacterium fallax*, siendo el porcentaje de similitud del 100% y, obviamente, el número de nucleótidos diferentes es de 0 sobre un total de 1351.

Resultados y Discusión

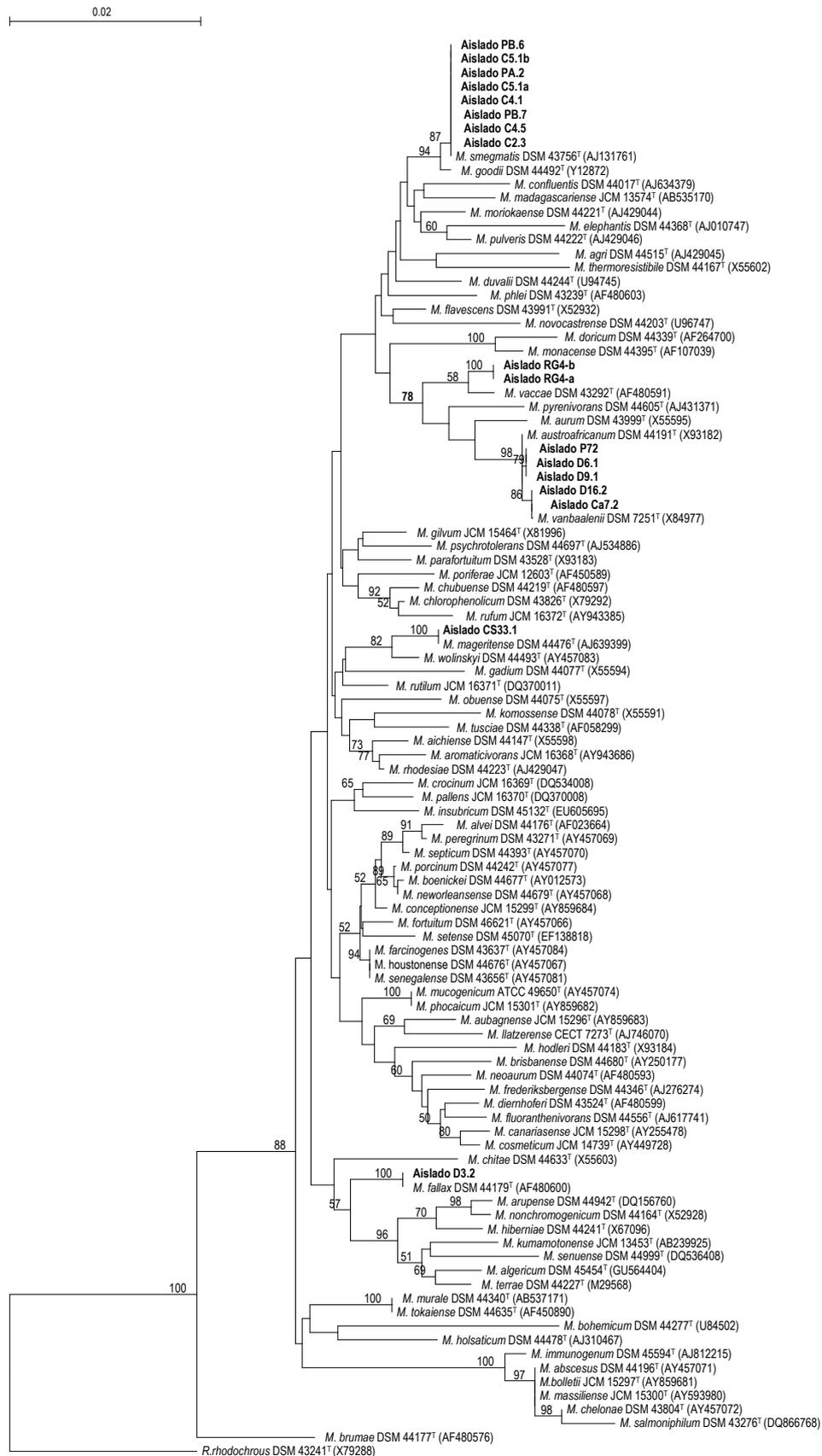


Figura 29: Árbol filogenético parcial del género *Mycobacterium* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

La cepa CS33.1 forma un único cluster con *Mycobacterium mageritense*, siendo el porcentaje de similitud del 100% y, obviamente, el número de nucleótidos diferentes es de 0 sobre un total de 1340.

Mycobacterium smegmatis, forma un cluster con los aislados C2.3, C4.1, C4.5, C5.1a, C5.1b, PA.2, PB.6 y PB7. El porcentaje de similitud con todas ellas es del 100% y 0 el número diferente de nucleótidos.

Las cepas RG4-a y RG4-b poseen un porcentaje de similitud del 99.48 con respecto a *Mycobacterium vaccae*, con la cual forman un cluster. El número diferente de nucleótidos es de 9 sobre 1347 para RG4-a y de 9 sobre 1356 para RG4-b.

Por último, la especie *Mycobacterium vanbaalenii* forma un cluster con los aislados Ca7.2 y D16.2, siendo el porcentaje de similitud del 100%. El número de nucleótidos diferentes para el aislado Ca7.2 es de 0 sobre 1347 y de 0 sobre 1354 para el aislado D16.2.

1.4.1.6.- Género *Pseudonocardia*

El árbol filogenético, obtenido mediante el método del Neighbour-Joining, del género *Pseudonocardia*, que actualmente cuenta con 38 especies validadas, se muestra en el anexo 9. En este árbol encontramos 4 aislados: PA.3, PB.1, PB.3 y PC.4.

La secuencia del 16S rDNA de *Amycolatopsis orientalis* (AJ400711) se utiliza como out-group o raíz del árbol. Los números de secuencia ("accession numbers") se muestran entre paréntesis. El "bootstrap" utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Como observamos en el árbol filogenético parcial (Figura 30), los aislados forman un cluster con la especie *Pseudonocardia asaccharolytica*, siendo el porcentaje de similitud del 97.47% para las cepas PB.1, PB.3 y PC.4 y del 97.48% para la cepa PA.3. El número de nucleótidos diferentes es de 34 para todas ellas.

Resultados y Discusión

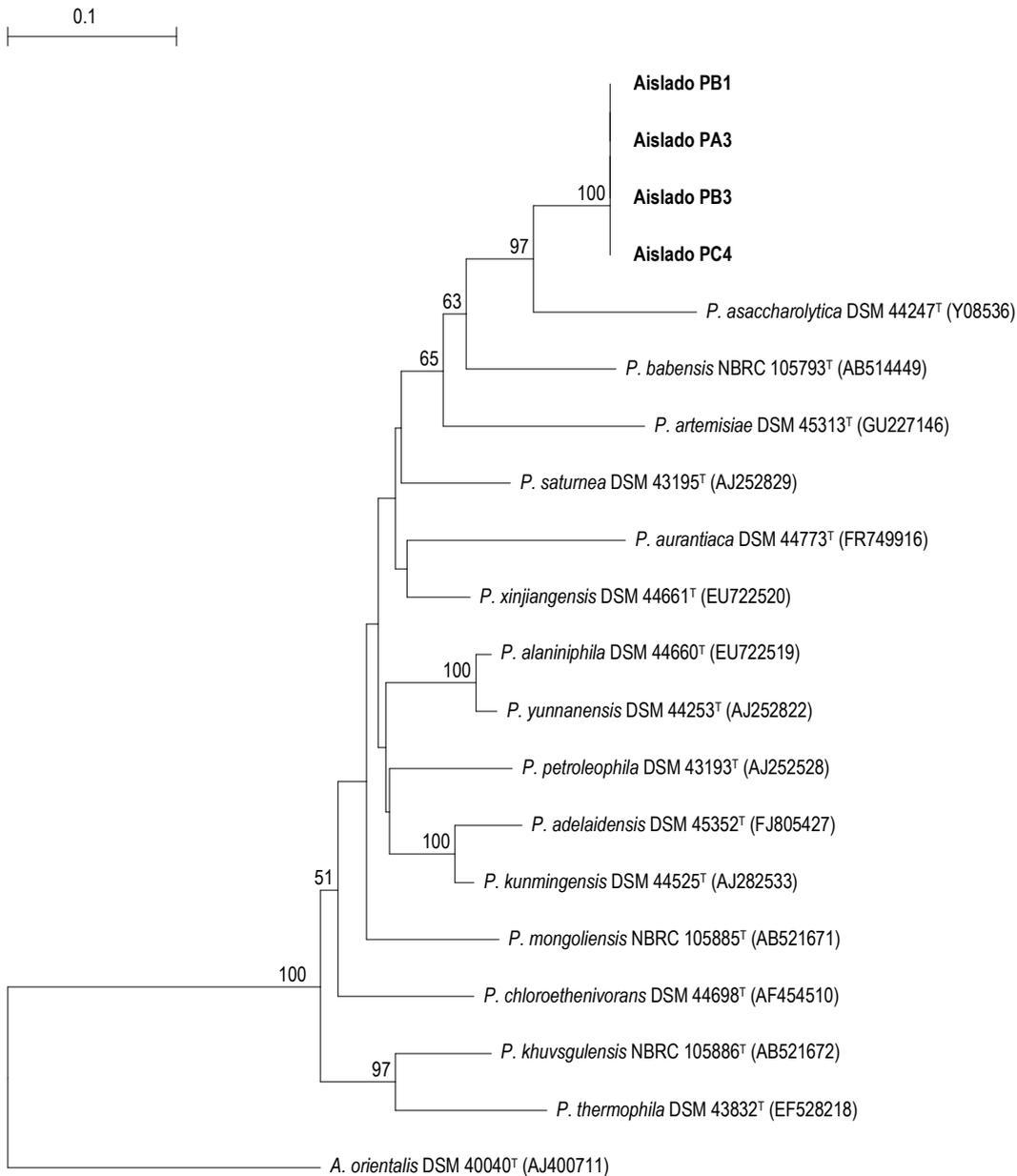


Figura 30: Árbol filogenético parcial del género *Pseudonocardia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Como se observa en los porcentajes de similaridad y atendiendo al criterio de especie nueva de Stackebrandt y Ebers (2006) se puede afirmar que son especies nuevas. Para comprobarlo se decidió realizar la hibridación DNA:DNA del aislado PA3 además de otras pruebas que demostraran que estos aislados eran especies diferentes a *Pseudonocardia asaccharolytica*.

La hibridación DNA:DNA se llevó a cabo en los laboratorios de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

Los DNA extraídos se purificaron por cromatografía en hidroxiapatito (Cashion *et al.*, 1977). La hibridación se llevó a cabo, por duplicado, mediante el método de Huss *et al.* (1983), utilizando un espectrofotómetro modelo Cary 100 Bio UV/Vis.

Los valores del DNA:DNA fueron 36.2% y 38.0%, valores bastante bajos respecto al punto de corte recomendado (Wayne *et al.*, 1987) del 70%. Es por ello que los aislados PA.3, PB.1, PB.3 y PC.4 son especies nuevas.

1.4.1.7.- Género *Rhodococcus*

Actualmente este género cuenta con un total de 31 especies validadas. En el árbol filogenético completo de este género (Anexo 10), obtenido por el método del Neighbour-Joining, se muestran los 9 aislados que se encontraron en los diferentes muestreos.

La secuencia del 16S rDNA de *Turicella otitidis* (X73976) se utiliza como out-group y están incluidas todas las especies tipo de las familias correspondientes al suborden al que pertenecen todos los aislados.

Los números de secuencia ("accession numbers") se muestran entre paréntesis. El "bootstrap" utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

La figura 31, árbol filogenético parcial del género, muestra como la especie *Rhodococcus ruber* forma un cluster con las cepas C5.5a, 54B y P135. El porcentaje de similitud de los tres aislados con respecto a esta especie es del 100% para las 2 primeras y del 99.93% para la P135. Lógicamente, para los aislados C5.5a y 54B el número de nucleótidos diferentes es de 0 y de 1 sobre un total de 1358 para el aislado P135.

Resultados y Discusión

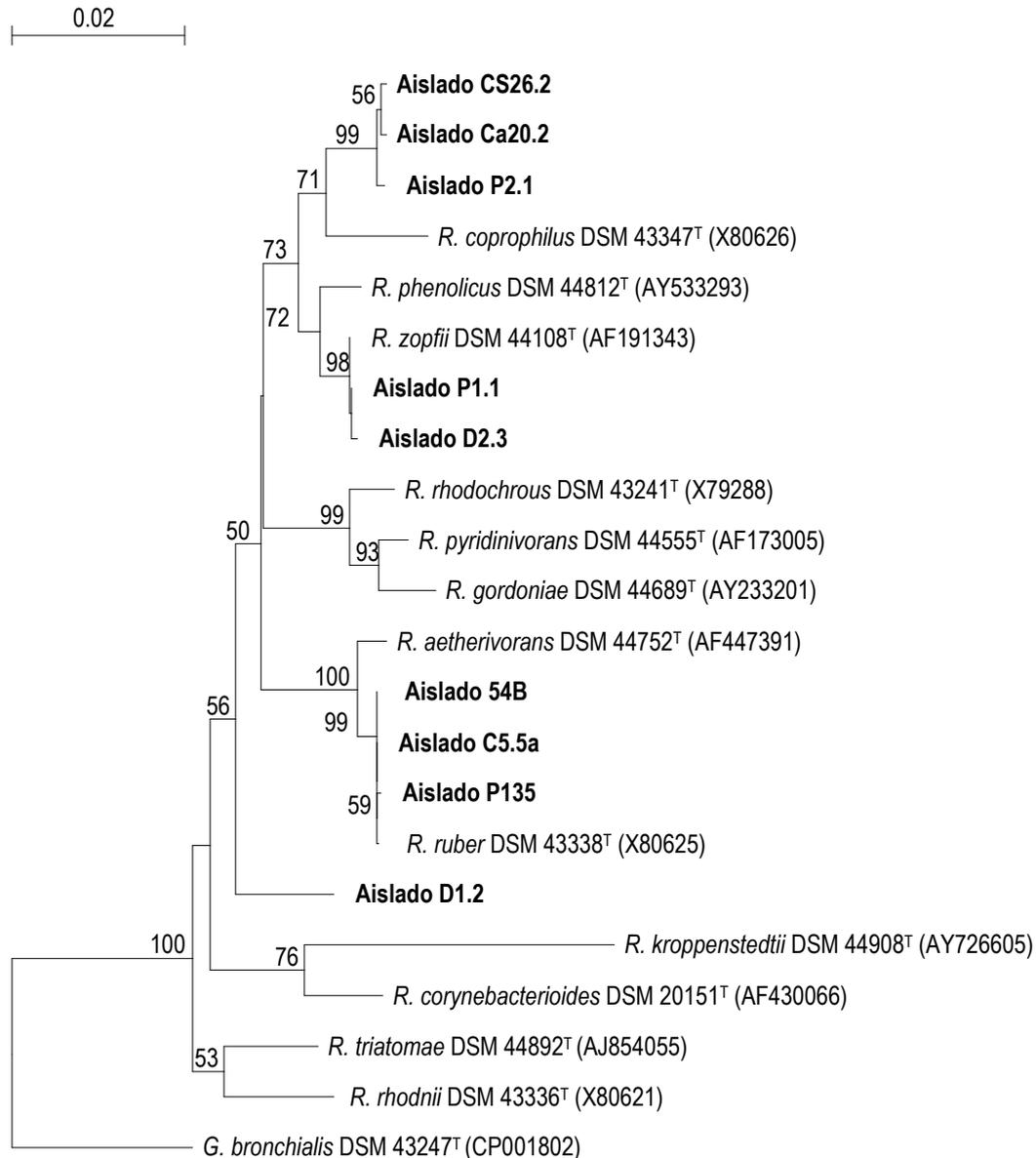


Figura 31: Árbol filogenético parcial del género *Rhodococcus* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

Según la matriz de similitud nucleotídica la especie más próxima al aislado D1.2 es *Rhodococcus rhodochrous* con un porcentaje de similitud nucleotídica del 97.78% y 30 nucleótidos diferentes sobre un total de 1354. Esto nos indica que podríamos encontrarnos ante una posible especie nueva y se deberían realizar las pruebas pertinentes.

Por último, los aislados P1.1, P2.1, D2.3, CS26.2 y Ca20.2 se sitúan próximos a la especie *Rhodococcus zopfii*, siendo los porcentajes de similitud del 100%, 98.67%, 99.93%, 98.68% y 98.58% respectivamente. Para estas cepas el número diferente de aislados es de 0

sobre un total de 1356 para el aislado P1.1, de 18 sobre un total de 1351 para la cepa P2.1, de 1 sobre un total de 1339 para el aislado D2.3, de 18 sobre un total de 1359 para el aislado CS26.2 y de 19 sobre un total de 1338 para el aislado Ca20.2.

1.4.1.8.- Género *Tsukamurella*

Para este género encontramos 16 aislados. El árbol filogenético completo del género, con 11 especies validadas, se muestra en el anexo 11, obtenido igualmente por el método del Neighbour-Joining.

La secuencia del 16S rDNA de *Turicella otitidis* (X73976) se utiliza como out-group y están incluidas todas las especies tipo de las familias correspondientes al suborden al que pertenecen todos los aislados.

Los números de secuencia (“accession numbers”) se muestran entre paréntesis. El “bootstrap” utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Las cepas QB7.2, QB16.2, 8V, CS20.1, P145, N1, N4, N5, N9-1 y N17-4 forman un cluster con *Tsukamurella pseudospumae* y *Tsukamurella sunchonensis*, estando el porcentaje de similitud, con respecto a estas dos especies, comprendido entre el 99.93% y el 100%. Por tanto no podemos afirmar que las cepas aisladas se traten de una u otra especie a menos que se realice una hibridación DNA:DNA. En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos para estos aislados.

Tabla 20: Porcentaje de similitud del 16S rDNA respecto a *Tsukamurella pseudospumae* y *Tsukamurella sunchonensis*

Aislado	Similitud	Nucleótidos ≠
QB7.2	99.93 %	1 / 1362
QB16.2	100 %	0 / 1359
8V	99.93 %	1 / 1353
CS20.1	100 %	0 / 1357
P145	100 %	0 / 1349
N1	99.93 %	1 / 1349
N4	100 %	0 / 1353
N5	100 %	0 / 1353
N9-1	99.93 %	1 / 1352
N17-4	100 %	0 / 1352

Resultados y Discusión

Para la cepa CS10.2 se observa en el árbol como forma un cluster con *Tsukamurella spongiae*, sin embargo su porcentaje de similaridad con ésta es, según la matriz de similaridad nucleotídica, del 98.89% mientras que con la especie *Tsukamurella pulmonis* es del 99.85% con 2 nucleótidos diferentes sobre un total de 1351.

Podemos observar como 3 cepas (D2.1, P166 y L2) forman un cluster con *Tsukamurella spumae*, siendo los porcentajes de similaridad del 100%, 100% y 99.16% respectivamente. El aislado D2.1 presentaba 0 nucleótidos diferentes sobre un total de 1360, la cepa P166 presentaba 0 sobre un total de 1352 y el aislado L2 presentaba 12 sobre un total de 1424.

Por último, para las cepas QB2.2 y N16-9 ocurre lo mismo que para los aislados de *Tsukamurella pseudospumae* y *Tsukamurella spongiae*, esto es, la matriz de similaridad nucleotídica nos dice que el porcentaje de similaridad de éstas con respecto a las especies *Tsukamurella tyrosinosolvans* y *Tsukamurella strandjordii* es el mismo (99.78%), y es por ello que se debería realizar una hibridación DNA:DNA. El número de nucleótidos diferentes es de 3 sobre un total de 1354 para el aislado N16-9 y de 3 sobre un total de 1337 para el aislado QB2.2.

En la figura 32 podemos observar el árbol filogenético parcial del género.

1.4.1.9.- Género *Williamsia*

Actualmente este género cuenta con un total de 6 especies validadas. En el árbol filogenético completo de este género (Anexo 12), obtenido por el método del Neighbour-Joining, se muestra el único aislado (CS1.1) encontrado en los diferentes muestreos.

La secuencia del 16S rDNA de *Turicella otitidis* (X73976) se utiliza como out-group y están incluidas todas las especies tipo de las familias correspondientes al suborden al que pertenece el único aislado.

Los números de secuencia (“accession numbers”) se muestran entre paréntesis. El “bootstrap” utilizado fue de 1000 réplicas (mostrando únicamente los valores superiores al 50%) y la escala del árbol filogenético indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

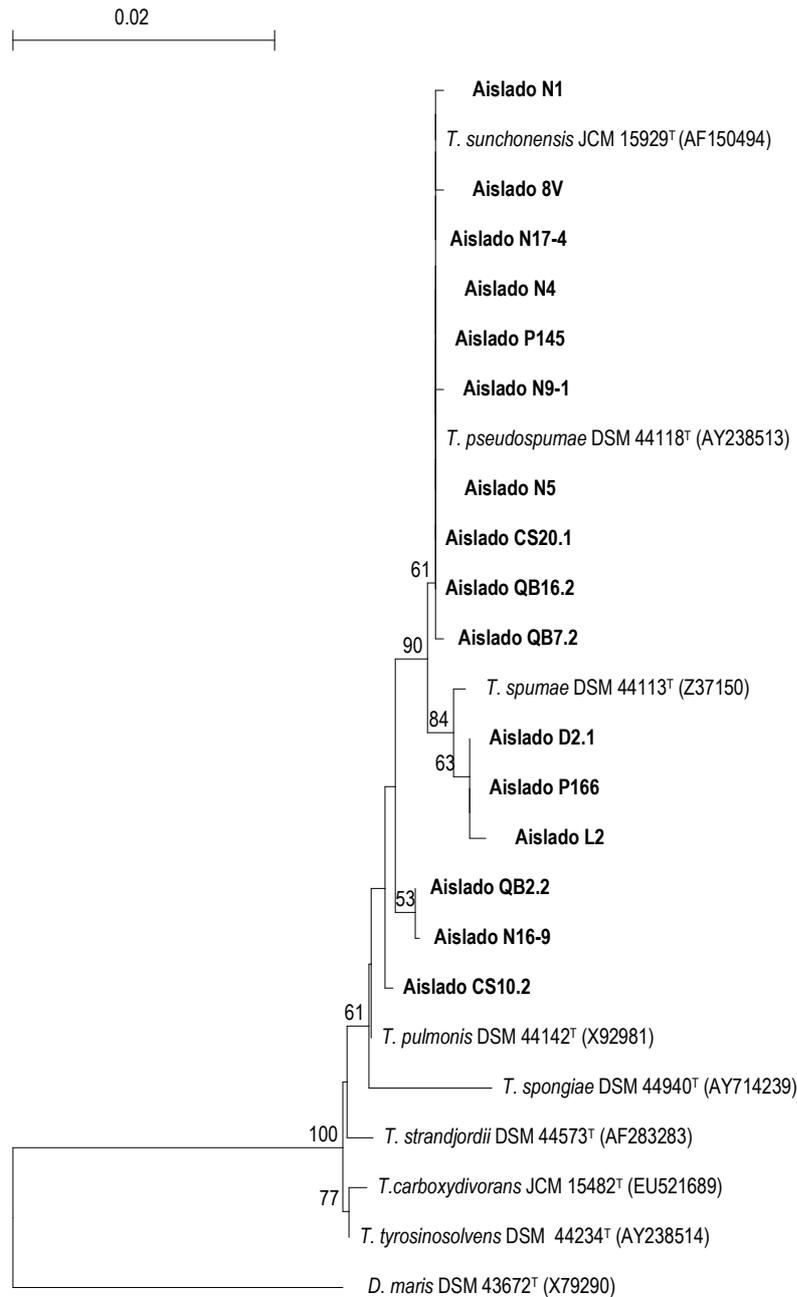


Figura 32: Árbol filogenético parcial del género *Tsukamurella* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

La figura 33 muestra que las especies *Williamsia marianensis* y *Williamsia muralis* forman un cluster con el aislado CS1.1. Sin embargo el porcentaje de similitud de la matriz indica que está más próximo filogenéticamente a la especie *Williamsia muralis*, siendo el porcentaje del 99.93% y el número de nucleótidos diferentes de 1 sobre un total de 1352.

Resultados y Discusión

Hay que destacar que la especie *Williamsia muralis* no se ha aislado nunca de plantas depuradoras españolas, es más, esta especie se aisló en las paredes de una guardería en Dinamarca (Kämpfer *et al.*, 1999).

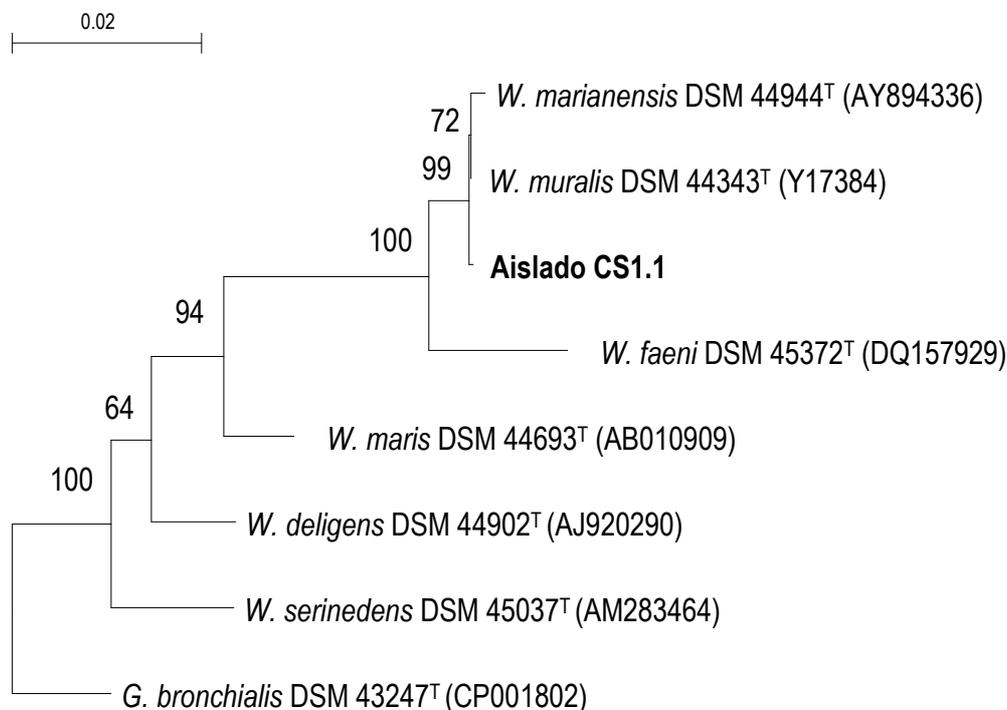


Figura 33: Árbol filogenético parcial del género *Williamsia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

1.5.- Caracterización fenotípica basada en características metabólicas

Para esta caracterización se realizaron 17 test fenotípicos. En este punto se presentan los resultados de 16 de ellos ya que la pigmentación de colonias está descrita en la tabla 11 del punto 1.2 de Resultados y Discusión. Las pruebas fenotípicas resultan de gran ayuda ya que apoyan los resultados obtenidos tanto en la caracterización quimiotaxonómica como en la caracterización genotípica.

Debido al gran volumen de aislados a manejar se decidió hacer una selección representativa que englobara todos los géneros y especies que se habían caracterizado genotípicamente. Para una mayor comprensión de los resultados se ha decidido englobar las pruebas por géneros. A continuación se exponen los resultados.

1.5.1.- Género *Corynebacterium*

En la tabla 21 se observan los resultados, para este género, de los test fenotípicos de degradación de esculina, tirosina, urea y reducción de nitratos y el crecimiento a diferentes temperaturas (tomándose como control de crecimiento la temperatura de 28° C).

Tabla 21: Resultados fenotípicos para el género *Corynebacterium* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
QB2.1	-	+++	++	+	-	-	-
QB8.1	-	+++	+	-	+	-	-

Las lecturas para el crecimiento a 10° C se realizaron a los 28 días y, como se observa en la tabla 21, el resultado para ambos aislados fue negativo. Este resultado es coherente con la bibliografía consultada ya que este género no suele crecer a temperaturas tan bajas, estando comprendida su temperatura óptima de crecimiento entre 20°C y 30°C (Collins, 1987). Es por ello que el crecimiento a 28° C es máximo y a 37° C crece pero no llegando al crecimiento máximo.

Las lecturas para los test de biodegradación se realizaron entre los 2 y 21 días. Para este género no se suele observar degradación de esculina y tirosina y la reducción de nitratos y degradación de urea es variable dependiendo de cada especie, por tanto los resultados observados en la tabla 20 son coherentes con la bibliografía (Renaud *et al.*, 2001; Ben-Dov *et al.*, 2009).

En la tabla 22 se presentan los resultados para el crecimiento de los aislados en diferentes fuentes de carbono al 1%. Las lecturas se realizaron a los 7, 14 y 21 días de crecimiento, mostrándose en la tabla adjunta los resultados al cabo de 21 días de incubación. Para poder cuantificar el crecimiento se realizaron crecimientos paralelos de los aislados en medio GYEA, tomándolo como control positivo.

Según la bibliografía consultada (Renaud *et al.*, 2001; Yassin *et al.*, 2003) los resultados obtenidos son coherentes. Como se ha comentado anteriormente, el crecimiento en las diferentes fuentes de carbono puede variar en función de cada especie, sin embargo, el patrón general se mantiene en todas las especies de este género y difieren en pocas pruebas según la afinidad que presenten por el sustrato.

Resultados y Discusión

Tabla 22: Resultados fenotípicos para el género *Corynebacterium* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
QB2.1	-	+	-	+	-	+	-	-
QB8.1	-	+	-	+	-	+	+	-

Las lecturas para el crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno al 0.1% se realizó, al igual que la anterior, a los 7, 14 y 21 días, mostrándose los resultados para los 21 días de crecimiento.

Como se puede observar en la tabla 23 no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos, los cuales son coherentes con la bibliografía consultada (Renaud *et al.*, 2001).

Tabla 23: Resultados fenotípicos para el género *Corynebacterium* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
QB2.1	-	-	+
QB8.1	-	-	+

Con todo ello podemos afirmar que, tal y como indican los resultados genotípicos y filogenéticos, los aislados son especies diferentes entre sí y pertenecen a las especies que se han indicado en el apartado 1.4.1.1. de Resultados y Discusión.

1.5.2.- Género *Dietzia*

El género *Dietzia* presenta un rango de temperaturas de crecimiento comprendido generalmente entre los 10° C y los 37° C, aunque pueden llegar a crecer a temperaturas de hasta 45°C (Li *et al.*, 2008), de ahí que los resultados obtenidos (tabla 24) sean coherentes con los resultados que nos facilita la bibliografía consultada.

Tabla 24: Resultados fenotípicos para el género *Dietzia* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
P46p	+	+++	+	-	+	-	-
P26	+	+++	+	+	+	-	-

En cuanto al crecimiento en diferentes fuentes de carbono al 1% y carbono y nitrógeno al 0.1% los resultados se muestran en las tablas 25 y 26.

Tabla 25: Resultados fenotípicos para el género *Dietzia* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
P46p	+	+	+	+	-	+	-	-
P26	-	+	-	+	+	+	-	-

Tabla 26: Resultados fenotípicos para el género *Dietzia* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
P46p	-	-	-
P26	-	+	-

Atendiendo a estos resultados, coherentes totalmente con la bibliografía consultada (Li *et al.*, 2008) podemos afirmar que los aislados pertenecen a las especies que se habían obtenido en la filogenia.

1.5.3.- Género *Gordonia*

Los resultados para el género *Gordonia* se muestran en las tablas 27, 28 y 29. Como se ha comentado anteriormente, se realizó una selección de cepas en función de la especie, el porcentaje de similitud y la estación depuradora a la que pertenecía cada aislado para así tener una muestra representativa mucho más manejable.

El rango de crecimiento óptimo para el género *Gordonia* varía, aproximadamente, entre los 13° C y los 40° C (Kummer *et al.*, 1999) por lo que los resultados obtenidos son coherentes con la bibliografía.

Los aislados P39 (*Gordonia alkanivorans*), CS11.1 (*Gordonia bronchialis*), C2.2 y LR-4 (*Gordonia paraffinivorans*) presentan un patrón de resultados coherentes con la bibliografía consultada (Bizet *et al.*, 1997; Kummer *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2003) por lo que podríamos afirmar que pertenecen a las especies obtenidas en la filogenia.

Resultados y Discusión

Tabla 27: Resultados fenotípicos para el género *Gordonia* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
P39	+	+++	+	+	+	-	-
QB7.1	-	+++	-	+	+	+	-
CS9.1	-	+++	-	+	+	+	-
J4.1	-	+++	-	+	+	+	-
QB19.1	-	+++	+	+	+	-	-
CS11.1	+	+++	+	+	+	+	-
QB8.2	-	+++	+	+	+	+	+
P158	-	+++	-	-	+	+	-
QB18.2	+	+++	+	+	+	-	-
Ca10.1	-	+++	-	+	+	+	-
P2.3	-	+++	-	+	+	-	-
Ca22.2	-	+++	-	+	+	-	-
D8.2	-	+++	-	+	+	-	-
QB18.1	+	+++	-	+	+	+	-
D12.2	+	+++	-	+	+	+	-
CS13.1	+	+++	-	+	+	+	-
C2.2	+	+++	+	-	+	+	-
LR-4	+	+++	+	-	+	+	-
CS7.1	-	+++	+	-	+	+	-
D11.1	-	+++	-	-	+	+	-
Ca9.1	+	+++	-	+	+	+	+
D13.1	+	+++	+	-	+	+	-
CS32.1	+	+++	+	-	+	+	-
Ca21.1	+	+++	+	-	+	+	-
P108	-	+++	+	+	+	+	-

Los aislados QB7.1, CS9.1 y J4.1 (*Gordonia amarae*) presentaban en la filogenia unos porcentajes de similaridad que se encontraban en el límite de lo estipulado por Stackebrandt y Ebers (2006) para considerarse la misma especie. Fijándonos en la bibliografía (Bizet *et al.*, 1997) observamos como los resultados obtenidos en las diferentes pruebas son coherentes, lo que nos puede indicar que nuestros aislados, pese a no estar en el límite fijado, sí que podrían ser especies de *Gordonia amarae*, sin embargo, es conveniente realizar, como se ha comentado en el apartado de la filogenia, la hibridación DNA:DNA para poder tener la certeza de que pertenecen a esta especie.

Según la bibliografía (Kageyama *et al.*, 2006) el aislado QB19.1 posee un patrón diferente a la especie *Gordonia araii*, ya que para esta especie en cuestión, el crecimiento en galactosa como fuente de carbono es negativa y en nuestro caso es positiva. Esto nos aporta un indicio, junto con el porcentaje de similaridad (98.00%), para poder intuir que se tratan de especies diferentes, lo que habría que comprobar con la hibridación DNA:DNA.

Para el aislado QB8.2 (*Gordonia cholesterolivorans*), el test fenotípico que difiere con dicha especie es, como en el caso anterior, la galactosa como fuente de carbono. En nuestro caso es positiva y la bibliografía consultada (Drzyzga *et al.*, 2009) indica que es negativa, con lo cual podríamos estar ante una posible especie nueva a expensas, eso si, de realizar más pruebas confirmatorias y la pertinente hibridación DNA:DNA.

Tabla 28: Resultados fenotípicos para el género *Gordonia* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
P39	-	+	-	+	+	+	-	+
QB7.1	-	+	-	+	-	+	+	-
CS9.1	-	+	-	+	-	+	+	-
J4.1	-	+	-	+	-	+	+	-
QB19.1	-	+	-	+	+	+	-	-
CS11.1	-	-	-	+	-	+	-	+
QB8.2	+	+	-	+	+	+	-	-
P158	-	+	-	+	-	+	+	+
QB18.2	-	+	-	+	-	+	-	-
Ca10.1	-	+	-	+	-	+	-	-
P2.3	-	+	-	+	-	+	-	-
Ca22.2	-	+	-	+	-	+	-	-
D8.2	-	+	-	+	-	+	-	-
QB18.1	-	-	-	+	-	+	-	+
D12.2	-	-	-	+	-	+	-	-
CS13.1	-	-	-	+	+	+	-	-
C2.2	-	+	-	+	+	+	-	-
LR-4	-	+	-	+	+	+	-	-
CS7.1	-	+	+	+	-	+	+	+
D11.1	-	+	+	+	-	+	+	+
Ca9.1	-	+	-	+	-	+	-	-
D13.1	-	-	-	+	-	+	+	-
CS32.1	-	-	-	+	-	+	+	-
Ca21.1	-	-	-	+	-	+	+	-
P108	-	-	-	+	-	+	+	-

La bibliografía consultada (Kageyama *et al.*, 2006) para el aislado P158 (*Gordonia effusa*) nos indica que posee el mismo patrón de pruebas fenotípicas. El porcentaje de similitud nucleotídica obtenido (98.89%) se encuentra en el límite propuesto, sin embargo, esto apoya la teoría de que el aislado pertenece a esta especie.

El porcentaje de similitud de los aislados QB18.2 (98.01%), Ca10.1 (97.35%) y P2.3 (97.42%) todas ellas pertenecientes, según la filogenia, a la especie *Gordonia hirsuta* nos indica que con toda seguridad se tratan de especies nuevas. Para poder confirmar esto, como se lleva comentando durante toda la discusión, se deberían hacer más pruebas para poder diferenciar de

Resultados y Discusión

una manera más clara que no se trata de esa especie sino de otra completamente nueva. Una pequeña ayuda la aportan los tests fenotípicos realizados que nos indican que poseen un resultado diferenciador. Este no es otro que el crecimiento en galactosa como única fuente de carbono. Si se observa la tabla 28 observamos que para este test el resultado obtenido es negativo, mientras que para la bibliografía consultada (Klatte *et al.*, 1996) el resultado que se obtiene es positivo. Esto nos da una idea que, con toda seguridad, se traten de especies nuevas, lo que deberá comprobarse mediante la hibridación DNA:DNA.

Tabla 29: Resultados fenotípicos para el género *Gordonia* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
P39	+	-	+
QB7.1	-	-	-
CS9.1	-	-	-
J4.1	-	-	-
QB19.1	-	-	-
CS11.1	-	-	-
QB8.2	+	+	+
P158	+	-	+
QB18.2	-	-	-
Ca10.1	-	-	-
P2.3	-	-	-
Ca22.2	-	-	+
D8.2	-	-	+
QB18.1	+	-	+
D12.2	+	-	+
CS13.1	+	-	+
C2.2	+	-	+
LR-4	+	-	+
CS7.1	+	-	+
D11.1	+	-	+
Ca9.1	+	-	-
D13.1	+	-	+
CS32.1	+	-	+
Ca21.1	+	-	+
P108	-	+	-

Las pruebas que diferencian, según la bibliografía consultada (Bizet *et al.*, 1997; Kummer *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2003; Kageyama *et al.*, 2006) a los aislados D8.2 y Ca22.2 con respecto a la especie *Gordonia hydrophobica* son el crecimiento en galactosa y maltosa como fuentes de carbono. Esto nos hace pensar que se tratan de especies diferentes a falta de realizar más pruebas confirmatorias.

Para los aislados pertenecientes a la especie *Gordonia malaquae* (QB18.1, D12.2 y CS13.1) encontramos que para dos de ellos (QB18.1 y CS13.1) las pruebas que los diferencian respecto a la especie obtenida mediante la filogenia son, respectivamente, el meso-inositol y la galactosa. Según la bibliografía consultada (Yassin *et al.*, 2007) estos aislados no deberían crecer en presencia de galactosa ni meso-inositol. Es por ello que, observando también los porcentajes de similitud obtenidos (98.15% para la cepa QB18.1 y 98.08% para la cepa CS13.1), podrían tratarse de especies nuevas a expensas de las pertinentes pruebas que determinen dicha posibilidad.

En la bibliografía consultada (Linos *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2003) para los aislados CS7.1 y D11.1 (*Gordonia polyisoprenivorans*) se observa como el crecimiento en galactosa como única fuente de carbono es positivo y, si nos fijamos en la tabla 28, nuestros resultados son negativos. Esto es un dato de apoyo para discernir si se tratan de especies diferentes. Además, observando también los porcentajes de similitud (98.53% y 98.01% respectivamente), los cuales no se encuentran dentro del límite propuesto por Stackebrandt y Ebers (2006), podríamos afirmar que se tratan de posibles especies nuevas, siempre y cuando se realicen las posteriores pruebas confirmatorias.

El aislado Ca9.1 (*Gordonia rhizosphaera*) no posee ninguna prueba diferenciadora según la bibliografía consultada (Xue *et al.*, 2003). Sin embargo, el porcentaje de similitud se encuentra en el límite para considerarla la misma especie. Es por ello que se deberían realizar la hibridación DNA:DNA y otras pruebas diferentes a las realizadas en el presente trabajo para poder afirmar que se trata de la misma especie.

Los aislados D13.1, CS32.1 y Ca21.1 (*Gordonia sputi* / *Gordonia jacobaea*) no poseen ninguna prueba diferenciadora para la especie *Gordonia sputi* según la bibliografía consultada (Bizet *et al.*, 1997). La especie *Gordonia jacobaea* es una especie que está en proceso de validación y es por ello que no se han podido comparar los resultados con ella, sin embargo, el hecho de que los aislados no posean ninguna prueba diferenciadora con respecto a *Gordonia sputi* nos hace pensar que, con toda seguridad, pertenezcan a esta especie aunque para confirmar se deben realizar las pruebas confirmatorias oportunas.

El porcentaje de similitud 98.97% del aislado P108 (*Gordonia terrae*) parece indicar que se podría tratar de una nueva especie, sin embargo, los resultados obtenidos en los tests

Resultados y Discusión

fenotípicos son coherentes totalmente con la bibliografía consultada (Bizet *et al.*, 1997), debiéndonos asegurar mediante otras pruebas confirmatorias.

1.5.4.- Género *Microbacterium*

En las tablas 30, 31 y 32 podemos observar los resultados de las pruebas fenotípicas realizadas para el género *Microbacterium*.

Tabla 30: Resultados fenotípicos para el género *Microbacterium* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
CQG-5a	+	+++	-	-	+	+	-

Observando la bibliografía (Kageyama *et al.*, 2007) se aprecia como los resultados de ésta corresponden con los resultados obtenidos en nuestros tests fenotípicos. Es por ello que, aunque el porcentaje de similitud del aislado CQG-5a (99.04%) está en torno al límite propuesto por Stackebrandt y Ebers (2006), podríamos considerar que nuestro aislado se corresponde con la especie obtenida en la filogenia (*Microbacterium lacus*).

Tabla 31: Resultados fenotípicos para el género *Microbacterium* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
CQG-5a	+	+	-	+	+	+	-	+

Tabla 32: Resultados fenotípicos para el género *Microbacterium* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
CQG-5a	-	-	-

1.5.5.- Género *Mycobacterium*

Los resultados para el género *Mycobacterium* se muestran en las tablas 33, 34 y 35. Tal y como se comentó en el punto 1.5.3 (género *Gordonia*) se realizó una selección de cepas en función de la especie, el porcentaje de similitud y la estación depuradora a la que pertenecía cada aislado para así tener una muestra representativa mucho más manejable.

Tabla 33: Resultados fenotípicos para el género *Mycobacterium* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
D6.1	+	+++	+	+	+	-	-
D3.2	-	+++	+	+	-	-	-
CS33.1	-	+++	+	+	+	+	-
C5.1a	-	+++	+	+	+	+	-
PB6	-	+++	+	+	+	+	-
RG-4b	-	+++	+	+	-	-	-
Ca7.2	+	+++	+	+	+	-	-

Para el aislado D6.1 (*Mycobacterium austroafricanum*) los resultados obtenidos en los tests fenotípicos corresponden totalmente con los resultados observados en la bibliografía consultada (Tsukamura *et al.*, 1983). Por tanto, y observando el porcentaje de similitud nucleotídica, podemos afirmar que se trata de la especie en cuestión.

Según la bibliografía consultada (Lévy-Frédault *et al.*, 1983) los resultados obtenidos para el aislado D3.2 (*Mycobacterium fallax*) son coherentes con los obtenidos en dicha bibliografía. Por tanto podemos afirmar que nuestro aislado corresponde con dicha especie, más aún si cabe teniendo en cuenta que posee un porcentaje de similitud del 100% con respecto a ésta.

Atendiendo a los resultados observados en la bibliografía (Doménech *et al.*, 1997) y al porcentaje de similitud nucleotídica que presenta el aislado CS33.1 (100% con respecto a *Mycobacterium mageritense*) podemos afirmar que nuestro aislado corresponde con dicha especie.

Los aislados C5.1a y PB6, caracterizados como *Mycobacterium mageritense*, poseen un porcentaje de similitud con dicha especie del 100%. Además, en la bibliografía consultada (Lévy-Frédault *et al.*, 1983; Doménech *et al.*, 1997) se observa como los resultados obtenidos en nuestros tests fenotípicos son coherentes. Por tanto podemos afirmar que nuestro aislado se corresponde con la especie *Mycobacterium mageritense*.

Para el aislado RG4-b observamos en la bibliografía consultada (Lévy-Frédault *et al.*, 1983) que el crecimiento en inositol es negativo y en nuestros resultados (Tabla 34) es positivo. Para confirmar que se corresponde con dicha especie deberemos realizar una hibridación

Resultados y Discusión

DNA:DNA, pese a que el porcentaje de similaridad (99.48%) es superior al límite fijado por Stackebrandt y Ebers (2006).

Tabla 34: Resultados fenotípicos para el género *Mycobacterium* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
D6.1	+	+	-	+	-	+	+	+
D3.2	+	+	+	+	+	+	-	-
CS33.1	-	-	-	+	+	+	+	+
C5.1a	+	+	+	+	+	+	-	+
PB6	+	+	+	+	+	+	-	+
RG-4b	-	+	-	-	+	+	+	+
Ca7.2	-	-	-	+	-	-	+	+

Por último, observando el porcentaje de similaridad del aislado Ca7.2 con respecto a la especie *Mycobacterium vanbalenii* (100%) y los resultados observados en la bibliografía consultada (Khan *et al.*, 2002) podemos afirmar que el aislado se corresponde con dicha especie.

Tabla 35: Resultados fenotípicos para el género *Mycobacterium* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
D6.1	+	+	+
D3.2	-	-	-
CS33.1	+	+	+
C5.1a	+	+	+
PB6	+	+	+
RG-4b	+	-	+
Ca7.2	+	-	+

1.5.6.- Género *Pseudonocardia*

Como se ha comentado en el apartado 1.4.1.6 de Resultados y Discusión, estos aislados presentaban un porcentaje de similaridad del 97.47%, con lo que se encontraban muy por debajo del límite propuesto por Stackebrandt y Ebers (2006). Es por ello que se decidió realizar la hibridación DNA:DNA, lípidos polares y menaquinonas, entre otras. Las pruebas se realizaron tan solo para el aislado PA.3 ya que los demás aislados tenían los mismos porcentajes de similaridad y provenían de la misma planta y, por tanto, se suponían la misma especie.

Resultados y Discusión

Las características morfológicas se llevaron a cabo en los medios Czapek modificado, PDA y los medios incluidos en el standard "International *Streptomyces* Project" (Shirling y Gottlieb, 1966). También se realizó el perfil de los ácidos grasos. Estos resultados se pueden observar en las tablas 36 y 37.

Tabla 36: Características de crecimiento aislado PA.3 vs. *P. asaccharolytica*

Medio	Aislado PA.3			<i>P. asaccharolytica</i> DSM 44247		
	Crecimiento	Color micelio	Color Micelio aéreo	Crecimiento	Color micelio	Color Micelio aéreo
ISP-2	++	Amarillo	Blanco	++	Amarillo	Blanco
ISP-3	++	Blanco	Blanco	++	Blanco	Blanco
ISP-4	+++	Blanco	Blanco	++	Blanco	Blanco
ISP-5	+++	Amarillo miel	Blanco	+	Opaco	Ninguno
ISP-6	++	Amarillo débil - marrón	Blanco	++	Amarillo débil - marrón	Blanco
ISP-7	+++	Amarillo miel	Ninguno	+	Opaco	Ninguno

Clave: +++, abundante; ++, moderado; +, crecimiento pobre.

Tabla 37: Perfil ácidos grasos aislado PA.3 vs. *P. asaccharolytica*

Ácidos grasos	Aislado PA3	<i>P. asaccharolytica</i> DSM 44247
Ácidos grasos hidroxilados		
C _{16:1} 2OH	1.41	-
Ácidos grasos saturados		
C _{14:0}	-	1.04
C _{17:0}	-	3.12
C _{16:0}	tr	6.33
Ácidos grasos insaturados		
C _{17:1} ω8c	tr	5.77
C _{17:1} ω6c	9.85	5.50
C _{18:1} ω9c	tr	2.13
Ácidos grasos ramificados		
iso-C _{14:0}	tr	2.18
iso-C _{15:0}	12.27	14.48
iso-C _{16:0}	23.54	23.79
iso-C _{17:0}	14.68	11.46
iso-C _{18:0}	tr	-
iso-C _{16:1} H	12.07	6.20
anteiso-C _{17:0}	5.87	4.32
C _{17:0} 10-methyl	3.44	2.73
C _{18:0} 10-methyl	tr	-
Suma de características		
3(C _{16:1} ω7c/ C _{16:1} ω6c)	2.87	7.33
4(C _{17:1} iso I/ anteiso B)	tr	-
9(iso-C _{17:0} ω9c/ C _{16:0} 10-methyl)	10.28	3.61

Clave -, no detectable.

Resultados y Discusión

El perfil de ácidos grasos se realizó en los laboratorios de la CECT (Colección española de Cultivos Tipo). Además, también se realizaron unos tests mediante tira API-ZYM (actividades enzimáticas) para diferenciar de forma más clara nuestros aislados de la especie *Pseudonocardia asaccharolytica*, así como la reducción de nitratos, degradación de tirosina o el crecimiento a diferentes temperaturas. Estos resultados se muestran en la tabla 38 (solamente se muestran los resultados diferenciadores).

Tabla 38: Tests fenotípicos diferenciadores entre aislado PA.3 y *P. asaccharolytica*

Característica	Aislado PA3	<i>P. asaccharolytica</i> DSM 44247
Ácido fosfatasa	-	±
Cisteína arilamidasa	±	-
Esterasa (C4)	-	+
Leucina arilamidasa	+	-
Valina arilamidasa	+	-
Tirosina	-	+
Reducción nitratos	-	+
Crecimiento 37°C	+	-
Crecimiento en NaCl al 3%	+	-
Rango pH (crecimiento)	5-10	6-9

Clave: +, positivo; ±, positivo débil; -, negativo.

1.5.7.- Género *Rhodococcus*

A continuación, en las tablas 39, 40 y 41, se muestran los resultados para el género *Rhodococcus*.

El aislado 54B, caracterizado como *Rhodococcus ruber* posee un porcentaje de similitud con dicha especie del 100%. Fijándonos en la bibliografía consultada (Bizet *et al.*, 1997) se observa como los resultados obtenidos en nuestros tests fenotípicos son coherentes con los resultados aportados por ésta. Por tanto podemos afirmar que nuestro aislado se corresponde con la especie *Rhodococcus ruber*.

Para el aislado D1.2 observamos en la bibliografía consultada (Bizet *et al.*, 1997) que los resultados que se obtienen en la degradación de la urea, el crecimiento en maltosa, el crecimiento en manitol y en prolina son diferentes a los obtenidos en los tests fenotípicos que se han realizado. El porcentaje de similitud (97.78%) es demasiado bajo como para poder afirmar que se tratan de la misma especie, por tanto sería necesario realizar más pruebas que confirmen esta posibilidad.

Tabla 39: Resultados fenotípicos para el género *Rhodococcus* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
54B	+	+++	+	+	-	-	+
D1.2	-	+++	+	+	+	-	+
CS26.2	+	+++	+	+	+	+	-
Ca20.2	+	+++	+	+	+	+	-

Tabla 40: Resultados fenotípicos para el género *Rhodococcus* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
54B	-	-	-	+	-	+	+	-
D1.2	-	+	-	+	-	+	-	-
CS26.2	-	+	-	+	-	+	-	-
Ca20.2	-	+	-	+	-	+	-	-

Para acabar con el género *Rhodococcus*, los aislados CS26.2 y Ca20.2 presentan diferencias con respecto a la bibliografía consultada (Bizet *et al.*, 1997) en el crecimiento en maltosa y glucosa y en la degradación de la esculina. Es por ello que, observando también los porcentajes de similitud (98.68% y 98.58% respectivamente), se deberá realizar una hibridación DNA:DNA, además de otras pruebas confirmatorias, para comprobar a que especie pertenecen.

Tabla 41: Resultados fenotípicos para el género *Rhodococcus* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
54B	-	+	-
D1.2	-	-	+
CS26.2	-	-	-
Ca20.2	-	-	-

1.5.8.- Género *Tsukamurella*

Los resultados para el género *Tsukamurella* se muestran, a continuación, en las tablas 42, 43 y 44.

Como se vio en el punto 1.4.1.8 de Resultados y Discusión, los aislados QB16.2, 8V y N1 (recuérdese que el total de cepas es mayor pero se realiza una selección para mejorar la

Resultados y Discusión

manejabilidad debido a la gran cantidad de aislados y pruebas fenotípicas a realizar), según la filogenia, presentaban el mismo porcentaje (100%, 99.93% y 99.93% respectivamente) con respecto a *Tsukamurella pseudospumae* y *Tsukamurella spongiae*.

Tabla 42: Resultados fenotípicos para el género *Tsukamurella* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
QB16.2	+	+++	-	-	-	+	+
8V	-	+++	-	-	-	+	-
N1	-	+++	-	-	-	-	+
CS10.2	-	+++	+	-	+	-	-
D2.1	-	+++	+	-	+	+	+
QB2.2	-	+++	+	-	+	-	-

Según la bibliografía consultada (Nam *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2007) el aislado QB16.2 pertenecería a la especie *Tsukamurella pseudospumae* y los aislados 8V y N1 a la especie *Tsukamurella spongiae*. Como se ha comentado anteriormente se deberían realizar más pruebas aclaratorias para poder estar seguros de una manera más fiable de a qué especie pertenece cada aislado.

Tabla 43: Resultados fenotípicos para el género *Tsukamurella* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
QB16.2	+	+	+	+	+	+	+	-
8V	+	-	-	+	+	+	+	-
N1	+	-	-	+	+	+	+	-
CS10.2	-	-	-	+	+	+	-	-
D2.1	+	+	+	+	+	+	+	+
QB2.2	-	+	+	+	+	+	+	+

El aislado CS10.2, caracterizado como *Tsukamurella pulmonis*, posee un porcentaje de similitud con dicha especie del 99.85%. Además, en la bibliografía consultada (Kattar *et al.*, 2001; Seong *et al.*, 2003) se observa como los resultados obtenidos en nuestros tests fenotípicos son coherentes. Por tanto podemos afirmar que nuestro aislado se corresponde con la especie *Tsukamurella pulmonis*.

Tabla 44: Resultados fenotípicos para el género *Tsukamurella* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
QB16.2	+	+	+
8V	+	+	+
N1	+	+	+
CS10.2	+	+	+
D2.1	+	+	+
QB2.2	+	+	+

Por último, para los aislados D2.1 y QB2.2, la bibliografía consultada (Olson *et al.*, 2007) demuestra que podrían pertenecer a la especie *Tsukamurella tyrosinosolvans* y no a la especie *Tsukamurella strandjordii*, sin embargo, para estar seguros de que realmente es así se deberían realizar las pertinentes pruebas confirmativas.

1.5.9.- Género *Williamsia*

Este género solo cuenta con un aislado (CS1.1). Los resultados se muestran a continuación en las tablas 45, 46 y 47.

Tabla 45: Resultados fenotípicos para el género *Williamsia* (I)

Aislado	Temperaturas			Degradación			
	Crecimiento 10°C	Crecimiento 28°C	Crecimiento 37°C	Reducción Nitratos	Urea	Esculina	Tirosina
CS1.1	+	+++	+	+	+	-	-

Para el aislado CS1.1 (*Williamsia muralis*) los resultados obtenidos en la bibliografía consultada (Kämpfer *et al.*, 1999; Yassin *et al.*, 2007) son coherentes con los resultados obtenidos en los tests fenotípicos realizados. Por tanto, podemos afirmar que el aislado CS1.1 pertenece a la especie *Williamsia muralis*.

Tabla 46: Resultados fenotípicos para el género *Williamsia* (II)

Aislado	Fuentes de carbono 1%							
	Lactosa	Maltosa	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Meso-inositol
CS1.1	+	-	+	+	-	+	-	+

Tabla 47: Resultados fenotípicos para el género *Williamsia* (III)

Aislado	Fuentes de carbono y nitrógeno 0.1%		
	Alanina	Histidina	Prolina
CS1.1	+	+	+

2.- Biodegradación de compuestos derivados del petróleo

2.1.- Ensayos de biodegradación

Para realizar las pruebas de biodegradación se sembraron todos los aislados en los tres medios de cultivo conteniendo cada uno de ellos fenol, naftaleno y glucosa, siendo este último el control positivo tomado como referencia. Todas las cepas se incubaron a una temperatura constante de 28° C.

En primer lugar, y antes de realizar la siembra en los compuestos tóxicos a degradar, se sembró cada aislado en los tres medios de cultivo suplementados únicamente con glucosa al 0.1% como única fuente de carbono para realizar una aclimatación previa de los microorganismos al medio mineral y así facilitar su posterior crecimiento.

La lectura de las pruebas de crecimiento se realizó a los 14 y 21 días de incubación a 28° C. Como se puede observar en la tabla 48 (crecimiento a los 21 días), todas las cepas tienen un crecimiento máximo en los tres medios de cultivo suplementados con glucosa al 0.1% como única fuente de carbono.

Como se puede observar en la tabla 48, 76 aislados (resaltados en naranja) son capaces de degradar al menos un producto tóxico (fenol, naftaleno o ambos).

Los mejores degradadores de naftaleno son, considerando los aislados que posean una degradación de dos + o superior, las especies *Corynebacterium freneyi* (QB8.1), *Dietzia cercidiphylli* (P46p), *Gordonia alkanivorans* (P39 y L10), *Gordonia amarae* (CS6.1, CS8.1, CS9.2, CS24.2 y CS27.1), *Gordonia araii* (QB19.1, QB19.2 y CS10.3), *Gordonia bronchialis* (CS6.2 y CS11.1), *Gordonia cholesterolivorans* (QB8.2), *Gordonia hirsuta* (P2.3 y CS5.1), *Gordonia malaquae* (QB18.1 y P2.2), *Gordonia polyisoprenivorans* (CS7.1, CS32.4, D11.1, D16.1, P54 y P141), *Mycobacterium fallax* (D3.2), *Mycobacterium mageritense* (CS33.1), *Mycobacterium vanbalenii* (D16.2 y Ca7.2), *Rhodococcus rhodochrous* (D1.2) y *Tsukamurella tyrosinosolvans* (QB2.2 y N16-9).

Tabla 48: Resultados ensayos biodegradación a los 21 días de incubación

Aislado	M9			MSM			BHM		
	Glucosa	Naftaleno	Fenol	Glucosa	Naftaleno	Fenol	Glucosa	Naftaleno	Fenol
QB2.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB8.1	+++	++	++	+++	++	+	+++	++	++
P46p	+++	++	-	+++	++	-	+++	+	-
P26	+++	+	+	+++	+	++	+++	+	+
P39	+++	+	-	+++	++	-	+++	++	-
L10	+++	++	-	+++	++	-	+++	+	-
QB7.1	+++	+	-	+++	++	-	+++	++	-
QB13.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB17.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB21.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB22.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
J4.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
P1.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS3.1	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
CS6.1	+++	++	-	+++	+	-	+++	++	-
CS8.1	+++	++	-	+++	+	-	+++	+	-
CS8.2	+++	-	-	+++	+	-	+++	+	-
CS9.1	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
CS9.2	+++	++	-	+++	+	-	+++	-	-
CS12.2	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
CS16.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS18.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS20.3	+++	+	-	+++	++	-	+++	+	-
CS21.4	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS24.2	+++	++	-	+++	+	-	+++	++	-
CS25.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS27.1	+++	++	-	+++	++	-	+++	+	-
P152	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB19.1	+++	++	-	+++	+	-	+++	+++	-
QB19.2	+++	+	-	+++	++	-	+++	++	-
CS10.3	+++	++	-	+++	++	-	+++	++	-
CS6.2	+++	+++	-	+++	++	-	+++	+++	-
CS11.1	+++	+++	-	+++	++	-	+++	+++	-
QB8.2	+++	++	-	+++	++	-	+++	+++	-
P158	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
QB6.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB18.2	+++	+	-	+++	+	-	+++	++	-
P2.3	+++	++	-	+++	++	-	+++	+	-
D11.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D12.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS5.1	+++	++	-	+++	++	-	+++	++	-
CS11.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS12.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS12.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS16.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS18.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS19.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS20.4	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS21.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS26.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS27.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS28.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS28.4	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ca10.1	+++	+	-	+++	++	-	+++	+	-

Resultados y Discusión

Tabla 48 (continuación): Resultados ensayos biodegradación a los 21 días de incubación

Aislado	M9			MSM			BHM		
	Glucosa	Naftaleno	Fenol	Glucosa	Naftaleno	Fenol	Glucosa	Naftaleno	Fenol
Ca17.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ca22.2	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
QB10.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB10.2	+++	+	-	+++	++	-	+++	+	-
QB16.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB20.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB21.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D8.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D8.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS10.1	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
CS32.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB18.1	+++	++	-	+++	+	-	+++	+	-
P2.2	+++	++	-	+++	++	-	+++	+	-
D1.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D2.2	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
D7.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D12.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D15.1	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
CS13.1	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
CS17.3	+++	+	-	+++	+	-	+++	++	-
CS18.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ca16.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
P175	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
C2.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
C2.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
LR-4	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
R1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
R5	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
C5.6	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D16.1	+++	+++	-	+++	++	-	+++	+++	-
CS7.1	+++	++	-	+++	++	-	+++	++	-
CS32.4	+++	++	-	+++	+++	-	+++	++	-
P54	+++	+++	-	+++	++	-	+++	+	-
P141	+++	++	-	+++	++	-	+++	+	-
D11.1	+++	+	-	+++	++	-	+++	++	-
Ca9.1	+++	+	-	+++	+	-	+++	-	-
E9	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D13.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D15.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS17.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS20.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS28.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS32.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
CS32.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ca3.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ca21.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
P48b	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ca19.1	+++	+	+	+++	+	++	+++	+	++
Ca27.1	+++	+	++	+++	-	++	+++	+	++
P108	+++	-	+	+++	+	++	+++	+	++
CQG-5a	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D6.1	+++	+	-	+++	+	-	+++	-	-
D9.1	+++	++	-	+++	+	-	+++	+	-
P72	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-

Tabla 48 (continuación): Resultados ensayos biodegradación a los 21 días de incubación

Aislado	M9			MSM			BHM		
	Glucosa	Naftaleno	Fenol	Glucosa	Naftaleno	Fenol	Glucosa	Naftaleno	Fenol
D3.2	+++	++	-	+++	+	-	+++	+	-
CS33.1	+++	++	-	+++	+	-	+++	++	-
C2.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
C5.1a	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
C5.1b	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
C4.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
C4.5	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
PA.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
PB.6	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
PB.7	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
RG4-a	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
RG4-b	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D16.2	+++	++	-	+++	+	-	+++	++	-
Ca7.2	+++	++	-	+++	+	-	+++	++	-
PA.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
PB.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
PB.3	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
PC.4	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
54B	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+++
C5.5a	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+++
P135	+++	+	++	+++	+	+++	+++	+	++
D1.2	+++	++	-	+++	+++	-	+++	++	-
P1.1	+++	+	-	+++	++	-	+++	++	-
P2.1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
D2.3	+++	++	-	+++	+	-	+++	+	-
CS26.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ca20.2	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
QB7.2	+++	+	-	+++	-	-	+++	+	-
QB16.2	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
8V	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
CS20.1	+++	-	-	+++	+	-	+++	+	-
P145	+++	-	-	+++	+	-	+++	-	-
N1	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
N4	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
N5	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
N9-1	+++	+	-	+++	+	-	+++	-	-
N17-4	+++	+	-	+++	-	-	+++	+	-
CS10.2	+++	+	+	+++	+	++	+++	+	+
D2.1	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	++
P166	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
L2	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
QB2.2	+++	+	-	+++	+++	-	+++	++	-
N16-9	+++	++	-	+++	+++	-	+++	++	-
CS1.1	+++	+	-	+++	++	-	+++	+	-

A su vez, las mejores especies degradadoras de fenol son *Corynebacterium variabile* (QB8.1), *Gordonia terrae* (Ca19.1, Ca27.1 y P108) y *Rhodococcus ruber* (54B, C5.5a y P135).

Resultados y Discusión

En las figuras 34 y 35 podemos observar dos ejemplos de la degradación del fenol por parte de los aislados de *Rhodococcus ruber*.

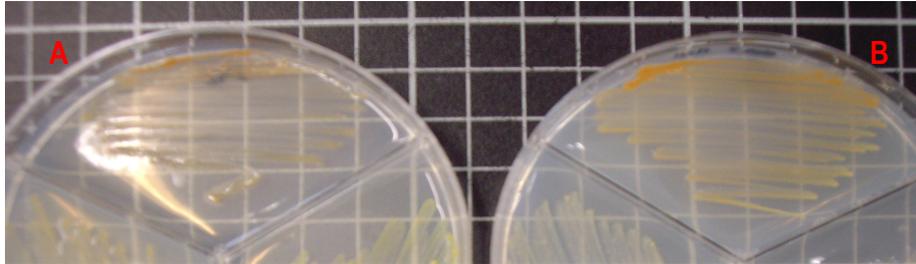


Figura 34: control positivo glucosa medio MSM (A) y aislado 54B en medio MSM suplementado con fenol (B)

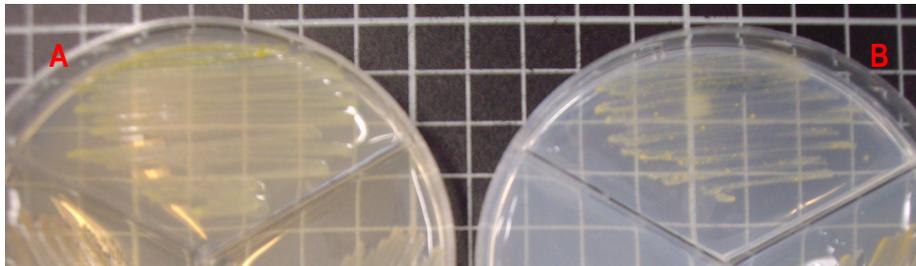


Figura 35: control positivo glucosa medio M9 (A) y aislado C5.5a en medio M9 suplementado con fenol (B)

Con todo ello, para reafirmar más aún los resultados obtenidos, se decidió hacer una prueba para comprobar si los aislados degradadores eran autótrofos. El motivo fue que los aislados PA.3, PB.1, PB.3 y PC.4, pertenecientes al género *Pseudonocardia*, degradaban aparentemente el naftaleno y el fenol pero, según la bibliografía consultada (Warwick *et al.*, 1994), existe alguna especie de este género que es autótrofa.

Los aislados se sembraron a partir de las placas de aclimatación previa en los medios de cultivo elegidos, pero esta vez sin ninguna fuente de carbono presente. Los resultados que se obtuvieron fueron los esperados, esto es, que ninguno de los aislados pertenecientes al suborden *Corynebacterineae* presentaba autotrofia ya que, consultando la bibliografía, en el grupo de los mycolata no se encontró ninguna autotrofia descrita. Sin embargo, los aislados del género *Pseudonocardia* (PA.3, PB.1, PB.3 y PC.4) sí que poseían esta característica, con lo que los resultados fueron falsos positivos y, por tanto, no se contabilizaron como especies degradadoras de fenol o naftaleno.

2.2.- Detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa

Como ya se ha explicado en la introducción, la catecol 1,2-dioxigenasa está implicada en la ruptura del anillo aromático, mediante la división en *orto*, esto es, entre los carbonos 1 y 2 del anillo bencénico.

Para detectar este gen se llevó a cabo, como se comentó en el punto 3.1 de Material y Métodos, la amplificación mediante PCR de dicho gen, utilizando los iniciadores C120f y C120r (Shen *et al.*, 2009).

La PCR se realizó para todas las cepas obtenidas en el proceso de aislamiento (un total de 152). Posteriormente, la detección de los fragmentos amplificados obtenidos en la PCR de la catecol 1,2-dioxigenasa se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Figura 36).

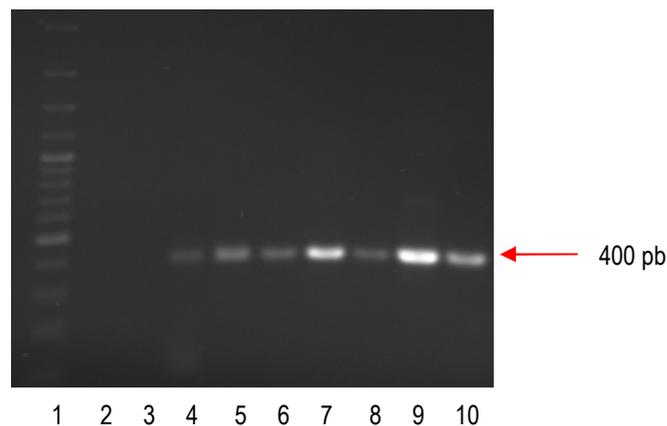


Figura 36: Gel de PCR con los productos de amplificación del gen catecol 1,2-dioxigenasa.
1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco sin DNA; 3: Control negativo; 4: Control positivo;
5: PB.1; 6:P39; 7: Ca27.1; 8: 54B; 9:QB7.1 y 10: CS6.1.

Tras realizar la electroforesis, de las 152 cepas de estudio, 31 de ellas dieron un resultado positivo y, por tanto, poseen la capacidad de degradar productos tóxicos que contengan el anillo bencénico (Tabla 49).

Todos los géneros, a excepción de los géneros *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium* y *Tsukamurella*, poseen el gen en alguna de sus especies. Hay que resaltar que el número de aislados que degradan no corresponde con el número de aislados que poseen el gen de la catecol.

Resultados y Discusión

Tabla 49: Resultados PCR catecol 1,2-dioxigenasa

Aislado	QB2.1	QB8.1	P26	P46p	P39	L10	QB7.1	QB13.1
PCR	-	-	+	+	+	+	+	-
Aislado	QB17.2	QB21.2	QB22.1	J4.1	P1.2	CS3.1	CS6.1	CS8.1
PCR	-	-	-	-	-	+	+	+
Aislado	CS8.2	CS9.1	CS9.2	CS12.2	CS16.1	CS18.1	CS20.3	CS21.4
PCR	+	+	+	+	-	-	+	-
Aislado	CS24.2	CS25.1	CS27.1	P152	QB19.1	QB19.2	CS10.3	CS6.2
PCR	+	-	+	-	-	-	-	+
Aislado	CS11.1	QB8.2	P158	QB6.1	QB18.2	P2.3	D11.2	D12.3
PCR	+	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	CS5.1	CS11.2	CS12.1	CS12.3	CS16.2	CS18.2	CS19.2	CS20.4
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	CS21.3	CS26.1	CS27.2	CS28.1	CS28.4	Ca10.1	Ca17.1	QB10.1
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	QB10.2	QB16.1	QB20.1	QB21.1	D8.1	D8.2	CS10.1	CS32.3
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	Ca22.2	E9	QB18.1	P2.2	D1.1	D2.2	D7.1	D12.2
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	D15.1	CS13.1	CS17.3	CS18.3	Ca16.1	P175	C2.1	C2.2
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	LR-4	R1	R5	C5.6	D16.1	CS7.1	CS32.4	P54
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	P141	D11.1	Ca9.1	D13.1	D15.2	CS17.1	CS20.2	CS28.3
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	CS32.1	CS32.2	Ca3.1	Ca21.1	P48b	Ca19.1	Ca27.1	P108
PCR	-	-	-	-	-	+	+	+
Aislado	CQG-5a	D6.1	D9.1	P72	D3.2	CS33.1	C2.3	C5.1a
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	C5.1b	C4.1	C4.5	PA.2	PB.6	PB.7	RG4-a	RG4-b
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	D16.2	Ca7.2	PA.3	PB.1	PB.3	PC.4	54B	C5.5a
PCR	-	-	+	+	+	+	+	+
Aislado	P135	D1.2	P1.1	P2.1	D2.3	CS26.2	Ca20.2	QB7.2
PCR	+	+	+	-	+	-	-	-
Aislado	QB16.2	8V	CS20.1	P145	N1	N4	N5	N9-1
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-
Aislado	N17-4	CS10.2	D2.1	P166	L2	QB2.2	N16-9	CS1.1
PCR	-	-	-	-	-	-	-	+

2.2.1.- Género *Corynebacterium*

Dentro del género *Corynebacterium*, los aislados QB2.1 (*Corynebacterium freneyi*) y QB8.1 (*Corynebacterium variabile*) no presentan el gen de la catecol 1,2-dioxigenasa, sin embargo, el aislado QB8.1 degrada el naftaleno y el fenol. Esto puede ser debido a que estas especies presenten una ruta de degradación alternativa a la de la catecol 1,2-dioxigenasa (como puede ser la ruta de degradación de la catecol 2,3-dioxigenasa), debido a mutaciones (inserciones o deleciones) que no permitan la correcta hibridación de los primers o también a la transferencia horizontal de genes (Táncsics *et al.*, 2007).

2.2.2.- Género *Dietzia*

Los aislados P26 (*Dietzia maris*) y P46p (*Dietzia cercidiphylli*) presentan el gen *catA*. Estos datos coinciden con los resultados de los ensayos de biodegradación ya que ambos aislados degradan el naftaleno.

2.2.3.- Género *Gordonia*

Este género presenta una amplia variedad en los resultados. Los aislados P39 y L10 (*Gordonia alkanivorans*) dan positivo para la reacción de PCR y, como se ha visto en los ensayos de biodegradación, degradan el naftaleno.

Los aislados QB13.1, QB17.2, QB21.2, QB22.1, J4.1, P1.2, CS16.1, CS18.1, CS21.4, CS25.1 y P152 (*Gordonia amarae*) no presentan el gen de la catecol ni degradan ningún compuesto tóxico, algo que es de esperar ya que en la bibliografía consultada (Shen *et al.*, 2009) se toma como control negativo en dicha PCR. Sin embargo, los aislados QB7.1, CS3.1, CS6.1, CS8.1, CS8.2, CS9.1, CS9.2, CS12.2, CS20.3, CS24.2 y CS27.1, también pertenecientes a la especie *Gordonia amarae*, presentan el gen de la catecol y, además, degradan el naftaleno. Es por ello, como se ha explicado en la caracterización genotípica, que cabe la posibilidad de que pertenezcan a otra especie diferente.

Para la especie *Gordonia araii*, los aislados QB19.1, QB19.2 y CS10.3 no presentaban el gen de la catecol, sin embargo degradaban el naftaleno, debiéndose a una incorrecta hibridación

Resultados y Discusión

de los primers ocasionada por mutaciones en el genoma, la transferencia horizontal de genes o porque esa especie presente una ruta de degradación alternativa (Táncsics *et al.*, 2007).

Los aislados pertenecientes a la especie *Gordonia bronchialis* (CS6.2 y CS11.1) poseen el gen *catA* y degradan el naftaleno. Las especies *Gordonia cholesterolivorans* y *Gordonia effusa* no presentan el gen *catA* pero sí degradan el naftaleno (QB8.2) y el naftaleno y el fenol (P158), debido a que presenten rutas alternativas de degradación, mutaciones en el genoma o transferencia horizontal de genes (Táncsics *et al.*, 2007).

Los aislados QB6.1, D11.2, D12.3, CS11.2, CS12.1, CS12.3, CS16.2, CS18.2, CS19.2, CS20.4, CS21.3, CS26.1, CS27.2, CS28.1, CS28.4 y Ca17.1 (*Gordonia hirsuta*) no presentan el gen *catA* ni degradan ninguno de los dos compuestos tóxicos. Sin embargo, los aislados QB18.2, P2.3, CS5.1, Ca10.1 y Ca22.2, pertenecientes a la misma especie, aunque no presentan dicho gen sí que degradan el naftaleno, algo que puede ser debido, según Táncsics *et al.* (2007) a la transferencia horizontal de genes, la mala hibridación de los primers o a que presenten una ruta de degradación alternativa a la de la catecol 1,2-dioxigenasa.

Lo mismo ocurre con los aislados QB10.2, CS10.1 (*Gordonia hydrophobica*) y con los aislados QB18.1, P2.2, D2.2, D15.1, CS13.1 y CS17.3 (*Gordonia malaquae*) que no poseen el gen *catA* pero sí degradan el naftaleno. El resto de los aislados de estas especies (CS18.3, CS32.3, QB10.1, QB16.1, QB20.1, QB21.1, D1.1, D7.1, D8.1, D8.2, D12.2, Ca16.1 y P175) ni presentan el gen ni degradan ningún compuesto tóxico.

Para la especie *Gordonia paraffinivorans*, los aislados C2.1, C2.2, LR-4, R1, R5 y C5.6 no presentan el gen *catA* ni degradan ningún compuesto tóxico. Para los aislados E9, D13.1, D15.2, CS17.1, CS20.2, CS28.3, CS32.1, CS32.2, Ca3.1, Ca21.1 y P48b (*Gordonia sputi*) ocurre lo mismo, esto es, ni poseen dicho gen ni degradan ningún compuesto tóxico.

Los aislados D16.1, CS7.1, CS32.4, P54, P141 y D11.1, pertenecientes a la especie *Gordonia polyisoprenivorans* (recuérdese que los porcentajes de similaridad nucleotídica están por debajo de los límites fijados por Stackebrandt y Ebers (2006) y que, por tanto, pueden ser consideradas especies diferentes), degradan el naftaleno pero no presentan el gen *catA*. Igualmente ocurre con el aislado Ca9.1 (*Gordonia rhizosfera*).

Para la especie *Gordonia terrae*, todos sus aislados (Ca19.1, Ca27.1 y P108) presentan el gen de la catecol 1,2-dioxigenasa y, además degradan tanto el naftaleno como el fenol.

2.2.4.- Género *Microbacterium*

El único aislado de este género, CQG-5a, (*Microbacterium lacus*) no presenta el gen *catA* ni degrada ningún tipo de compuesto.

2.2.5.- Género *Mycobacterium*

Los aislados C2.3, C5.1a, C5.1b, C4.1, C4.5, PA.2, PB.6, PB.7 (*Mycobacterium smegmatis*) y los aislados RG4-a y RG4-b (*Mycobacterium vaccae*) no presentan el gen *catA* ni degradan ninguno de los dos compuestos.

En cambio, los aislados D6.1, D9.1 y P72 (*Mycobacterium austroafricanum*), el aislado D3.2 (*Mycobacterium fallax*), el aislado CS33.1 (*Mycobacterium mageritense*) y los aislados D16.2 y Ca7.2 (*Mycobacterium vanbalenii*) no poseen dicho gen pero, sin embargo, degradan el naftaleno, lo que puede ser debido a la mala hibridación de los primers en la reacción de PCR, a mutaciones en el genoma, la transferencia horizontal de genes o a que presenten rutas alternativas de degradación (Táncsics *et al.*, 2007).

2.2.6.- Género *Pseudonocardia*

Estos aislados (PA.3, PB.1, PB.3 y PC.4), considerados especies nuevas, presentan el gen de la catecol 1,2-dioxigenasa pero no degradan ningún compuesto tóxico. Esto puede ser debido a que alguna zona funcional del enzima esté afectada por alguna mutación.

2.2.7.- Género *Rhodococcus*

La especie *Rhodococcus ruber* (54B, C5.5a y P135) posee el gen catecol 1,2-dioxigenasa y en los ensayos de biodegradación ha degradado ambos tóxicos. La especie *Rhodococcus rhodochromus* (D1.2) también posee el gen *catA* pero tan solo degrada el naftaleno.

Resultados y Discusión

Los aislados P1.1 y D2.3 (*Rhodococcus zopfii*) presentan un resultado positivo para la amplificación del gen *catA* y, además, degradan el naftaleno. El resto de aislados pertenecientes a esta especie (P2.1, CS26.2 y Ca20.2) ni presentaban el gen ni degradaban ningún compuesto. Esto puede ser debido a que, como se ha visto en el apartado de la caracterización genotípica, los porcentajes de similitud nucleotídica son muy bajos y podríamos estar hablando de otra especie que no fuera la que se obtuvo realizando la filogenia.

2.2.8.- Género *Tsukamurella*

Todos los aislados de este género degradan al menos un compuesto tóxico pero ninguno de ellos posee el gen *catA*. Según Táncsics *et al.* (2007) esto puede ser debido a que estas especies presenten una ruta de degradación alternativa a la de la catecol 1,2-dioxigenasa (como puede ser la ruta de degradación de la catecol 2,3-dioxigenasa), debido a mutaciones (inserciones o deleciones) que no permitan la correcta hibridación de los primers o también a la transferencia horizontal de genes.

Los aislados QB7.2, QB16.2, 8V, CS20.1, P145, N1, N4, N5 N9-1 y N17-4 (*Tsukamurella pseudospumae*) y los aislados QB2.2 y N16-9 (*Tsukamurella tyrosinosolvans*) degradan tan solo el naftaleno.

El aislado CS10.2 (*Tsukamurella pulmonis*) y los aislados D2.1, P166 y L2 (*Tsukamurella spumae*) degradan los dos compuestos tóxicos.

2.2.9.- Género *Williamsia*

Para este género, el único aislado (CS1.1), perteneciente a la especie *Williamsia muralis*, posee el gen y además degrada el naftaleno.

2.2.10.- Obtención y análisis de las secuencias del gen *catA*

Para comprobar que el gen detectado era el gen que estábamos buscando se decidió realizar un BLAST con algunas de las cepas pertenecientes a los géneros *Dietzia*, *Gordonia*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus* y *Williamsia* que habían dado positivo en la PCR.

Los productos de la PCR se purificaron utilizando el kit de purificación GenElute (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante, y se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Para la realización de las reacciones de secuenciación se utilizó el kit ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction (versión 3.1). Estas reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar en un secuenciador automático “Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer”.

Las secuencias completas, con una longitud aproximada de 400 bases, se obtuvieron en un archivo de texto electrónico desde el electroferograma mediante la aplicación científica CHROMAS (versión 1.43). Al ser de tan poca longitud no hizo falta el ensamblaje de los fragmentos (forward y reverse), simplemente se eliminaron los segmentos inicial y final (alrededor de 25 nucleótidos de longitud) de cada secuencia ya que suelen presentar una baja fiabilidad.

En la tabla 50 se observan los resultados obtenidos. Como se puede observar, los resultados confirman el resultado positivo del gen.

Tabla 50: Resultados BLAST catecol 1,2-dioxigenasa

Aislado	Identificación	Similaridad (%)
P26	<i>Gordonia terrae</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	80.00 %
CS11.1	<i>Gordonia bronchialis</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	99.00 %
Ca27.1	<i>Gordonia terrae</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	100.00 %
PA.3	<i>Gordonia rubripertincta</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	83.00 %
D1.2	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	98.75 %
C5.5a	<i>Rhodococcus ruber</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	99.00 %
54B	<i>Rhodococcus ruber</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	99.00 %
CS1.1	<i>Williamsia muralis</i> gen catecol 1,2-dioxigenasa	99.00 %

Además, para los aislados CS11.1 (*Gordonia bronchialis*), Ca27.1 (*Gordonia terrae*), D1.2 (*Rhodococcus rhodochrous*) C5.5a (*Rhodococcus ruber*), 54B (*Rhodococcus ruber*) y CS1.1 (*Williamsia muralis*) se confirman los resultados obtenidos en la filogenia.

Sin embargo, el aislado P26 (*Dietzia maris* según la filogenia) y el aislado PA.3 (*Pseudonocardia asaccharolytica* según la filogenia) no muestran un porcentaje de similaridad

Resultados y Discusión

alto ni la identificación corresponde con la obtenida en la caracterización genotípica debido a que, hasta ahora, no se había detectado este gen en estas 2 especies o, si se había detectado, en el momento de realizar el BLAST aún no estaba depositada la secuencia en la base de datos del NCBI.

3.- Consideraciones finales

Desde que se desarrolló el sistema de depuración de aguas residuales basado en el sistema de fangos activos, en 1914, las plantas de depuración de aguas residuales fueron diseñadas y controladas principalmente por ingenieros dejando de lado el hecho de que el propio proceso de depuración es principalmente microbiológico. Una fecha importante que apoyó el papel que juegan los microorganismos fue en 1969. En ese año se describió el llamado “Misterio de Milwaukee” donde se comprobó que uno de los principales problemas que interfieren en la depuración de aguas residuales es causado por microorganismos. A partir de aquí se empieza a estudiar el proceso de depuración por equipos interdisciplinarios formados por ingenieros y por microbiólogos en donde estudian todos los grandes grupos microbianos que intervienen en la depuración, tanto útiles como perjudiciales. Dentro de los microorganismos perjudiciales, los actinomicetos juegan un papel muy importante como se ha demostrado en la presente tesis doctoral.

A partir de los años 40, desde el descubrimiento por parte de Waksman y Woodruff (1941) de que los actinomicetos son capaces de producir antibióticos, el interés por estos microorganismos ha ido en aumento, no solamente por la capacidad de generar este tipo de sustancias sino también por otras muchas aplicaciones biotecnológicas tales como la descomposición de sustancias tóxicas, descomposición de restos vegetales y animales o la formación de compuestos húmicos.

En la actualidad se están llevando a cabo numerosos estudios de biodiversidad de este tipo de microorganismos por todo el mundo ya que, como se ha indicado anteriormente, ofrecen numerosas aplicaciones biotecnológicas. En este contexto se planteó un estudio para evaluar la biodiversidad de actinomicetos cultivables en diferentes estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas e industriales, situadas en diferentes emplazamientos de la geografía española.

Este trabajo se estructuró en dos partes. En la primera se realizó una caracterización de cepas pertenecientes al suborden *Corynebacterineae* presentes en muestras de fangos activos mediante su aislamiento, identificación y caracterización quimiotaxonómica, genotípica y fenotípica.

Se aislaron un total de 152 cepas provenientes de 28 plantas, todas ellas con problemas de espumas biológicas o “foaming”. Se observó, mediante el estudio previo de cepas de referencia pertenecientes a este suborden, que los aislados que se obtuvieron tenían la morfología típica nocardioforme, predominando las colonias pequeñas, rugosas y / o mucosas y un micelio basal que se fragmentaba dando lugar a formas bacilares o cocoides. Todas ellas eran Gram positivas y catalasa positivas. Sin embargo, estos métodos convencionales, basados en características morfológicas y tinciones diferenciales, no permiten diferenciar los géneros de mycolata formadores de espumas.

La quimiotaxonomía ha sido muy utilizada para caracterizar actinomicetos (Lechevalier y Lechevalier 1980). El primer paso en la caracterización taxonómica de actinomicetos es el estudio del quimiotipo de pared celular. Los nocardioformes poseen una pared celular tipo IV, aunque otros géneros de actinomicetos que no contienen ácidos micólicos también tienen este tipo de pared, por lo tanto la determinación del quimiotipo de pared no es suficiente. En este trabajo se ha realizado la detección de ácidos micólicos por cromatografía en capa fina (TLC) (Hamid *et al.*, 1993) ya que los mycolata son las únicas bacterias que contienen estos compuestos, la determinación de los isómeros del ácido diaminopimélico (Staneck y Roberts, 1974) y la extracción y análisis de los azúcares predominantes de la pared celular (Hasegawa *et al.*, 1983). Se ha observado que estos tres parámetros tienen valor taxonómico suficiente para incluir a un aislado dentro del suborden *Corynebacterineae* y en el caso de los ácidos micólicos pueden dar una buena aproximación a nivel de género si comparamos la movilidad cromatográfica de los aislados con cepas de referencia. No obstante, estos parámetros quimiotaxonómicos pueden variar según las condiciones de cultivo (Wick *et al.*, 2002), por lo tanto en este trabajo se ha realizado la detección de estos 3 parámetros, en condiciones estándar de cultivo, como un primer paso en la caracterización de mycolata.

Estas pruebas demostraron que todos los aislados, a excepción de 5, pertenecían al suborden *Corynebacterineae* ya que poseían ácidos micólicos, componentes indispensables para formar parte de dicho suborden. Sin embargo, se decidió mantener los aislados que no

Resultados y Discusión

tenían los componentes típicos de la pared celular de los mycolata ya que presentaban una morfología muy similar a la nocardioforme y presentaban una abundancia en el aislamiento inicial en placa muy alta, con lo que también podrían estar implicados en algún proceso de depuración.

Después de obtener estos 3 parámetros, se realizó una PCR para amplificar el gen 16S rDNA, utilizando para ello los iniciadores específicos diseñados por Lane (1991). En la caracterización de cepas, los métodos moleculares basados en la PCR son más efectivos que los fenotípicos por su especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. La sensibilidad de la PCR depende en gran medida de la especificidad de los iniciadores. En todos los aislados se amplificó el gen 16S rDNA, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases.

Posteriormente se realizó la secuenciación de los productos de PCR, se elaboraron los árboles filogenéticos y las matrices de similaridad obteniéndose un total de 9 géneros distintos (*Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y *Williamsia* pertenecientes al suborden *Corynebacterineae*; *Microbacterium* perteneciente al suborden *Micrococcineae* y *Pseudonocardia*, género perteneciente al suborden *Pseudonocardineae*) y 37 especies diferentes lo que indica la gran biodiversidad encontrada en el presente estudio.

Además, se identificaron no solamente géneros y especies típicas de fangos activos como *Gordonia amarae* (Goodfellow *et al.*, 1994; Klatte *et al.*, 1994) o *Tsukamurella spumae* (Nam *et al.*, 2003) sino también géneros y especies que no se habían encontrado hasta la fecha en estos ambientes como es el caso de *Williamsia muralis* (Kämpfer *et al.*, 1999) o especies patógenas para humanos como es el caso de *Dietzia maris* (Pidoux *et al.*, 2001), *Gordonia bronchialis* (Tsukamura, 1971) o *Gordonia terrae* (Pham *et al.*, 2003). Todo esto indica que todavía queda mucho por estudiar en el proceso microbiológico de depuración de aguas residuales, ya que tradicionalmente, los microorganismos que interfieren en el proceso, sobre todo los productores de espumas biológicas, se han limitado a grupos poco definidos, es decir, morfologías observadas en plantas con problemas de espumas denominadas como GALO (antiguamente NALO) sin especificar qué especies en concreto eran las responsables.

Hay que tener en cuenta que la capacidad de producción de espumas de un microorganismo, en nuestro caso de los mycolata, depende de la abundancia del mismo en la planta y de la hidrofobicidad de la membrana externa. Dicha hidrofobicidad viene determinada por los ácidos micólicos presentes en todas las especies incluidas dentro del grupo de los

mycolata. Estos compuestos varían en longitud y en complejidad presentando diversos patrones de ramificaciones, de manera que cuanto más largas y más ramificadas sean las cadenas carbonadas, más hidrofobicidad confieren al microorganismo. En este sentido las especies que contienen ácidos micólicos de cadena más corta pertenecen a los géneros *Corynebacterium* (22C - 36C) y *Dietzia* (34C - 38C) mientras que las especies con ácidos micólicos más largos y más complejos pertenecen a los géneros *Mycobacterium* (60C - 90C) y *Tsukamurella* (62C - 78C). Esto indica que se está pasando por alto dos géneros de mycolata con alta hidrofobicidad, *Mycobacterium* y *Tsukamurella*, y por lo tanto con alta capacidad para producir espumas. En la presente tesis doctoral se ha demostrado que ambos géneros en conjunto suponen un porcentaje importante (aproximadamente un 21%). Por lo tanto se debería incluir, además de los clásicos productores de espumas como *Gordonia* y *Rhodococcus*, a los géneros *Tsukamurella* y *Mycobacterium*.

De las 152 especies, atendiendo al criterio y límites fijados por Stackebrandt y Ebers (2006) para considerar a un par de especies como pertenecientes a la misma especie, basándose en la similitud de secuencias del 16S rDNA, encontramos que 48 de ellas poseen un porcentaje menor del 98.70% propuesto y que 17 de ellas lo poseen en el límite comprendido entre el 98.7% y el 99%, con lo que estaríamos hablando de un total de 65 posibles especies nuevas.

En el presente estudio se ha comprobado que el género *Gordonia* es el más importante en la formación de espumas ya que, de los 152 aislados, 100 de ellos pertenecen a dicho género, algo que concuerda perfectamente con la bibliografía dado que la importancia de este género en estaciones depuradoras con sistemas de fangos activos ha sido estudiada en numerosas ocasiones, llegando a tal conclusión (Goodfellow *et al.*, 1996; Stainsby *et al.*, 2002).

Además, tradicionalmente se ha considerado *Gordonia amarae* como la principal productora de espumas. En el presente estudio tan solo el 22% de los aislados del género *Gordonia* pertenecían a esta especie. Por lo tanto el acrónimo conocido como GALO debería incluir muchas más especies de este género. Este hecho pone de manifiesto que no solo esta especie es la principal especie productora de espumas y, por tanto, el papel de otros géneros, como por ejemplo *Rhodococcus*, *Tsukamurella* o *Mycobacterium*, en la formación de espumas biológicas puede estar subestimado. Es por ello que los técnicos de depuradora, extrapolando esos resultados, tienden a equivocarse en la identificación de los microorganismos productores

Resultados y Discusión

de espumas y, por tanto, muchas veces no eligen las soluciones correctas para eliminar eficazmente dichos problemas.

La caracterización fenotípica basada en características metabólicas se realizó para completar los resultados obtenidos tanto en la caracterización quimiotaxonómica como en la caracterización genotípica. Estos tests fenotípicos nos ayudan a diferenciar especies que están muy próximas o que pueden ser consideradas especies nuevas debido a que el porcentaje de similitud obtenido crea ciertas dudas. Como se ha dicho anteriormente, 65 de los aislados podrían ser considerados como especies nuevas. Generalmente estos tests no difieren mucho entre especies del mismo género, sin embargo, siempre existen ciertas pruebas que proporcionan elementos diferenciadores que pueden ayudar a mejorar la caracterización del aislado en comparación con la especie de referencia más próxima filogenéticamente. Sin embargo, esto son datos de apoyo, nunca definitivos ya que se debería realizar, como se ha dicho anteriormente, la hibridación DNA:DNA y otras pruebas confirmatorias tales como menaquinonas, ácidos grasos, tira API-ZYM u otras pruebas que diferenciaran de manera mucho más clara nuestros aislados de la especie en cuestión.

La segunda parte del trabajo se centra en estudiar la capacidad de biodegradación de los aislados obtenidos mediante ensayos de biodegradación y la detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa, el cual está implicado en la ruptura del anillo aromático y, por tanto, en la biodegradación de los compuestos tóxicos naftaleno y fenol.

De los 152 aislados, la mitad de ellos eran capaces de degradar al menos el fenol y/o el naftaleno. Todos los aislados con esta capacidad pertenecían al suborden *Corynebacterineae*, ningún aislado del género *Microbacterium* o *Pseudonocardia* degradaba el fenol o el naftaleno. En la bibliografía consultada, estos dos últimos géneros no destacan como biodegradadores de derivados del petróleo, sin embargo, la abundancia de las colonias observadas en el momento del aislamiento podría indicar un papel importante en la planta donde fueron aisladas.

El compuesto tóxico que mejor se degradaba fue el naftaleno. Esto se explica porque el fenol es un bactericida y puede inhibir la capacidad de degradación de algún aislado.

En la detección molecular del gen de la catecol 1,2-dioxigenasa se observó que solo 31 aislados presentaban dicho gen. Estos 31 aislados también degradaban en placa en los ensayos

previamente realizados. Sin embargo, para los 45 aislados restantes que degradaban en placa no se detectó dicho gen. Esto puede ser debido, según Tánics *et al.* (2007), a que los aislados presenten una ruta de degradación alternativa a la de la catecol 1,2-dioxigenasa, debido a mutaciones que no permitan la correcta hibridación de los primers o a la transferencia horizontal de genes.

CONCLUSIONES

1.- Los resultados obtenidos en esta tesis indican que los problemas de espumas en las plantas de tratamiento estudiadas son causados por una gran diversidad de microorganismos filamentosos que contienen ácidos micólicos, pertenecientes al suborden *Corynebacterineae*. La presencia de ácidos micólicos es necesaria para que el microorganismo sea considerado como productor de espumas.

2.- De los 152 aislados estudiados en el presente trabajo, el 65.79% (100 aislados) pertenece al género *Gordonia*, el 11.18% (17 aislados) al género *Mycobacterium*, el 10.53% (16 aislados) al género *Tsukamurella*, el 5.92% (9 aislados) al género *Rhodococcus* y el 6.58% (10 aislados) restante repartido entre los géneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia* y *Williamsia*.

3.- *Gordonia amarae* es la especie considerada por la bibliografía como la principal productora de espumas, sin embargo, en el presente trabajo, se demuestra que existe un gran número de especies dentro de este género con dicha capacidad, ya que de los 100 aislados pertenecientes al género *Gordonia*, tan solo el 22% de ellos pertenecen a dicha especie.

4.- Se han encontrado especies patógenas para humanos tales como *Dietzia maris*, *Gordonia bronchialis*, *Gordonia sputi* o *Tsukamurella pulmonis* con el consiguiente peligro para la salud humana que conllevaría el riego de zonas agrícolas con ese tipo de agua depurada.

5.- El segundo género más importante en el presente trabajo es el género *Mycobacterium*. En comparación con otros estudios realizados en plantas depuradoras de aguas residuales domésticas, se han aislado un buen número de micobacterias, todas ellas ambientales, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estuvieran presentes micobacterias patógenas aunque debido a su lento crecimiento no fue posible aislarlas.

6.- El género *Tsukamurella*, tercero en importancia en el presente trabajo, presenta aislados que son reconocidos productores de espumas como *Tsukamurella spumae* y *Tsukamurella pseudospumae* y otros que no han sido relacionados nunca con espumas en fangos activos como *Tsukamurella tyrosinosolvans*.

Conclusiones

7.- El género *Rhodococcus*, aislado en otras zonas frecuentemente y reconocido como uno de los principales productores de espumas, es uno de los géneros con menor incidencia en las plantas depuradoras estudiadas.

8.- La técnica del análisis del 16S rDNA, que incluye la elaboración de árboles filogenéticos y matrices de similitud nucleotídica, ha resultado ser el método más fiable para identificar los actinomicetos nocardioformes a nivel de especie. La taxonomía polifásica es de gran ayuda para poder identificar actinomicetos ya que proporciona una mayor información acerca del conjunto de características genotípicas y fenotípicas.

9.- Se obtiene un porcentaje total de cepas degradadoras del 50.00% (76 aislados), siendo los géneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* los mejores degradadores de naftaleno y los géneros *Corynebacterium*, *Gordonia* y *Rhodococcus* los mejores degradadores de fenol.

10.- El gen de la catecol 1,2-dioxigenasa se detecta en el 20.39% de los aislados (31 de ellos).

11.- Según el criterio propuesto por Stackebrandt y Ebers en 2006, se obtiene un 31.58% (48 aislados) de posibles nuevas especies, un porcentaje muy elevado tratándose de tan pocas muestras estudiadas.

12.- Se demuestra que existe una gran diversidad de microorganismos que están implicados en los problemas de espumas biológicas y que un elevado porcentaje tiene la capacidad de degradar compuestos tóxicos. Esto permitiría optimizar el proceso biológico en función de las bacterias filamentosas encontradas y mejorar la calidad del efluente, así como también utilizar la capacidad de biodegradación de esas bacterias en ambientes contaminados y, por tanto, mejorar el medio ambiente en general.

PROPUESTA DE NUEVA ESPECIE

1.- *Pseudonocardia hispalensis*

Aislado obtenido en la depuradora de aguas residuales de una planta química, dedicada a la obtención de productos químicos derivados del petróleo, situada en Palos de Frontera (Huelva, España).

Actinomiceto aerobio, Gram positivo, catalasa positivo, oxidasa negativo y no acidorresistente que presenta un micelio aéreo y de sustrato ampliamente ramificado y fragmentado que incluye formas cocáceas y bacilares. Crece en los medios incluidos en el standard "International *Streptomyces* Project" (medios ISP 2 - 7) formando un micelio aéreo de color blanco pero no produciendo pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 5 a 10, con un óptimo de 7 - 8. El rango óptimo de temperatura de crecimiento se encuentra entre los 28 y los 37° C, no creciendo a una temperatura de 10° C. Crece en presencia de 3% de NaCl. Ureasa negativo. No degrada adenina, tirosina, xantina ni hipoxantina. No produce ácidos a partir de glucosa, ramnosa, xilosa, fructosa, trehalosa, celobiosa, manitol, sorbitol, eritritol, maltosa, lactosa, arabinosa, adonitol ni salicina. Produce leucina y valina arilamidasa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular y arabinosa y galactosa como azúcares predominantes. El ácido graso mayoritario es el iso-C_{16:0} y la menaquinona principal es MK8 (H₄). El patrón de lípidos polares contiene difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidilmetilamina. El contenido en G + C del DNA es de 69.7 mol%. El valor de hibridación DNA:DNA con respecto a *Pseudonocardia asaccharolytica* es del 38%, formando un único cluster con ella y mostrando una similaridad, según la matriz de similaridad nucleotídica, del 97.48%.

El aislado se encuentra depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de colección CECT 8030^T. "Accession number" (Gen Bank - NCBI): FR695486.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, A. y Desai, A. J. 1997. Studies on utilization of acetonitrile by *Rhodococcus erythropolis* A10. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13, 175 - 178.
- Ahn, I. S., Ghiorse, W. C., Lion, L. W. y Shuler, M. L. 1998. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. *Biotechnology and Bioengineering*. 59, 587 - 94.
- Alexander, M., 2004. Biodegradation and bioremediation. Academic Press.
- Amann, R., Ludwig, W. y Schleifer K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. 59, 143 - 169.
- Andern, E. y Lockett, W. T. 1914. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *Journal of Society of Chemical Industry*. 33: 523 - 525.
- Apajalahti, J. H. y Salkinoja-Salonen, M. S. 1987. Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Journal of Bacteriology*. 169, 675 - 681.
- Aranha, H. G. y Brown, L. R. 1981. Effect of Nitrogen Source on End Products of Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 42, 74 - 78.
- Arenskötter, M., Bröker, D. y Steinbüchel, A. 2004. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 3195 - 3204.
- Asociación Alemana de Saneamiento (AAS). 1986. Principios para el Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Refinerías de Petróleo”, reglas técnicas con respecto a la gestión de aguas residuales y desechos, Instructivo A701.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiological Reviews*. 45, 180 - 209.
- Atlas, R. M. y Bartha, R. 2008. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª edición. Editorial Pearson Addison Wesley, Madrid.
- Auffret, M., Labbé, D., Thouand, G., Greer, C. W. y Fayolle, F. 2009. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Environmental Microbiology*. 75, 7774-7782.
- Baba, T., Nishiuchi, Y. y Yano, I. 1997. Composition of mycolic acid molecular species as a criterion in *Nocardia* clasification. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 795-801.
- Bailey y Scott. 2007. Diagnostico microbiológico. Ed. Medica Panamericana S.A.
- Barrios, A., Barbot, E., Marrot, B., Moulin, P. y Roche, N. 2006. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. *Journal of Membrane Science*. 281, 288 - 296.
- Bauer, J. E. y Capone, D. G. 1985. Degradation and Mineralization of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Anthracene and Naphthalene in Intertidal Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 50, 81 - 90.

Bibliografía

- Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J. y Cristofi, N. 1998. The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*. 85, 195 - 210.
- Benavides, J., Roldan, F., Ocampo, A., Londoño, M., Pardo, A. y Perdomo, C. Efecto de la adición de nutrientes (nitrógeno y fósforo) e identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos de suelos contaminados con petróleo. (Fase I). Trabajo de grado (Ingeniera (s) ambiental). Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería ambiental. Ambiental. Bogotá, 2004.
- Bendinger, B., Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M., Moormann, M. y Klatte, S. 1995. *Gordona hydrophobica* sp. nov., isolated from biofilters from waste gas treatment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45, 544 - 548.
- Ben-Dov, E., Ben Yosef, D. Z., Pavlov, V. y Kushmaro, A. 2009. *Corynebacterium maris* sp. nov., a marine bacterium isolated from the mucus of the coral *Fungia granulosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 2458 - 2463.
- Biehle, J. R., Cavalieri, S. J., Felland, T. y Zimmer, L. 1996. Novel method for rapid identification of *Nocardia* species by detection of preformed enzymes. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 103 - 107.
- Bitton, G. 1999. *Wastewater Microbiology*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Bizet, C., Barreau, C., Harmant, C., Nowakowski, M. y Pietfroid, A. 1997. Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests ("Biotype-100" strips). *Research in Microbiology*. 148, 799 - 809.
- Blackall, L. L., y Marshall, K. C. 1988a. The mechanism of stabilization of actinomycete foams and the prevention of foaming under laboratory conditions. *Journal of Industrial Microbiology*. 4, 181 - 188.
- Blackall, L. L., Parlett, J. H., Hayward, A. C., Minikin, D. E., Greenfield, P. F. y Harbers, A. 1989. *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. *Journal of General Microbiology*. 135, 1547 - 1558.
- Blackall, L. L., Seviour, E. M., Cunningham, M. A., Seviour, R. J. y Hugenholtz, P. 1994. "*Microthrix parvicella*" is a novel, deep branching member of the actinomycetes subphylum. *Systematic and Applied Microbiology*. 17, 513 - 518.
- Blackall, L. L., Stratton, H., Bradford, D., Del Dot, T., Sjörup, C., Seviour, E. M. y Seviour, R. J. 1996. "*Candidatus Microthrix parvicella*", a filamentous bacterium from activated sludge sewage treatment plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46, 344 - 346.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. (eds.). 2001. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* 2nd ed. York, PA: Springer-Verlag, vol.1
- Brebion, G. 1973. Nuisances dues aux activites urbaines. *Encyclopedie de l'environnement. Precis General des Nuisances*. 205 pp.

- Bredholt, H., Fjærvik, E., Johnsen, G. y Zotchev, S.B. 2008. Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and biological activity. *Marine Drugs* 6(1), 12-24.
- Bref Document, 2003. Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC). Reference Document on Best Available Techniques for Mineral Oil and Gas Refineries.
- Brenner, A., Chozick, R. e Irvine, R. 1992. Treatment of a high-strength mixed phenolic waste in a SBR. *Water Environmental Research*. 64, 128 - 133.
- Briglia, M., Rainey, F. A., Stackebrandt, E., Scharaa, G. y Salkinoja-Salonen, M. S. 1996. *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-trichlorophenol. *International Journal of Systematic Microbiology*. 46, 23 - 30.
- Bull, A. T., Ward, A. C. y Goodfellow, M. 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 573 - 606.
- Bull, A. T. y Stach, J. E. 2007. Marine *Actinobacteria*: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology*, Vol. 15, No11, 491 - 499.
- Butler, W. R., Floyd, M. M., Brown, J., Toney, S., Daneshvar, M., Cooksey, R., Carr, J., Steigerwalt, A. y Charles, N. 2005. Novel mycolic acid-containing bacteria in the family *Segniliparaceae* fam. nov., including the genus *Segniliparus* gen. nov., with descriptions of *Segniliparus rotundus* sp. nov. and *Segniliparus rugosus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 1615 - 1624.
- Cardinali, S., Szulin, E. y Milani, F. 1995. TLC of mycolic acids for the identification of *Tsukamurella* and related organisms. *Actinomycetes*, vol. 6, part 3.
- Carla, A., Nicholson, M. y Fathepure, B. 2004. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 1222 - 1225.
- Casellas, M., Fernández, P., Bayona, J. M. y Solanas, A. M. 1995. Bioassay-directed Chemicals análisis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere*. 30, 725 - 740.
- Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J. y Franklin, M. 1977. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Analytical Biochemistry*. 81, 461 - 466.
- Castelli, L., Zlotnik, H., Ponti, R. y Vidotto, V. 1994. First reported *Nocardia otitidiscaviarum* infection in an AIDS patient in Italy. *Mycopathology*. 126, 131 - 136.
- Chatterjee, S. y Dutta, T. K. 2003. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Biophysical Research Communications*. 309, 36 - 43.
- Cheng, A. F. N., Yew, W. W., Chan, E. W. C., Chin, M. L., Hui, M. M. M. y Chan, R. C. Y. 2004. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48, 596 - 601.

Bibliografía

- Chi, N. S., Young, S. K., Keun, S. B., Soon, D. L., Yung, C. H., Seung, B. K. y Goodfellow, M. 1999. Mycolic acid-containing actinomycetes associated with activated sludge foam. *The Journal of Microbiology*, p. 66 - 72.
- Chicote Guerrero, E. 2004. "Análisis microbiológico de aguas radiactivas oligotróficas. Bioensuciamiento en piscinas nucleares". Tesis doctoral inédita. UPM, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Madrid.
- Choi, K. S., Kim, S. H. y Lee, T. H. 1999. Purification and characterization of biosurfactant from *Tsukamurella* sp. 26A. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9, 32 - 38.
- Chou, S, Chedore, P. y Kasatiya, S. 1998. Use of gas chromatographic fatty acid and mycolic acid cleavage product determination to differentiate among *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 577 - 579.
- Chun, J. 1995. Computer-assisted classification and identification of actinomycetes. PhD thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.
- Chun, J., Blackall, L., Kang, S., Chil Hah, Y., y Goodfellow, M. 1997. A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 127 - 131.
- Clements, W. H., Oris, J. T. y Wissing, T. E. 1994. Accumulation and food chain transfer of fluoranthene and benzo(a)pyrene in *Chironomus riparus* and *Lepomis macrochirus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26, 261 - 266.
- Collins, M. D. y Cummins, C. S. 1986. "Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1986". En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds.: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., y Holt, J. G. Baltimore: Williams and Wilkins. vol. 2, p. 1261 - 1276.
- Collins, M. D. 1987. Transfer of *Arthrobacter variabilis* (Muller) to the Genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium variabilis* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37, 287 - 288.
- Collins, M. D., Smida, J., Dorsch, M. y Stackebrandt, E. 1988. *Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38, 385 - 391.
- Cormican, M., Glennon, M., Riain, U. N. y Flynn, J. 1995. Multiplex PCR for identifying mycobacterial isolates. *Journal of Clinical Pathology*. 48, 203 - 205.
- Cuesta, G. 2004. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. Tesis Doctoral. UPV.
- Cunningham, C. y Philp, J. 2000. Comparison of Bioaugmentation and Bioestimulation in *ex situ* Treatment of Diesel Contaminated Soil. *Land Contamination and Reclamation*. 8, 261 - 269.

- Dailloux, M., Laurain, C., Weber, M. y Albert, M. 1999. Water as a source of non-tuberculous mycobacteria. *Advances in Water Resources*. 1, 115 - 123.
- De Miguel, T., Sieiro, C., Poza, M. y Villa, T. G. 2000. Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobea* MV-1 sp. nov. *International Microbiology*. 3, 107 - 111.
- Diaz, M. P., Grigson, S., Peppiatt, C. J. y Burgess, J. G. 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading wuryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Journal of Marine Biotechnology*. 2, 522 - 532.
- Diaz, E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*. 7, 173 - 180.
- Di Corcia, A., Marchese, S. y Samperi, A. 1993. Selective determination of phenols in water by a two-trap tandem extraction system followed by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 642, 175 - 184.
- Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. y Saylor, G. S. 2003. Power analysis for Real-Time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 6597 - 6604.
- Doménech, P., Jiménez, M.S., Menéndez, M. C., Bull, T. J., Samper, S., Manrique, A. y García, M. J. 1997. *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 535 - 540.
- Dorn, J. G., Frye, R. J. y Maier, R. M. 2003. Effect of temperature, pH, and initial cell number on luxCDABE and nah gene expression during naphthalene and salicylate catabolism in the bioreporter organism *Pseudomonas putida* RB1353. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 2209 - 2216.
- Drzyzga, O., Navarro, J. M., Fernández, L., García, E. y Perera, J. 2009. *Gordonia cholesterolivorans* sp. nov., a cholesteroldegrading actinomycete isolated from sewage sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 1011 - 1015.
- Duchene, Ph. 1994. Biological-foams: the cause-effect relationship, test results and combat strategy. *Water Science Technology*. 29, 239 - 247.
- Dworkin, M. (editor-in-chief), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. y Stackebrandt, E (Editors). 2006. *The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria*. Third edition. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Ed. Springer.
- Eales, K. L., Nielsen, J. L., Kragelund, C., Seviour, R. J. y Nielsen, P. H. 2003. "The *in situ* physiology of PTLO in activated sludge foams". En: *Proceedings of post-conference colloquium on Foam and Scum in Biological Wastewater Treatment. 5th September 2003, PICT, Prague, Czech Republic*.
- Eikelboom, D.H. 1975. Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research*. 9, 365 - 388.

Bibliografía

- Eikelboom, D. H. 1994. The *Microthrix parvicella* puzzle. *Water Science Technology*. 29, 271 - 279.
- Eriksson, M., Sodersten, E., Zhongtang, Y., Dalhammar, G. y Mohn, W. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 275 - 284.
- Euzéby, J. P. 2011. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet.. URL: <http://www.bacterio.net>.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Fenical, W. y Jensen P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine Actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*, vol.2, No12.
- Fernández, P., Grifoll, M., Solanas, A. M., Bayona, J. M. y Albaigés, J. 1992. Bioassay-directed Chemicals análisis of genotoxic components in coastal sediments. *Environmental Science and Technology*. 26, 817 - 829.
- Finnerty, W. R. 1992. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Review of Microbiology*. 46, 193 - 218.
- Flavio, B., Leonardo, F. y Zachia, M. 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiología*. 30 (3).
- Foot, R. J., Kocianova, E., Forster, C. F. y Wilson, A. J. 1993. An examination into the structure of stable foams formed on activated sludge plants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 56, 21 - 25.
- Forterre, P. y Philippe, H. 1999. Where is the root of the universal tree of life?. *BioEssays*. 21, 871 - 879.
- Garrity, G. M., Boone, D. R. y Castenholz, R. W. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition.
- Garrity, G. M., Johnson, K. L., Bell, J. y Searles, D. B. 2002. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition.
- Goelik, E., Müller-Hurtig, R. y Wagner, F. 1990. Influence of the glycolipid-producing bacterium *Rhodococcus erythropolis* on the degradation of a hydrocarbon mixture by an original soil population. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34, 122 - 126.
- Goddard, A. J. y Forster, C. F. 1991. Microbial lipids and stable foam formation in the activated sludge process. *Microbios*. 66, 133 - 142.
- González Pastor, J. E. 2010. La invisible diversidad microbiana. Protección de ambientes acuáticos por su interés microbiológico. Notes d'Aigua Agbar. Documentos de divulgación de la Fundación Agbar.

- Goodfellow, M. y Alderson, G. 1977. The actinomycete genus *Rhodococcus*: a home for the "rhodochrous" complex. *Journal of General Microbiology*. 100, 99 - 122.
- Goodfellow, M. 1991. Identification of some mycolic acid containing actinomycetes using fluorogenic probes based on 7-amino-4-methylcumarin and 4-methyl-umbelliferone. *Actinomycetes*. 2, 36 - 42.
- Goodfellow, M. "The family *Nocardiaceae*". 1992. En: *The Prokaryotes*. 2nd edition. Eds.: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. New York: Springer-Verlag. Chapter 5.
- Goodfellow, M., Chun, J., Stubbs, S. y Tobill, A. S. 1994. Transfer of *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona amarae* comb. nov. *Letters in Applied Microbiology*. 19, 401 - 405.
- Goodfellow, M., Davenport, R., Stainsby, F. M. y Curtis, T. 1996. Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants. *Journal of Industrial Microbiology*. 17, 268 - 280.
- Goodfellow, M., Chun, J., Blackall, L., Kang, S. y Chil Hah, Y. 1997. A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 127 - 131.
- Goodfellow, M., Stainsby, F. M., Davenport, R., Chun, J. y Curtis, T. 1998. Activated sludge foaming: The true extent of actinomycete diversity. *Water Science Technology*. 37, 511 - 519.
- Hägglom, M. M., Nohynek, L. J. y Salkinoja-Salonen, M. S. 1988. Degradation and O-methylation of chlorinated phenolic compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 3043 - 3052.
- Hall, S. J., Hugenholtz, P., Siyambalapitiya, N., Keller, J. y Blackall, L. L. 2002. The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge. *Water Science and Technology*. 46, 267 - 272.
- Hamid, M. E., Minnikin, D. E., Goodfellow, M. y Ridell, M. 1993. Thin-layer chromatographic analysis of glycolipids and mycolic acids from *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium senegalense* and related taxa. *Zentralblatt Für Bakteriologie*. 279, 354-367.
- Hartmans, S. y De Bont, J. A. M. 1992. "The genus *Mycobacterium*–Nonmedical". En: *The Prokaryotes*. 2nd edition. Eds.: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K. New York: Springer-Verlag. Chapter 52.
- Hasegawa, T., Takezawa, M. y Tanida, S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *Journal of General and Applied Microbiology*. 329, 1319-1322.
- Hecht, S. T. y Causey, W. A. 1976. Rapid method for the detection and identification of mycolic acids in aerobic actinomycetes and related bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 4, 284 - 287.

Bibliografía

- Head, I. M. y Swannell, R. P. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*. 10, 234 - 239.
- Heitkamp, M. A., Franklin, W. y Cerniglia, C. E. 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 2549 - 2555.
- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P., Miller, D.W. y Cerniglia, C. E. 1988b. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 2556 - 2565.
- Hernández, A., Hernández, A. y Galán, P. 1996. Manual de depuración URALITA: sistemas para depuración de aguas residuales en núcleos de hasta 20.000 habitantes. 3ª Edición. Editorial Paraninfo, S.A. Madrid, 427 pp.
- Hideki, K., Katsuyuki, U., Hisako, H. y Horikoshi, K. 2000. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *Journal of Bacteriology*. 182, 6451 - 6455.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T. 1994. "The Actinomycetes. Groups 22-29". En: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 605-703.
- Huang, Y., Wang, L., Lu, Z., Hong, L., Liu, Z., Tan, G. Y. A. y Goodfellow, M. 2002. Proposal to combine the genera *Actinobispora* and *Pseudonocardia* in a emended genus *Pseudonocardia*, and description of *Pseudonocardia zijingensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 977 - 982.
- Huss, V. A. R., Festl, H. y Schleifer, K. H. 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*. 4, 184 - 192.
- Iwahori, K., Tokutomi, T., Miyata, N. y Fujita, M. 2001. Formation of stable foam by cells and culture supernatant of *Gordonia (Nocardia) amarae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92, 77 - 79.
- Jenkins, D., Richard, M. G. y Daigger, G. T. 1993. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2nd ed. Michigan: Lewis Publisher, Inc.
- Jenkins, D., Richard, M. G. y Daigger, G. T. 2004. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems*. 3rd ed. London: IWA Publishing.
- Jones, A. M. 2006. Towards an Improved Taxonomy of the Genus *Rhodococcus*. D. thesis. Division of Biology, Faculty of Science, Agriculture and Engineering, University of Newcastle. 3, 108-110.
- June, M., Mneil, M. y Desmond, P. 1999. *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces, and Other Actinomycetes of Medical Importance*. *Manual of Clinical Microbiology*. 7, 370 - 392.

- Kageyama, A., Iida, S., Yazawa, K., Kudo, T., Suzuki, S., Koga, T., Saito, H., Inagawa, H., Wada, A., Kroppenstedt, R. M. y Mikami, Y. 2006. *Gordonia araii* sp. nov. and *Gordonia effusa* sp. nov., isolated from patients in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 1817 - 1821.
- Kämpfer, P., Weltin, D., Hoffmeister, D. y Dott, W. 1995. Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Water Research*. 29, 1585 - 1588.
- Kämpfer, P., Andersson, M. A. Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M. y Salkinoja-Salonen, M. 1999. *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 681 - 687.
- Kämpfer, P. y Kroppenstedt, R. M. 2004. *Pseudonocardia benzenivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 749 - 751.
- Kämpfer, P., Kohlweyer, U., Thiemer, B. y Andreesen, J. 2006. *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 1535 - 1538.
- Kanaly, R. A., Bartha, R., Watanabe, K. y Harayama, S. 2000. Rapid mineralization of benzo(a)pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 4205 - 4211.
- Kargi, F. y Dincer, A. R. 2000. Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch. *Water Environment Research*. 72, 170 - 174.
- Kästner, M., Breuer, M. y 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 359 - 362.
- Kato, N., Miyamoto, N., Shimao, M., y Sakazawa, C. 1988. 3-Hexulose phosphate synthase from a new facultative methylotroph *Mycobacterium gastri* MB19. *Agricultural and Biological Chemistry*. 52, 2659 - 2661.
- Kattar, M. M., Cookson, B. T., Carlson, L. C., Stiglich, S. K., Schwartz, M. A., Nguyen, T. T., Daza, R., Wallis, C. K., Yarfitz, S. L. y Coyle, M. B. 2001. *Tsukamurella strandjordae* sp. nov., a proposed new species causing sepsis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 1467 - 1476.
- Kerley, S. y Forster, C. F. 1995. Extracellular polymers in activated sludge and stable foams. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 62, 401 - 404.
- Khan, A. A., Kim, S. J., Paine, D. D. y Cerniglia, C. E. 2002. Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbalenii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 52, 1997 - 2002.
- Kim, S. B., Brown, R., Oldfield, C., Gilbert, S. C. y Goodfellow, M. 1999. *Gordonia desulfuricans* sp. nov., a benzothiophene-desulphurizing actinomycete. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1845 - 1851.

Bibliografía

- Kim, S. B., Brown, R., Oldfield, C., Gilbert, S. C., Iliarionov, S. y Goodfellow, M. 2000. *Gordonia amicalis* sp.nov., a novel dibenzothiophene-desulphurizingactinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 2031 - 2036.
- Kim, K. K., Lee, K. C., Klenk, H. P., Oh, H. M. y Lee, J. S. 2009. *Gordonia kroppenstedtii* sp. nov., degrading actinomycete isolated from a polluted stream. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 1992 - 1996.
- Klatte, S., Rainey, F. A. y Kroppenstedt, R.M. 1994. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordonia* as *Gordonia aichiensis* comb. nov. and *Gordonia amarae* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 769 - 773.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Altendorf, K. y Rainey, F. A. 1996. *Gordonia hirsuta* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46, 876 - 880.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, R. y Khorana, H. G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*. 56, 341 - 361.
- Konig, C., Eulberg, D., Groning, J., Lakner, S., Seibert, V., Kaschabek, S. R. y Scholomann, M. 2004. A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiology*. 150, 3075 - 3087.
- Kummer, C., Schumann, P. y Stackebrandt, E. 1999. *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1513 - 1522.
- Kurane, R., Hatamochi, K., Kakuno, T., Kiyohara, M., Tajima, T., Hirano, M. y Tamiguchi, Y. 1995. Chemical structure of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 59, 1652 - 1656.
- Lang, S. y Philp, J. C. 1998. Surface lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek*. 74, 59 - 70.
- Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine Actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. 9, 245 - 251.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Academic Press, Chichester, pp. 115-148.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A. y Allen, C. C. 2005. Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*. 16, 282 - 290.
- Laurent, F., Provost, F. y Boiron, P. 2000. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 2805 a - 2805 a. (Erratum) *Journal of Clinical Microbiology* 37, 99 - 102 (1999).
- Leahy, J. G. y Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54, 305 - 315.

- Lechevalier, M. P. y Lechevalier, H. A. 1974. *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foam activated sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24, 278 - 288.
- Lechevalier, M. P. y Lechevalier, H. A. 1980. "The chemotaxonomy of actinomycetes". En: *Actinomycete Taxonomy*, special publication 6. Arlington, VA: Society for Industrial Microbiology, p. 227 - 291.
- Le Dantec, C., Duguet, J. P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. y Vincent, V. 2002. Occurrence of *Mycobacteria* in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 5318 - 5325.
- Lee, S., Strand, S., Stensel, D. y Herwig, R. 2004. *Pseudonocardia chloroethenivorans* sp. nov., a chloroethene-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 131 - 139.
- Lemmer, H. y Baumann, M. 1988 a. Scum actinomycetes in sewage treatment plants – part 2: the effect of hydrophobic substrate. *Water Research*. 22, 761 - 763.
- Lemmer, H. y Baumann, M. 1988 b. Scum actinomycetes in sewage treatment plants – part 3: synergisms with other sludge bacteria. *Water Research*. 22, 765 - 767.
- Lévy-Frébault, V., Rafidinarivo, E., Promé, J. C., Grandry, J., Boisvert, H. y David, H. L. 1983. *Mycobacterium fallax* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33, 336 - 343.
- Li, W., Wang, M. D., Chen, H., Chen, J. M. y Shi, Y. 2006. Biodesulfurization of dibenzothiophene by growing cells of *Gordonia* sp. in batch cultures. *Biotechnology Letters*. 28, 1175 - 1179.
- Li, J., Zhao, G. Z., Zhang, Y. Q., Klenk, H. P., Pukall, R., Qin, S., Xu, L. H. y Li, W. J. 2008. *Dietzia schimae* sp. nov. and *Dietzia cercidiphylli* sp. nov., from surface-sterilized plant tissues. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 2549 - 2554.
- Linos, A., Steinbuchel, A., Sproer, C. y Kroppenstedt, R. M. 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1785 - 1791.
- Liu, Z., Wu, J., Liu, Z. y Liu, S. 2006. *Pseudonocardia ammonioxydans* sp. nov., isolated from coastal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 555 - 558.
- López, B. J., Quintero, G., Guevara, A. L., Jaimes, D. C., Gutiérrez, S. M. y Miranda, J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova: Publicación Científica* 4. 5, 82 - 90.
- Lovley, D. R. y Lonergan, D. J. 1990. Anaerobic oxidation of tolueno p-cresol and phenol by the dissimilatory iron-reducing organism GS-15. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 1858 - 1865.

Bibliografía

- Ludwig, W. y Klenk, H.-P. 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, pp. 49–65. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz y G. M. Garrity. New York: Springer.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J., 2009. *Brock, Biología de los Microorganismos*. Editorial Pearson Prentice Hall. 10ª Edición.
- Mahendra, S. y Álvarez, L. 2005. *Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1,4-dioxane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 593 - 598.
- Maldonado, L. A., Fragoso, D., Pérez, A., Rosellón, J. y Quintana, E. 2009. Actinobacterial Diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95, 111 - 120.
- Mara, D. D. 1976. *Sewage Treatment in Hot Climates*, John Wiley & Sons, Londres.
- Margesin, R., Walder, G. y Schinner, F. 2003. Biorremediation assesment of a BTEX-contaminated soil. *Acta Biotechnology*. 23, 29 - 36.
- Margulis, L. y Dolan, M. F. 2006. *Els inicis de la vida. Evolució a la Terra Precambriana*. Editorial Bromera. Publicacions de la Universitat de València.
- Marivela, C., Guerrero, C., López, L., Sánchez, V. y Toledo, A. 2002. *Metales pesados y medio ambiente*. Grupo de seminario 1 - 26. Barcelona, España.
- Martin, C. K. A. 1984. Sterols. In: K. Kieslich (Ed.) *Biotechnology, Volume 6A: Biotransformations*. Chemie Verlag. Weinheim, Germany pp. 79 - 95.
- Matera, I., Feraroni M., Kolomytseva, M., Golovleva, L., Scozzafava, A. y Briganti, F. 2010. Cathecol 1,2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crustal structures of native enzyme and catechols adducts. *Journal and Structural Biology*. 170, 548 - 564.
- Matsui, T., Noda, K., Tanaka, Y., Maruhashi, K. y Kurane, R. 2002. Recombinant *Rhodococcus* sp. Strain T09 can desulfurize DBT in the presence of inorganic sulfite. *Current Microbiology*. 45, 240 - 244.
- Maynard, J. S. y Eörs, S. 2001. Ocho hitos de la evolución. Del origen de la vida a la aparición del lenguaje. *Metatemas MT 67*. 280 pp.
- Mazierski, J. 1995. Effect of chromium (Cr^{VI}) on the growth rate of activated sludge bacteria. *Water Research*. 29, 1479 - 1482.
- McDonald, C. R., Cooper, D. G., y Zajic, J. 1981. Surface active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 41, 117 - 123.
- McNeil, M. M. y Brown, J. M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Review*. 7, 357 - 417.

- Méndez, P. D. 2002. Biodegradación anaerobia de compuestos tóxicos en aguas residuales industriales. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Ingeniería Química.
- Mendonça, S. R. 1987. *Tópicos Avançados em Sistemas de Esgotos Sanitários*, ABES, Rio de Janeiro, 259 pp.
- Metcalf, L. y Eddy, H. P. 1995. Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización. 3ª Edición. Ed. McGraw-Hill. Madrid. 1485 pp.
- Metcalf, L. y Eddy, H. P. 2000. Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Ed. Mc. Graw-Hill. New York.
- Min, G., Yuan, Q., Jiti, Z., Ang, L. y Uddin, S. 2009. Characterization of catechol 1,2-dioxygenase from cell extracts of *Sphingomonas xenophaga* QYY. *Science in China - Series B: Chemistry*. 52, 615 - 620.
- Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G. y Caldicott, A. B. 1980. Thin-layer chromatography of methanolisates of mycolic acid-containing bacteria. *Journal of Chromatography*. 188, 221 - 233.
- Nam, S. W., Chun, J., Kim, S., Kim, W., Zakrzewska-Czerwiska, J. y Goodfellow, M. 2003. *Tsukamurella spumae* sp. nov., a novel actinomycete associated with foaming in activated sludge plants. *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 367 - 375.
- Nam, S. W., Kim, W., Chun, J. y Goodfellow, M. 2004. *Tsukamurella pseudospumae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 1209 - 1212.
- Nesterenko, O. A., Nogina, T. M., Kasumova, S. A., Kvasnikov, E. I. y Batrakov, S.G. 1982. *Rhodococcus luteus* nom. nov. and *Rhodococcus maris* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32, 1 - 14.
- Nishiuchi, Y., Baba, T., Hotta, H. H. y Yano, I. 1999. Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid composition of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica* and *N. nova*. *Journal of Microbiology Methods*. 37, 111 - 122.
- Okoh, A. I. 2006. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1, 38 - 50.
- Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A., Andrews, B., Asenjo, J., Goodfellow, M. y Bull, A. T. 2009. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95, 121 - 133.
- Olson, J. B., Harmody, D. K., Bej, A. K. y McCarthy, P. J. 2007. *Tsukamurella spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a deep-water marine sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 1478 - 1481.
- Oren, A. 2004. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philosophical Transactions of The Royal Society*. 359, 623 - 638.

Bibliografía

- Pagilla, K. R., Jenkins, D. y Kido, W. H. 1996. *Nocardia* control in activated sludge by classifying selectors. *Water Environment Research*. 68, 235 - 239.
- Palla, F., Federico, C., Russo, R. y Anello, L. 2002. Identification of *Nocardia restricta* in biodegraded sandstone monuments by PCR and nested-PCR DNA amplification. *FEMS Microbiology Ecology*. 39, 85 - 89.
- Park, S. W., Park, S. T., Lee, J. E. y Kim, Y. M. 2008. *Pseudonocardia carboxydivorans* sp. nov., a carbon monoxide-oxidizing actinomycete, and an emended description of the genus *Pseudonocardia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 2475 - 2478.
- Patterson J. W. 1995. *Wastewater treatment technology*. Ann Arbor Science publishers. Ann Arbor. Michigan.
- Pham, S. A., Dé, I., Rolston, K. V., Tarrand, J. J. y Han, X. Y. 2003. Catheter related bacteremia caused by the nocardioform actinomycete *Gordonia terrae*. *Clinical Infectious Diseases*. 36, 524 – 527.
- Pidoux, O., Argenson, J. N., Jacomo, V. y Drancourt, M. 2001. Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 2634 - 2636.
- Poindexter, L. y Miller, P. 1994. In: Gibson and Saylor. 1996. *Predictability of biorremediation performance cannot be made with a High level of confidence*. American Academic of Microbiology, Washington DC, USA.
- Prauser, H., Müller, L. Y Falta, R. 1967. On the taxonomic position of the genus *Microellobosporia*, Lechevalier and Lechevalier 1963. *International Journal of Systematic Microbiology*, 17, 361 - 366.
- Prescott, J. F. 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 4, 20 - 34.
- Preuss, R., Angerer, J. y Drexler, H. 2003. Naphthalene - an environmental and occupational toxicant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 76, 556 - 576.
- Prince, R. C. 2005. *Petroleum Microbiology*. p. 317-336. Olivier, B. And Margot, M. Eds. American Society of Microbiology Press, Washington DC.
- Rainey, F. A., Klatte, S., Kroppenstedt, R. M. y Stackebrandt, E. 1995. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45, 32 - 36.
- Ramírez, G. W., Cuesta, G., Navarro, M. D., Amorós, I. y Alonso, J. L. 2005. PTLO in Spanish activated sludge foams. *Proceedings of the 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference (ASPD4) – Microbial Population dynamics in Biological Wastewater Treatment*. Editorial Advanced Wastewater Management Centre. Brisbane, Australia.

- Reh fuss, M. y Urban, J. 2005. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade cholobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Systematic and Applied Microbiology*. 28, 695 - 701.
- Reichert, K., Lipski, A., Pradella, S., Stackebrandt, E. y Altendorf, K. 1998. *Pseudonocardia asaccharolytica* sp. nov. and *Pseudonocardia sulfidoxydans* sp. nov., two new dimethyl disulfide-degrading actinomycetes and emended description of the genus *Pseudonocardia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 48, 441 - 449.
- Renaud, N. R., Aubel, D., Riegel, P., Meugnier, H. y Bollet, C. 2001. *Corynebacterium freneyi* sp. nov., α -glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 1723 - 1728.
- Rich, J., Heichen, R., Bottomley, P., Cromack, J. y Myrold, D. 2000. Community composition and functioning on denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5974 - 5982.
- Riojas, H. H., Gortares, P., Mondaca, I. Balderas, J. J. y Torres, L. G. 2010. Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diesel. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 6, 100 - 109.
- Roselló-Mora, R. y Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiological Reviews*. 25, 39 - 67.
- Rosenberg, M., Gutnick, D. y Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 9, 29 - 33.
- Rosenberg, E., R. Legmann, A. Kushmaro, R. Taube, E. Adler, y E. Z. Ron. 1992. Petroleum bioremediation - a multiphase problem. *Biodegradation*. 3, 337 - 350.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4, 406 - 425.
- Schippers, A., Bosecker, K., Spröer, C. y Schumann, P. 2005. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 655 - 660.
- Schleifer, K. H. 2004. Microbial Diversity: Facts, Problems and Prospects. *Systematic and Applied Microbiology*. 27, 3 - 9.
- Seong, C. N., Kim, Y. S., Baik, K. S., Choi, S. K., Kim, M. B., Kim, S. B. y Goodfellow, M. 2003. *Tukamurella sunchonensis* sp. nov., a bacterium associated with foam in activated sludge. *The Journal of Microbiology*. 41, 83 - 88.
- Seviour, E. M., Williams, C., DeGrey, B., Soddell, J. A., Seviour, R. J. y Lindrea, K. C. 1994. Studies on filamentous bacteria from Australian activated sludge plants. *Water Research*. 28, 2335 - 2342.

Bibliografía

- Seviour, R. J. y Blackall, L. L. (Eds). 1998. *The microbiology of activated sludge*. London: Chapman & Hall.
- Shen, F. T., Lin, J. L., Huang, C. C., Ho, Y. N., Arun, A. B., Young, L. S. y Young, C. C. 2009. Molecular detection and phylogenetic analysis of the catechol 1,2-dioxygenase gene from *Gordonia* spp. *Systematic and Applied Microbiology*. 32, 291 - 300.
- Shirling E. B. y Gottlieb, D. 1966. Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16, 317 - 327.
- Shokrollahzadeh, S., Azizmohseni, F., Golmohammad, F., Shokouhi, H. y Khademhaghighat, F. 2008. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran. *Bioresource Technology*. 99, 6127 - 6133.
- Silva, R., Abad, G., Abalos, A., Marañón, A. y Bermúdez, R. 2003. Biodegradación de naftaleno por *Pseudomonas aeruginosa*. *Tecnología Química Vol. XXIII, No.3*.
- Siron, R., Pelletier, E. y Brochu, C. 1995. Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 28, 406 - 416.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. (eds.). 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams y Wilkins, vol.2.
- Soddell, J. A. y Seviour, R. J. 1990. A review: microbiology of foaming in activated sludge plants. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, 145 - 176.
- Soddell, J. A., Stainsby, F. M., Eales, K. L., Kroppenstedt, R. M., Seviour, R. J. y Goodfellow, M. 2006. *Millisia brevis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 739 - 744.
- Sokolovská, I., Rozenberg, R., Riez, C., Rouxhet, P. G., Agathos, S. N. y Wattiau, P. 2003. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 7019 - 7027.
- Solanas, A. M. 2009. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la zona no saturada del suelo*. Vol IX.
- Speight, J. G. 1991. *The chemistry and technology of petroleum*. John Wiley and Sons. New York.
- Stackebrandt, E., Smida, J. y Collins, M. D. 1988. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). *Journal of General and Applied Microbiology*. 34, 341 - 348.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. y Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 479 - 491.
- Stackebrandt, E. y Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standars. *Microbiology Today*, pp: 152 - 155.

- Stainsby, F. M., Soddell, J., Seviour, R., Upton, J. y Goodfellow, M. 2002. Dispelling the “*Nocardia amarae*” myth: a phylogenetic and phenotypic study of mycolic acid-containing actinomycetes isolated from activated sludge foam. *Water Science and Technology*. 46, 81 - 90.
- Staneck, J. L. y Roberts, G. D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Journal of Applied Microbiology*. 28, 226 - 231.
- Steingrube, V. A., Brown, B. A., Gibson, J. L., Wilson, R. W., Brown, J., Blacklock, Z., Jost, K., Locke, S., Ulrich, R. F. y Wallace, R. J., Jr. 1995. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 3096 - 3101.
- Stratton, H. M., Seviour, R. J. y Soddell, J. A. 1993. Effect of culture conditions on cell surface hydrophobicity of nocardioforms. *Actinomycetes*. 4, 41 - 46.
- Stratton, H. M., Seviour, R. J., Soddell, J. A., Blackall, L. L. y Muir, D. 1996. The opportunistic pathogen *Nocardia farcinica* is a foam-producing bacterium in activated sludge plants. *Letters in Applied Microbiology*. 22, 342 - 346.
- Stratton, H., Seviour, R. y Brooks, P. 1997. “Activated sludge foaming: what causes hydrophobicity and can it be manipulated to control foaming?” En: *Proceedings 2nd Int. Conf. on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Berkeley, California, p. 293-300.
- Sunairi, M., Iwabuchi, N., Yoshizawa, Y., Murooka, H., Morisaki, H. y Nakajima, M. 1997. Cell-surface hydrophobicity and scum formation of *Rhodococcus rhodochrous* strains with different colonial morphologies. *Journal of Applied Microbiology*. 82, 204 - 210.
- Sutcliffe, I. C. 1998. Cell envelope composition and organization in the genus *Rhodococcus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 74, 49 - 58.
- Táncsics, A., Szoboszlai, S., Kriszt, B., Kukolya, J., Baka, E., Márialigeti, K. y Révész, S. 2007. Applicability of the functional gene cathecol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. *Journal of Applied Microbiology*. 105, 1026 - 1033.
- Tay, S. T. L., Hemond, F. H., Polz, M. F., Cavanaugh C. M., Dejesus, I. y Krumholz, L. R. 1998. Two new *Mycobacterium* strains and their role in toluene degradation in a contaminated stream. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 1715 - 1720.
- Téllez, J. y Valderrama, B. 2000. Microbiología del petróleo y sus derivados. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Theilleux, J. “Capítulo 6: Los Actinomicetos”. 2000. En: Leveau, J. Y. and Bouix, M. *Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial*. Zaragoza, España: Ed. Acribia, p. 417 - 478.

Bibliografía

- Thomas, J. A., Soddell, J. A. y Kurtböke, D. I. 2002 Fighting foam with phages? *Water Science Technology*. 46, 511 - 518.
- Torres, R. D. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Facultad de agronomía, Postgrado Ciencias del Suelo, Universidad Central de Venezuela.
- Torvinen, E., Suomalainen, S., Lehtola, M. J., Mirttinen, I. T., Zacheus, O., Paulin, L., Katila, M. L. y Martikainen, P. J. 2004. *Mycobacteria* in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 1973 - 1981.
- Tsukamura, M. 1971. Proposal of a new genus, *Gordona*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. *Journal of General Microbiology*. 68, 15 - 26.
- Tsukamura, M. 1982. Numerical analysis of the taxonomy of *Nocardiae* and *Rhodococci*. *Microbiology and Immunology*. 26, 1101 - 1119.
- Tsukamura, M., Van Der Meulen, H. J. y W. O. K. 1983. Numerical Taxonomy of Rapidly Growing, Scotochromogenic *Mycobacteria* of the *Mycobacterium parafortuitum* Complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. nov. and *Mycobacterium diemhoferi* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33, 460 - 469.
- Uotila, J. S., Kitunen, V. H., Apajalahti, J. H. A. y Salkinoja-Salonen, M. S. 1992. Environment-dependent mechanisms of dehalogenation by *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38, 408 - 412.
- Urakami, T. y Yano, I. 1989. Methanol-utilizing *Mycobacterium* strains isolated from soil. *Journal of General and Applied Microbiology*. 35, 125 - 133.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Reviews*. 60, 407-438.
- Van der Geize, R. y Dijkhuizen, L. 2004. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Current Opinion in Microbiology*. 7, 255 - 261.
- Van Hamme, J. D. y Ajay, S. 2000. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67, 503 - 549.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. y Ward, O. P. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biological Reviews*. 67, 503 - 549.
- Vázquez, M. D., Barceló, J., Poschenrieder, C., Madico, J., Hatton, O., Baker, A. J. M. y Cope, G. H. 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caurulescens*, a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plants Physiology*. 140, 350 - 355.

- Veselý, M., Knoppová, M., Nesvera, J. y Pátek, M. 2007. Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 76, 159 - 168.
- Viñas, M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis de Doctorado. Barcelona, 352 pp.
- Volcy, C. 2004. Lo malo y lo feo de los microbios. Primera Edición. Ed. Universidad Nacional de Colombia. ISBN 958-701-4.
- Wagner, F., Behrendt, U., Bock, H., Kretschmer, A., Lang, S. y Syltatk, C. 1983. Production and chemical characterisation of surfactants from *Rhodococcus erythropolis* and *Pseudomonas* sp. MUB grown on hydrocarbons. In: J. E. Zajic, D. G. Cooper, T. R. Jack, and N. Kosaric (Eds.) *Microbial Enhanced Oil Recovery*. Penn Well. Tulsa, OK. 55 - 60.
- Waksman, S. A., y Woodruff, H. B. 1941. *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*. 42, 231 - 249.
- Waksman A. S. y Henrici, T.A. 1943. The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*. 46, 337 - 341.
- Wallace, R. J., Tsukamura, M., Brown, B. A., Brown, J., Steingrube, V. A., Zhang, Y. y Nash, D. R. 1990. Cefotaxime-resistant *Nocardia asteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 2726 - 2732.
- Wang, Y. N., Chi, C. Q., Cai, M., Lou, Z. Y., Tang, Y. Q., Zhi, X. Y., Li, W. J., Wu, X. L. y Du, X. 2010. *Amycoliticoccus subflavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 638 - 643.
- Warhurst, A. W. y Fewson, C. A. 1994. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 14, 29 - 73.
- Warwick, S., Bowen, T., McVeigh, H. y Martin Embley, T. 1994. A phylogentic analysis of the family *Pseudonocardiaceae* and the genera *Actinokineospora* and *Saccharothrix* with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in a emended genus *Pseudonocardia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 293 - 299.
- Wauters, G., Avesani, V., Charlier, J., Janssens, M., Vaneechoutte, M. y Delmée, M. 2005. Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 2624 - 2628.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. y otros 9 autores. 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37, 463 - 464.
- Wick, L. Y., Wattiau, P. y Harms, H. 2002. Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of *Mycobacteria*. *Environmental Microbiology*. 4, 612 - 616.

Bibliografía

- Wild, S. R., Harrad, S. J. y Jones K. C. 1993. Chlorophenols in digested U.K. sewage sludges. *Water Research*. 27, 1527 - 1534.
- Williams, S. T., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. (eds.) 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. 51, 221 - 271.
- Xue, Y., Sun, X., Zhou, P., Liu, R., Liang, F. y Ma, Y. 2003. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 1643 - 1646.
- Yamamura, H., Hayakawa, M., Nakagawa, Y. y Limura, Y. 2004. Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitats on the basis of repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 3149 - 3151.
- Yassin, A. F., Kroppenstedt, R. M. y Ludwig, W. 2003. *Corynebacterium glaucum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 705 - 709.
- Yassin, A. F., Shen, F. T., Hupfer, H., Arun, A. B., Lai, W. A., Rekha, P. D. y Young, C. C. 2007. *Gordonia malaquae* sp. nov., isolated from sludge of a wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 1065 - 1068.
- Yassin, A. F., Young, C. C., Lai, W. A., Hupfer, H., Arun, A. B., Shen, F. T., Rehka, P. D. y Ho, M. J. 2007. *Williamsia serinedens* sp. nov., isolated from a oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 558 - 561.
- Yokota, A., Takeuchi, M. y Weiss, N. 1993. Proposal of Two New Species in the Genus *Microbacterium*: *Microbacterium dextranolyticum* sp. nov. and *Microbacterium aurum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 431, 549 - 554.
- Yoong, E. y Lant, P. 2001. Biodegradation of high strength phenolic wastewater using SBR. *Water Science Technology*. 43, 299 - 306.
- Zaitsev, G. M., Tsitko, I. V., Lobanok, A. G., Vazhinskaja, I. S. y Chechenin, V. P. 1993. Utilization of halogenated benzenes by *Rhodococcus rhodochrous*. *Dokl. Akad. Nauk Beloruss. SSR*. 37, 65 - 68.
- Zhang, Y. Q., Liu, H. Y., Chen, J., Yuan, L. J., Sun, W., Zhang, L. X., Zhang, Y. Q., Yu, L. Y. y Li W. J. 2010. Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai-Tibet plateau, China. *Antonie van Leeuwenhoek*. 213 - 223.
- Zhi, X. Y., Li, W. J. y Stackebrandt, E. 2009. And update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 589 - 608.
- Zornoza, A., Reina, E. y López, R. F. 2008. Control microbiológico operacional en el tratamiento de aguas de la industria fenol-acetona y síntesis de aminos. V Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo. ISBN: 978-84-613-0712-8.

Direcciones y páginas web de interés:

- Nacional Center for Biotechnology Information (USA): www.ncbi.nlm.nih.gov/
- GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/
- BLAST: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Anexo 1 – Medios de cultivo empleados

Composición de los medios de cultivo empleados referida a un litro de agua destilada.

Medio ISP-2

Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Dextrosa	4 g
Agar	20 g
pH	7.0

Medio GYEA

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
Agar	18 g
pH	7.0

Medio CZAPEK modificado

NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
Sacarosa	30 g
Extracto de levadura	2 g
Agar	18 g
pH	7.2

Medio SAUTON

Asparagina	5 g
Casaminoácidos	2 g
Glucosa	15 g
Citrato sódico	1.5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
K ₂ SO ₄	0.5 g
Citrato amónico férrico	0.01 g
Agar	18 g
Tiamina	0.05 g
Ácido nalidíxico	0.02 g
pH	7.2

Anexo 1 – Medios de cultivo empleados

Medio BASAL WILLIAMS

Extracto de levadura	3 g
Citrato amonio-ferroso	0.05 g
Agar	18 g
pH	7.2

Medio STEVENSON

Solución 10X

Base levadura nitrogenada	67 g
Casaminoácidos	0.1 g
Agua destilada	1 l

Solución A

Fosfato dipotásico (10%)	200 ml
--------------------------	--------

Medio completo

Solución 10X + Solución A	100 ml
Agar fundido	800 ml
Fuente carbono y/o nitrógeno tindalizada	100 ml

Medio M9

Na ₂ HPO ₄	7 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
CaCl ₂	0,02 g
MgSO ₄	0,2 g
Agar	18 g

Medio MSM

KH ₂ PO ₄	1.4 g
K ₂ HPO ₄	1.7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
NH ₄ NO ₃	1.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 mg
Agar	18 g

Anexo 1 – Medios de cultivo empleados

Medio BHM

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.02 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NH ₄ NO ₃	1 g
FeCl ₃ (solución 60%)	2 gotas
Agar	18 g

Anexo 2 – Soluciones, Reactivos y Material de Identificación para PCR

Tampón TE

Tris-CHI 10mM, EDTA 1mM

Solución RNAsa

RNAsa A (Boehringer)	5 mg
NaCl 1M	15 ml
Tris 1M (pH 8.3)	6 ml
EDTA 0.5M	1.5 ml
Agua MilliQ	77 ml

Calentar a 100°C durante 5 min. para inactivar las DNAsas y enfriar. Conservar a –20°C.

Tampón TAE 10X

Tris base	48,4 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7,44 g
Ácido acético glacial	11,42 ml
Agua MilliQ	1000 ml
pH	8,5

Gel de Agarosa

Agarosa D-1 Media EEO (Pronadisa)
Agarosa D-1 Alta EEO (Pronadisa)
Solución de bromuro de etidio 10 mg/ml (IBERLABO)

Pesar la agarosa (1-2%) y transferir a un matraz, añadir el tampón TAE 1X, calentar hasta que rompa a hervir, agitar y atemperar hasta 50°C. Añadir 3µl de bromuro de etidio por cada 50 ml de agarosa y verter en el molde.

Marcadores de pesos moleculares

Lambda DNA/HindIII (IBERLABO)

Low Range III	10µl
Tampón de carga	20µl
Agua MilliQ estéril	90µl

100pb DNA Ladder (IBERLABO)

Marcador L-101	50µl
Tampón TE	750µl
Tampón de carga	200µl

Anexo 3 – Términos y Abreviaturas empleadas

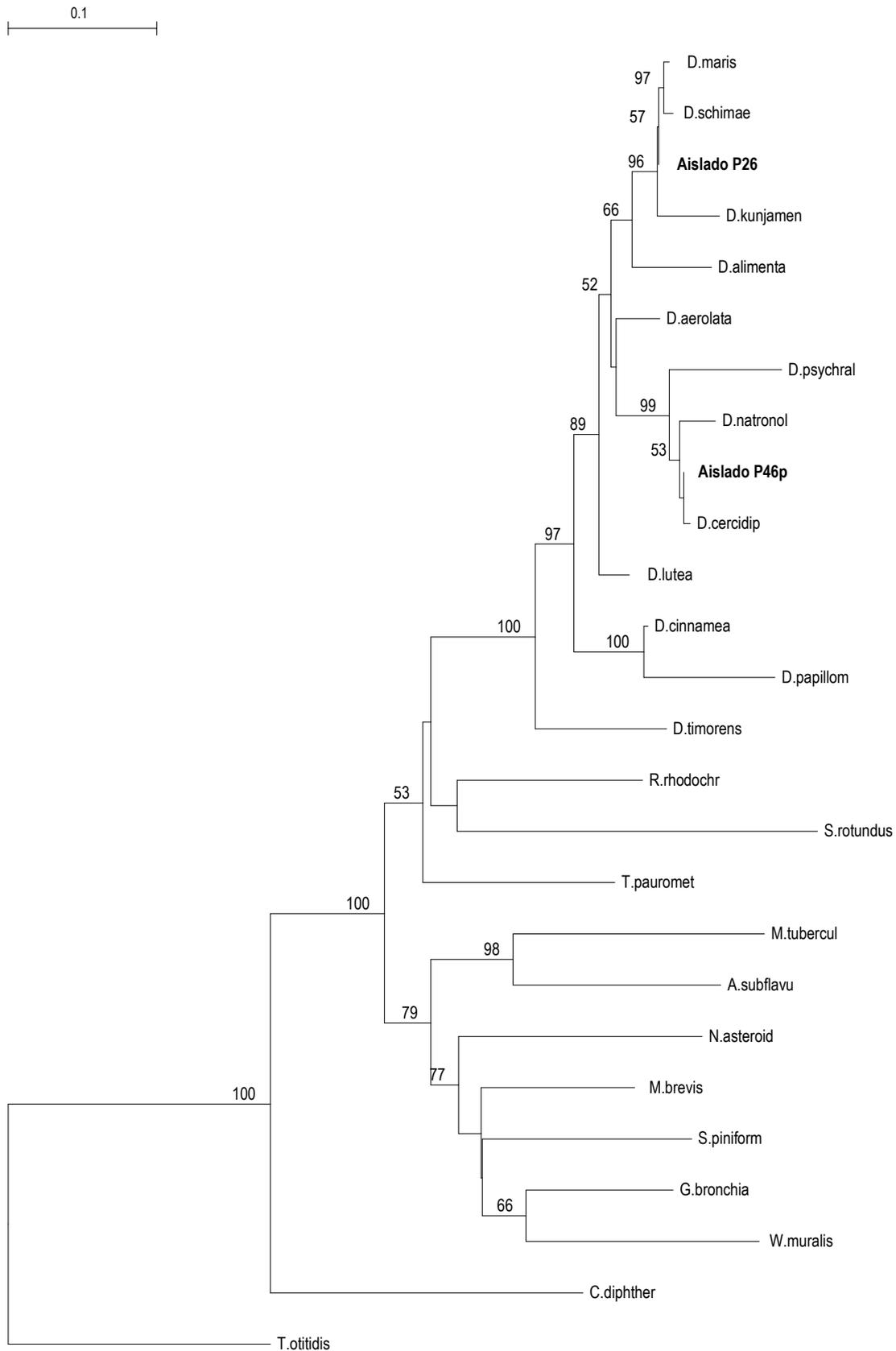
Mycolata	Actinomicetos nocardioformes que contienen ácidos micólicos
“Foam”	Espumas biológicas producidas por mycolata en fangos activos
“Foaming”	Producción de espumas biológicas por mycolata
“Bulking”	Aumento de volumen de los sólidos en suspensión producido por bacterias filamentosas
API	Instituto Americano del Petróleo
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAP	Ácido diaminopimélico
DNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDAR	Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales
EDARI	Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales Industriales
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAE	Fango Activo en Exceso
FAR	Fango Activo Recirculado
g	Gramo
G + C	Contenido en Citosina + Guanina
GALO	<i>Gordonia amarae</i> -Like Organism
GYEA	Glucose Yeast Extract Agar
HAP	Hidrocarburo Aromático Policíclico
IBMCP	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
IVF	Índice Volumétrico de Fango
ml	Mililitro
NALO	<i>Nocardia amarae</i> -Like Organism
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTLO	Pine Tree-Like Organism
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribosómico
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
TAE	Tris-acético-EDTA
TBAH	Hidróxido de Tetrabutil Amonio
TE	Tris-EDTA
TLC	Thin Layer Chromatography
UPV	Universitat Politècnica de València
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
V	Voltio
WCS	Wall Cell Sugar
µl	Microlitro
µm	Micrometro

Anexo 4 – Árbol filogenético completo género *Corynebacterium*



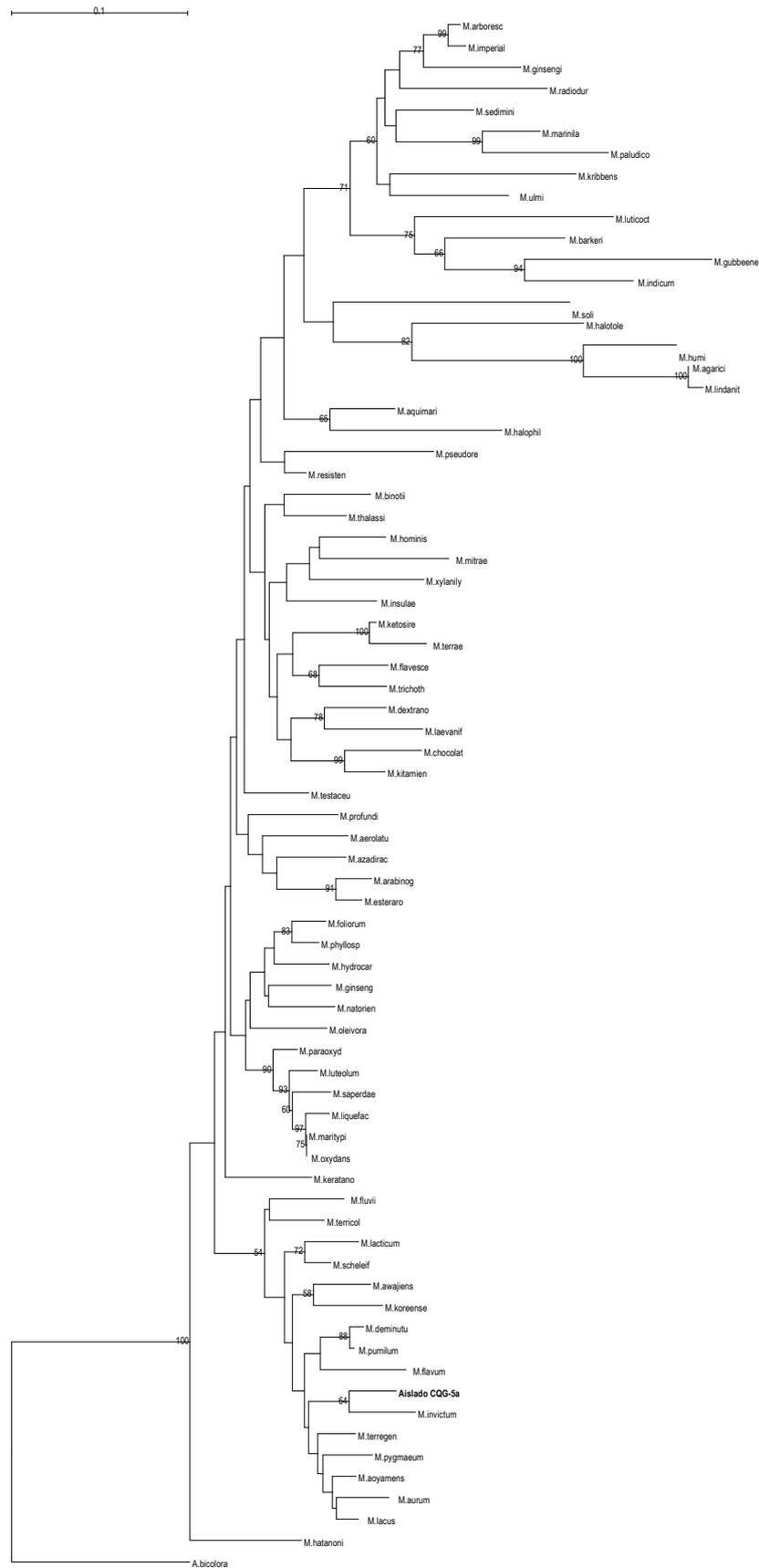
Árbol filogenético completo del género *Corynebacterium* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

Anexo 5 – Árbol filogenético completo género *Dietzia*



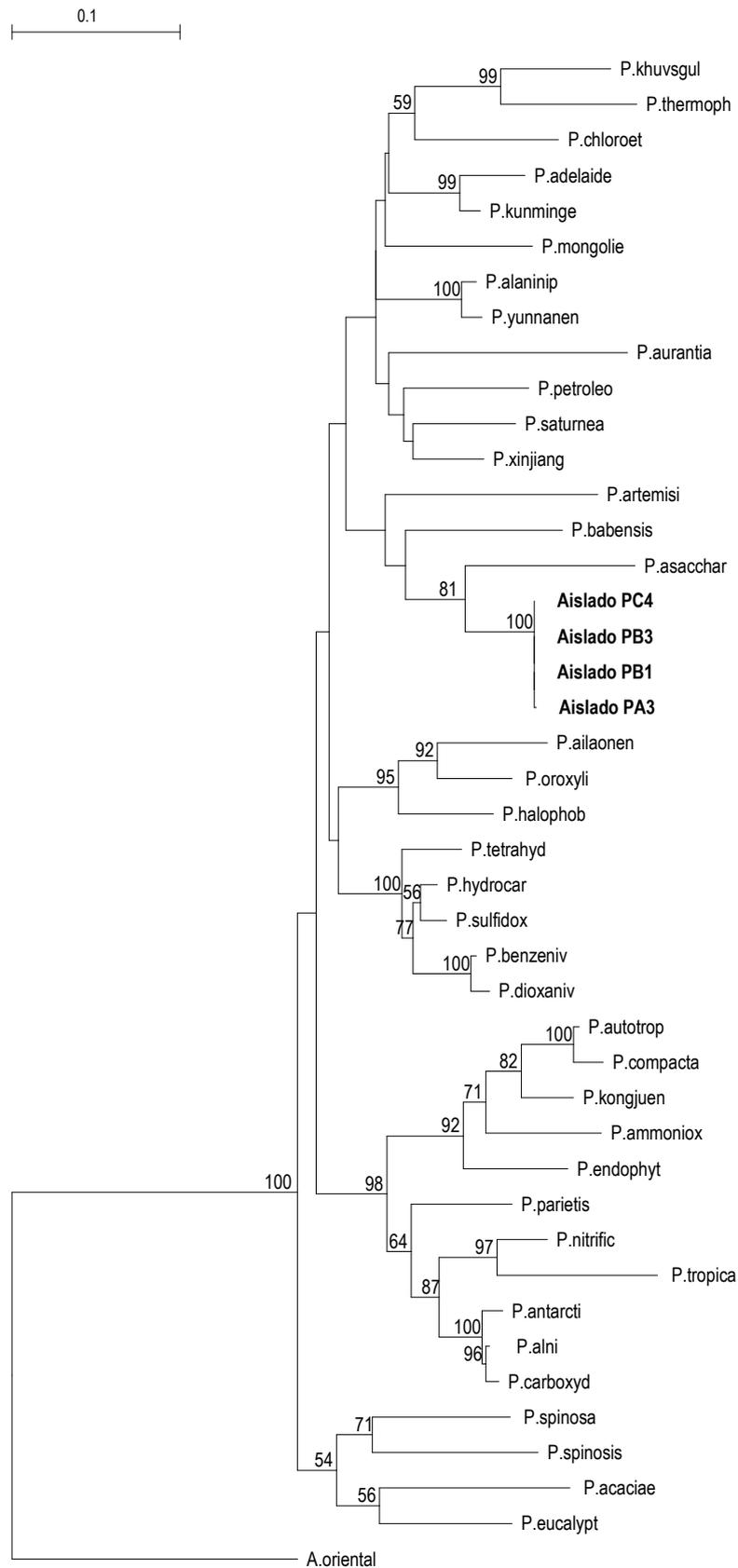
Árbol filogenético completo del género *Dietzia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Anexo 7 – Árbol filogenético completo género *Microbacterium*



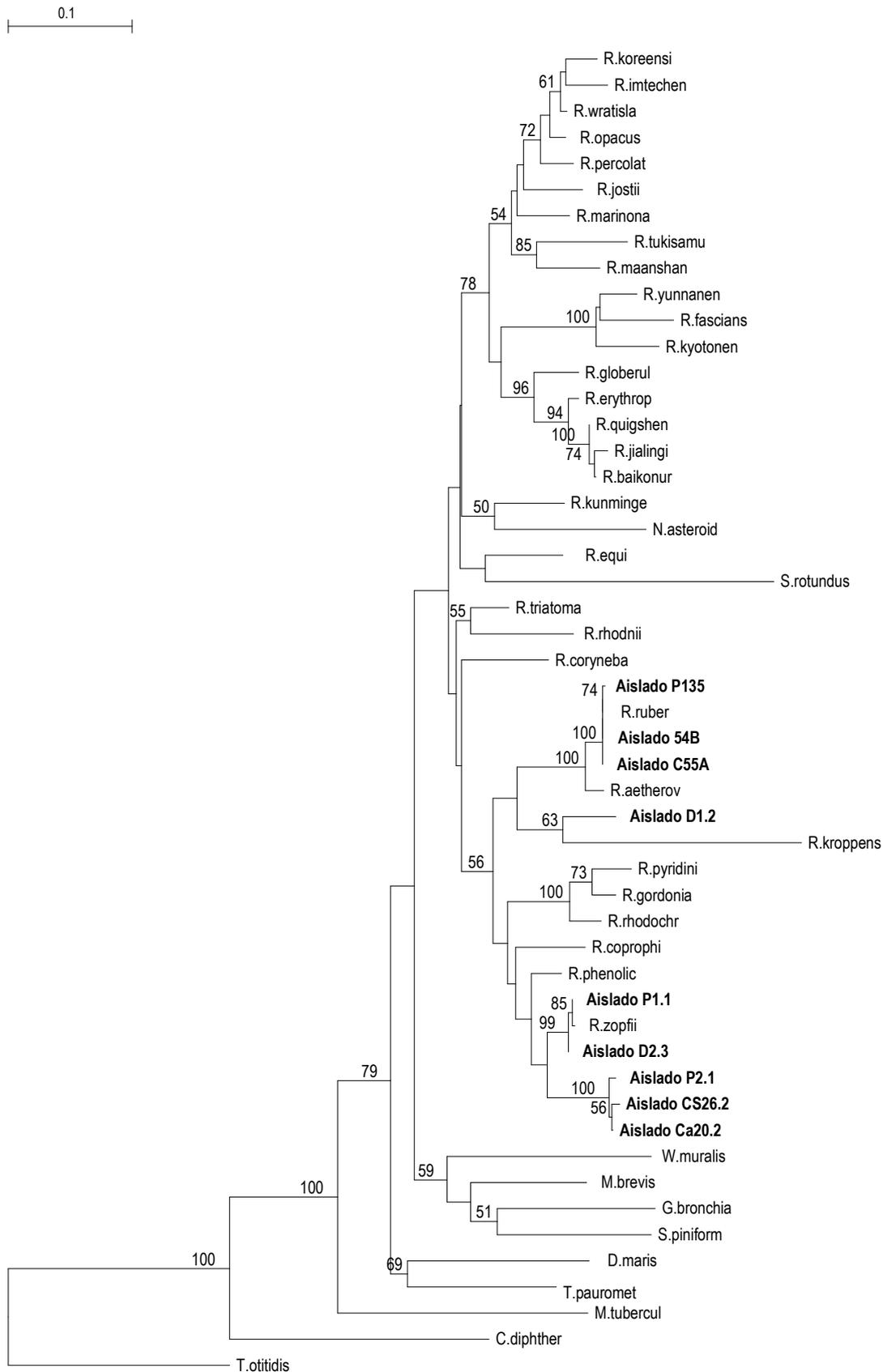
Árbol filogenético completo del género *Microbacterium* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Anexo 9 – Árbol filogenético completo género *Pseudonocardia*



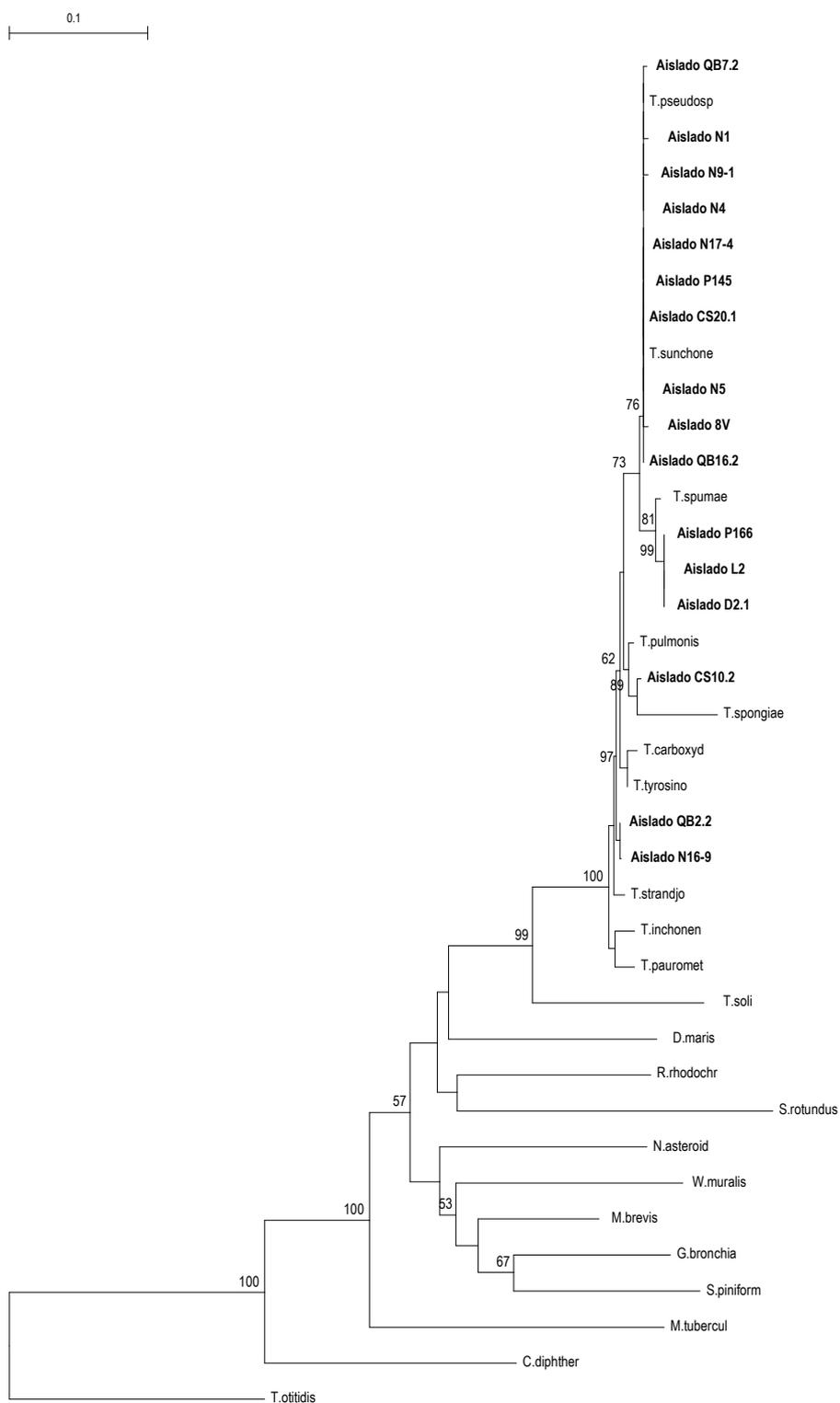
Árbol filogenético completo del género *Pseudonocardia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Anexo 10 – Árbol filogenético completo género *Rhodococcus*



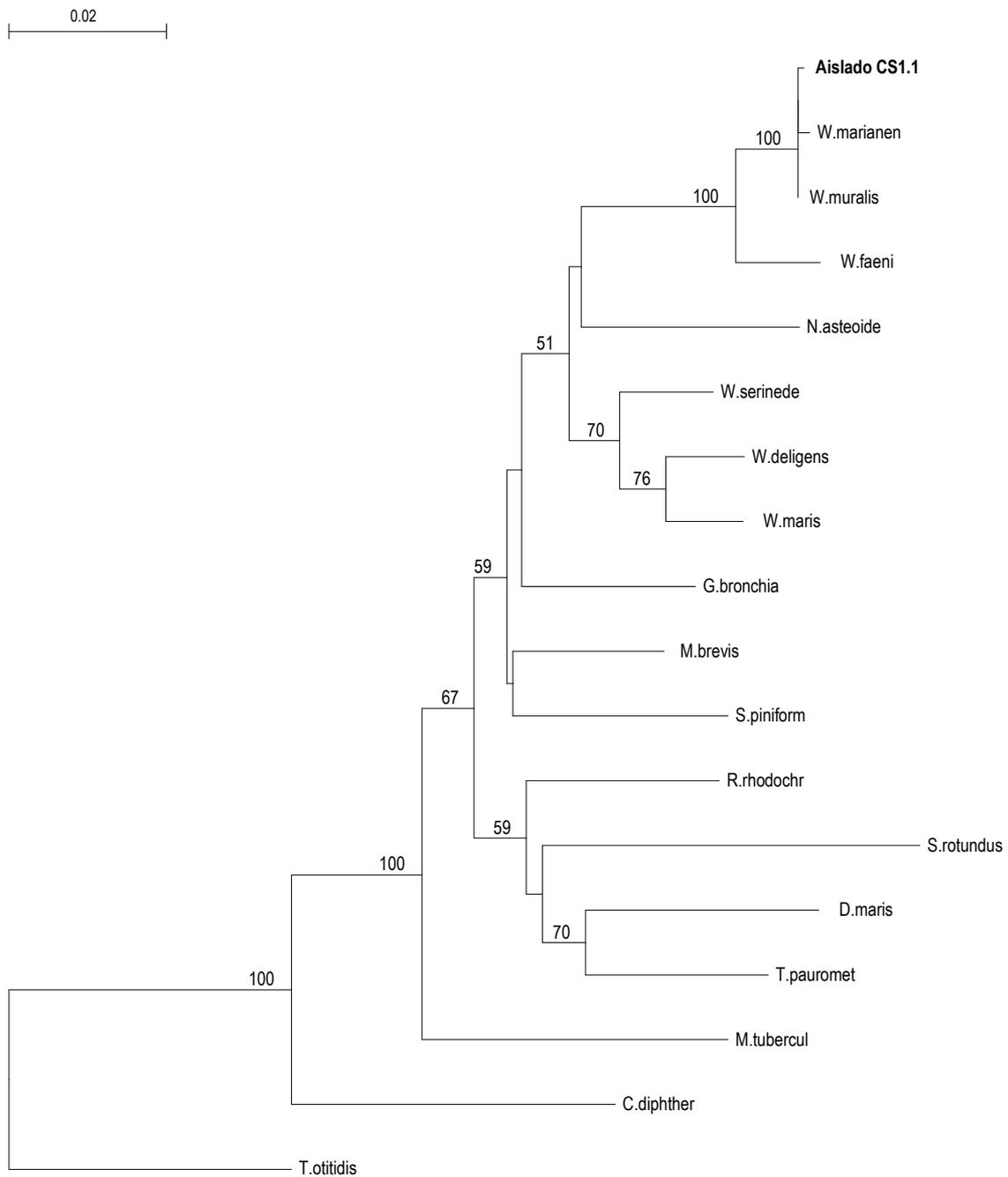
Árbol filogenético completo del género *Rhodococcus* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Anexo 11 – Árbol filogenético completo género *Tsukamurella*



Árbol filogenético completo del género *Tsukamurella* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.

Anexo 12 – Árbol filogenético completo género *Williamsia*



Árbol filogenético completo del género *Williamsia* basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de "bootstrap" significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.