



Remediación de aguas contaminadas con hidrocarburos clorados (TCE) mediante bioaumentación y nanopartículas de hierro cero valente

Trabajo de Fin de Máster por:

Ana Belén Muñiz González

Fecha: 21/07/2015

Máster en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud

TRABAJO FIN DE MASTER

Remediación de aguas contaminadas con hidrocarburos clorados (TCE) mediante bioaumentación y nanopartículas de hierro cero valente

21 de Julio de 2015

Estudiante:

Ana Belén Muñiz

Firma

Tutora:

Ana Isabel Peláez Andrés



Firma

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de varias personas y así quiero agradecerse.

En primer lugar a la Doctora Ana Isabel Peláez Andrés por haberme acogido en su laboratorio para el desarrollo tanto del Practicum I y II así como durante el desarrollo del trabajo fin de máster, gracias por su asesoramiento y ayuda en el proceso. Agradecer al Doctor Jesús Sánchez todas sus aportaciones siempre interesantes durante todo el proceso, y por esclarecer dudas en todo momento.

Al Doctor José Luis Rodríguez Gallego por haberme dado la posibilidad de llegar a este grupo de Biotecnología Ambiental y Geoquímica de la Universidad de Oviedo y por tener siempre una palabra de ánimo.

A Victoria y Alejandra porque sin su ayuda gran parte de este trabajo no habría sido posible, y gracias por animarme en los días más difíciles. A Luis por resolver mis dudas y ayudarme cuando era necesario.

A mi madre por haber confiado siempre en mí y haberme apoyado incluso cuando yo no creía, sin ti todo esto no habría llegado a su fin.

A Miguel por ser el mejor compañero de viaje, por ayudarme, apoyarme y entenderme.

A los que no están, mi abuelo y mi padre, porque sin ellos no sería quien soy ni habría sido capaz de luchar día a día, gracias por todo lo que me enseñasteis y por la fuerza que me llega.

RESUMEN

La descontaminación de terrenos y aguas subterráneas mediante técnicas sostenibles ha sido un tema de recurrente importancia en los últimos años, de ahí que hayan surgido diversas aproximaciones de biorremediación con la perspectiva de desarrollar mecanismos de menor coste y menos agresivos con el medio ambiente. Siguiendo dicha corriente en el presente trabajo se han explorado estrategias de biorremediación para la degradación del compuesto organoclorado tricloroetileno (TCE), mediante la utilización de bacterias seleccionadas previamente. Para ello se han desarrollado cultivos de enriquecimiento con TCE como única fuente de carbono, con el fin de obtener cepas degradadoras de TCE. La dinámica de las poblaciones bacterianas a lo largo de los diferentes pases de cultivo se ha estudiado mediante técnicas moleculares de DGGE y se han aislado 24 bacterias que se han identificado mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S. Posteriormente hemos seleccionado tres bacterias, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y una bacteria del orden Sphingomonadales, estudiándose la degradación del TCE por las mismas, en presencia y ausencia de diversos cometabolitos previamente descritos por otros autores. Para potenciar el efecto degradativo y acortar los tiempos de tratamiento, hemos propuesto combinar la acción de las bacterias citadas y de otras 2 cepas procedentes del enriquecimiento, del género *Bacillus* y *Agrobacterium*, con la de nanopartículas (NPs) de hierro cerovalente (nZIV). Con este objetivo procedimos al análisis de la sensibilidad de las bacterias a las NPs, comprobándose que eran notablemente resistentes a las mismas. A partir de estos resultados se propone una estrategia de degradación combinada que consiste en la adición de NPs a los sustratos contaminados, seguida a las 24 horas de la adición de una o varias de las bacterias seleccionadas. De esta forma se conseguirá una eliminación más rápida y efectiva, tanto del TCE como de intermediarios potencialmente nocivos para el medio ambiente.

Palabras clave: biorremediación, bioaugmentación, TCE, cometabolismo, nZIV, enriquecimiento, DGGE

ABSTRACT

The decontamination of land and groundwater using sustainable techniques has been a recurring theme in importance in recent year. There have been a number of approaches to bioremediation with a view to developing mechanisms for lower cost and less aggressive to the environment. Following this current in this paper we have explored bioremediation strategies for the degradation of organochlorine compound trichlorethylene (TCE), using previously select bacteria. Firstly, enrichment cultures were developed with TCE as sole carbon source, in order to obtain strains degrading TCE. The dynamics of bacterial along different culture passages populations has been studied using molecular techniques DGGE and 24 have been isolated bacteria were identified by sequencing the 16S ribosomal gene. We have subsequently selected five bacteria belonging to the *Pseudomonas*, *Rhodococcus* genus and a bacteria of Sphingomonadales order, so we have studied the degradation of TCE by them, in the presence and absence of various cometabolites previously described by other authors. To enhance the degradative effect and shorten treatment times, we proposed combining the action of bacteria cited and 2 bacteria obtained from the enrichment, *Bacillus*, *Agrobacterium* genus, with the nanoparticles (NPs) of zero-valent iron (nZIV). With this objective we proceeded to the analysis of the sensitivity of bacteria to NPs, proving that were remarkably resistant to them. From these results combined degradation strategy consisting in adding to contaminated NPs, followed within 24 hours of the addition of one or more of the selected bacteria proposed substrates. In this way a more rapid and effective removal of both the TCE as intermediaries potentially harmful to the environment will be achieved.

Keywords: bioremediation, bioaugmentation, TCE, cometabolism, nZIV, enrichment, DGGE.

ABREVIATURAS

HACs	Hidrocarburos Alifáticos Clorados
TCE	Tricloroetileno
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
COVs	Compuesto Halogenado Orgánico Volátil
1,1-DCE	1,1-Dicloroetileno
cis-1,2-DCE	Cis-1,1-Dicloroetileno
trans-1,2-DCE	Trans-1,2-Dicloroetileno
nZIV	Nanopartículas de Hierro Cerovalente
NPs	Nanopartículas
PCBs	Bifenilos Policlorados
BH	Bushnell Haas
TSB	Tryptic Soy Broth
MM	Medio Mineral
rpm	Revoluciones por minuto
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DGGE	Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
UV	Ultravioleta
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
TBE	Tris-Borato-EDTA
EDTA	Ácido etilen diamino tera-acético
NCBI	National Center for Biotechnology Information
TAE	Tris-acetato-EDTA
IP	Ioduro de Propidio

ÍNDICE

ÍNDICE	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Antecedentes.....	9
1.2 El TCE y su problemática medioambiental.....	9
1.3 El TCE y sus efectos sobre la salud.....	10
1.4 La Biorremediación: generalidades y aplicación en zonas contaminadas con HACs	10
1.5 Aplicación de la biorremediación en el caso del TCE.....	12
1.6 Nanopartículas de hierro cerovalente (nZIV)	14
1.7 Objetivos	16
2. MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.1 Medios de cultivo	17
2.1.1 Crecimiento bacteriano y experimentación	17
2.1.2 Conservación de cepas bacterianas	18
2.2 Métodos de análisis microbiológico	19
2.2.1. Aislamiento de microorganismos degradadores de TCE mediante técnicas de enriquecimiento selectivo	19
2.2.2 Amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 16S	19
2.2.3 Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	20
2.2.4 Identificación y secuenciación de las bacterias cultivables	20
2.2.5 Conservación de bacterias.....	21
2.2.6 Análisis de las poblaciones bacterianas mediante DGGE.....	21
2.3 Degradación de TCE.....	23
2.3.1 Análisis de la degradación de TCE mediante cometabolismo bacteriano	23
2.3.2 Degradación de TCE mediante la combinación de nanopartículas de hierro cero valente y bacterias.....	23
2.3.3 Análisis de la viabilidad bacteriana.....	24
2.4 Análisis químico del TCE.....	26
2.5 Análisis estadístico de la degradación de TCE mediante cometabolismo	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
3.1 Estudio microbiológico	27
3.1.1 Aislamiento e identificación de las bacterias cultivables procedentes de cultivos de enriquecimiento en presencia de TCE.	27

3.2 Degradación de TCE.....	33
3.2.1 Análisis de la degradación de TCE mediante cometabolismo bacteriano	33
3.2.2 Degradación de TCE mediante combinación de nanopartículas nZVI y bacterias.	43
4. CONCLUSIONES	47
5. REFERENCIAS:.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La actividad antropogénica ha sido fuente de generación de compuestos tóxicos a lo largo del tiempo, algunos de los cuales presentan un elevado poder recalcitrante, lo cual dificulta su eliminación del medio. Esta alteración del medio ambiente se ha convertido en un tema recurrente en el presente siglo, de modo que diversos estudios se han enfocado en discernir las metodologías óptimas (Institute of Environmental Health Sciences, USA; University of Massachusetts) para recuperar, en la medida de lo posible, las condiciones iniciales del medio, lo que hace necesario conocer las familias responsables de dicha contaminación. Concretamente, la contaminación de suelos y aguas derivada de la utilización de hidrocarburos alifáticos clorados (HACs) como el diclorometano, cloroformo y de forma destacable el tricloroetileno (TCE) ha comenzado a ser un problema de índole mundial, siendo más acentuado en zonas como Indonesia, India y China. En estos lugares, la contaminación de las aguas subterráneas por TCE (Ordóñez, 2001) ha elevado el nivel de alerta de tal manera que se ha fijado el máximo tolerable de TCE en 30 µg/l, con el fin de controlar la presencia de este compuesto en el agua potable.

1.2 El TCE y su problemática medioambiental

El TCE es considerado un contaminante primario de acuerdo con la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) de Estados Unidos. Además, es un compuesto químico de síntesis que no aparece de forma natural en el medio ambiente, y que se presenta en forma líquida e incolora. Este compuesto está clasificado como un compuesto orgánico volátil (COVs), (Pant and Pant, 2009) además de ser un solvente clorado, perteneciente al grupo de los hidrocarburos alifáticos clorados (HACs), (Frasconi et al., 2014). La complejidad de este compuesto deriva de la presencia de tres átomos de cloro y un doble enlace en la molécula (Figura 1) lo que dificulta su degradación por parte de los microorganismos. En los últimos setenta años el TCE ha sido ampliamente utilizado en diversos procesos industriales, como solvente en centrales nucleares, en el procesamiento de

textiles o en la producción de adhesivos, contribuyendo a que la contaminación de suelos y aguas subterráneas por este compuesto se haya extendido peligrosamente (Doucette et al., 2007). En el caso de las aguas subterráneas el TCE representa un serio problema debido a que esta contaminación podría llegar al agua potable (Artiola, 2007; Schmidt et al., 2013).

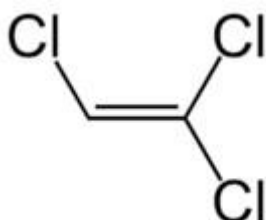


Figura 1. Estructura química del tricloroetileno.

1.3 El TCE y sus efectos sobre la salud

Respecto al impacto que el TCE ejerce sobre la salud humana, es importante destacar que este depende de varios factores como son: el tiempo de exposición, la concentración del contaminante y la frecuencia de exposición al mismo. El TCE es un compuesto sospechoso de ser cancerígeno, la exposición a altos niveles de este compuesto puede provocar diversos efectos sobre la salud, dañando el sistema inmunológico y produciendo efectos en el sistema nervioso, riñón, hígado y pulmón, lo que puede inducir el coma. En ciertas ocasiones en las que la exposición se prolongue en el tiempo, puede llegar incluso a causar la muerte del individuo.

1.4 La Biorremediación: generalidades y aplicación en zonas contaminadas con HACs

Debido a todos los problemas derivados de la presencia de TCE en el medio ambiente y lo costosas e ineficientes que son algunas de las metodologías físicas o químicas utilizadas para la remediación de terrenos y aguas contaminadas con TCE, se han desarrollado múltiples estudios y estrategias enfocadas a la utilización de técnicas biológicas con el propósito de aumentar

su eficacia y proceder, de este modo, a su implantación efectiva en los sistemas naturales contaminados con este compuesto.

La remediación mediante la utilización de microorganismos (biorremediación) tuvo su origen en la década de los años sesenta en los que George M Robinson realizó experimentos encaminados a estudiar el comportamiento de diferentes microorganismos en presencia de hidrocarburos. Dicha tecnología surgió de la necesidad de disminuir el impacto negativo de los vertidos de contaminantes en los diferentes ambientes utilizando, de acuerdo con las dimensiones del problema, microorganismos, plantas o enzimas, con el fin de restaurar la calidad ambiental (Pardo et al., 2004). Desde el punto de vista tecnológico las estrategias de biorremediación se pueden clasificar en dos: “in situ”, en la que el tratamiento se realiza en el propio lugar contaminado y “ex situ”, basada en el traslado del material contaminado a otro lugar para su posterior descontaminación (Sánchez y col., 2014). Por otro lado, desde el punto de vista metodológico, la biorremediación se clasifica en:

- **Atenuación:** basada en permitir que los procesos naturales reduzcan las concentraciones de los contaminantes a lo largo del tiempo, con la participación de procesos físicos, químicos, biológicos y con un monitoreo y supervisión continuos. Los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado, utilizan su potencial enzimático para mineralizar los contaminantes (es decir, biodegradarlos completamente hasta CO_2), o bien simplemente degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio.
- **Bioaumentación:** fundamentada en la adición de microorganismos especializados al medio con el fin de facilitar la eliminación de los contaminantes, potenciar y optimizar la remediación.
- **Bioestimulación:** basada en la adición de aceptores de electrones (oxígeno, nitratos, etc.), de nutrientes (nitrógeno y fósforo), ajustes de pH, o incluso aporte de cometabolitos con el fin de potenciar la biorremediación intrínseca de los microorganismos presentes.

1.5 Aplicación de la biorremediación en el caso del TCE

La degradación biológica de TCE puede abordarse mediante tres mecanismos, requiriendo, para la elección de uno u otro, el conocimiento tanto de los posibles intermediarios generados como de los productos finales obtenidos (Figura 2). En este sentido, resulta esencial evitar, en la medida de lo posible, la formación de algunos intermediarios con un alto poder mutagénico y elevada toxicidad como el cloruro de vinilo, tratando de generar por tanto productos inocuos como el eteno y el etano.

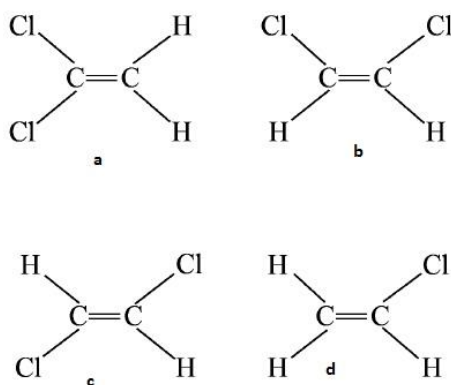


Figura 2. Intermediarios generados durante la degradación microbiana de TCE, a) 1,1-DCE; b) cis-1,2-DCE; c) trans-1,2-DCE; d) Cloruro de Vinilo.

Los tres mecanismos degradativos se comentan a continuación:

1) **Declorinación reductora** basada en la sustitución de los átomos de cloro presentes en la molécula de TCE, por átomos de hidrógeno aportados por moléculas donadoras (Noell A, 2009; Pant and Pant, 2009). De este modo se libera ácido clorhídrico y se genera eteno como producto final. Esta degradación es realizada por bacterias anaeróbicas: *Dehalococcoides ethenogenes*, *Sulfurospirillum multivorans*, *Enterobacter agglomerans*, *Desulfitobacterium* sp., *Dehalospirillum multivorans*).

2) **La oxidación aeróbica directa** del TCE requiere de la exposición previa del compuesto a un proceso de declorinación reductora. A partir de los intermediarios y productos generados, como el cis-DCE se desarrolla la oxidación directa. Estos compuestos actuarán como fuentes de carbono y energía (donadores de electrones) para bacterias como *Bacillus subtilis*.

Debido a la complejidad del proceso, los factores ambientales y las bacterias determinan el desarrollo del mismo.

3) **El cometabolismo** aerobio se postula como el mejor método, desde el punto de vista medioambiental, ya que además de no producir metabolitos tóxicos es el que genera los mejores resultados de degradación de TCE. El proceso se basa en la capacidad de ciertos microorganismos para modificar químicamente un sustrato a pesar de que carezcan de la capacidad de crecer en él (Suttinum et al., 2012; Nzila, 2013). Por tanto, las bacterias cometabolizantes no crecen en presencia del sustrato que modifican pero si lo hacen en presencia de compuestos análogos completamente metabolizables que son los que hacen que se exprese la enzima oxigenasa, responsable de la degradación del compuesto. Esta necesidad de análogos metabolizables explica el hecho de que en los ambientes naturales la degradación total del compuesto sea un proceso lento. Para que tenga lugar la degradación aeróbica del TCE, mediante este mecanismo, se requiere la presencia de compuestos como el fenol y el tolueno, los cuales actúan como cometabolitos, permitiendo el crecimiento bacteriano así como la expresión de la enzima oxigenasa que inicia la degradación oxidativa y la mineralización del TCE. Un ejemplo de oxigenasas que incorporan oxígeno atmosférico a una amplia gama de moléculas orgánicas son las enzimas tolueno dioxigenasa, tolueno monooxigenasa y metano monooxigenasa. Así por ejemplo, el TCE puede ser oxidado por la enzima tolueno dioxigenasa utilizando como cometabolito el tolueno y los productos de degradación pueden ser metabolizados por otras bacterias. Algunas de las bacterias que sintetizan el enzima monooxigenasa son *Pseudomonas putida* (Morono et al., 2004; Chen et al., 2008), *Methylosinus trichosporium* (Hwang et al., 2007; Kocamemi and Cecen, 2010), *Rhodococcus* (Frascari et al., 2008)). La eficacia de cepas de *Pseudomonas putida* utilizando fenol como cometabolito para la degradación de TCE, ha sido comprobada en múltiples publicaciones (Chen et al., 2007; Chen et al., 2008). Actualmente, se han ensayado otras cepas de *Pseudomonas* como *Pseudomonas fluorescens* (Li et al., 2014) obteniéndose un 80% de degradación del TCE a los tres días de iniciar el ensayo. Un experimento novedoso se basa en la utilización de componentes de aceites esenciales procedentes de plantas (Suttinum et al.,

2009; Suttinum et al., 2010), como cometabolitos, en sustitución de compuestos como el tolueno que pueden ser tóxicos para el medio. Concretamente, algunos de los compuestos ensayados fueron el limoneno y el citral que presentan una estructura química muy similar a los cometabolitos utilizados actualmente. La cepa seleccionada para la degradación fue *Rhodococcus sp* L4.

1.6 Nanopartículas de hierro cerovalente (nZIV)

La utilización de nanomateriales para la remediación de zonas contaminadas con compuestos clorados ha recibido elevada atención (Bhattacharyya et al., 2010) en parte debido a la capacidad de los nanomateriales para transformar los contaminantes rápidamente a escala de laboratorio, siendo la utilización de las nanopartículas de hierro cerovalente la más destacada.

La aplicación de nanopartículas de hierro cerovalente en la remediación de emplazamientos contaminados, tanto en suelos (Henn and Waddil, 2006; He et al., 2010) como en aguas subterráneas (Bennett et al., 2010; Wei et al., 2010; O'Carroll et al., 2013) comenzó en la década de los años noventa. Esta suscitó un elevado interés debido a su aplicabilidad en la degradación de diversos contaminantes mediante la dechloración de compuestos clorados como el TCE (Song and Carraway 2005) y los bifenilos policlorados (PCBs) (Xu and Bhattacharyya, 2005), entre otros. Esta metodología se presenta como un mecanismo alternativo a la degradación bacteriana, siendo las nanopartículas de hierro cerovalente (nZIV) las más utilizadas (Figura 3) (Li and Zhang, 2006). Estas nZIV fueron sintetizadas por primera vez en 1997 (Wang and Zhang, 1997). Su síntesis puede llevarse a cabo mediante diferentes metodologías como (sonoquímica, electroquímica, reducción en fase líquida o gaseosa), siendo las dos últimas las más utilizadas.

Estas tecnologías de descontaminación ofrecen una serie de ventajas (Liu et al., 2006; Grieger et al., 2010) ya que debido a su pequeño tamaño poseen una mayor diferencia entre la superficie y el peso, presentando por consiguiente una mayor reactividad respecto al contaminante en cuestión. Por otro lado, el hecho de que presenten un tamaño mucho menor que la mayoría de medios

porosos, facilitan su aplicación y transporte en el medio. Todos los aspectos mencionados son importantes (Zhang 2003; Li and Zhang, 2006) cuando se decide implementar un protocolo de remediación utilizando nanopartículas, por lo que deberán ser tenidos en cuenta.

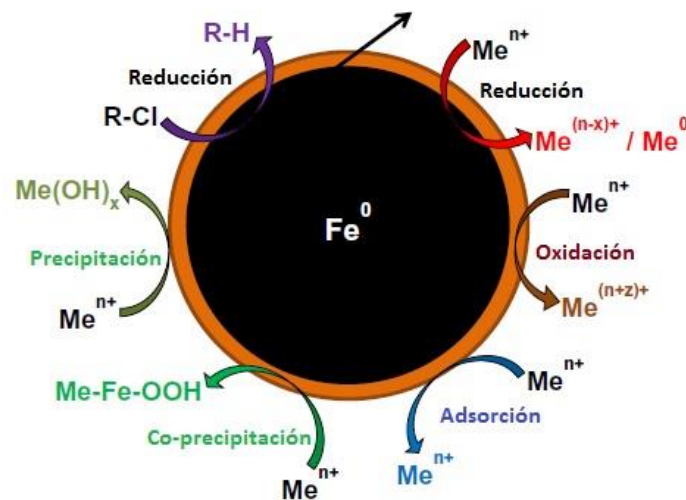


Figura 3. Estructura núcleo-corteza de las nZVI y los diversos mecanismos para la eliminación de metales y compuestos clorados.

En la Figura 3 se observan los diferentes mecanismos para la eliminación de los contaminantes por parte de las NPs. El fundamento de la metodología se basa en el elevado poder reductor que posee el hierro, de modo que se oxida a la vez que reduce los contaminantes mediante un procedimiento de deshalogenación reductora, la cual puede ser llevada a cabo por dos vías (Arnold and Roberts, 2000): la eliminación reductora y la hidrogenólisis de los reactivos, siendo preferible la primera dado que genera productos finales inocuos y cloruro de vinilo en valores inferiores al 10%. Por contraposición, el segundo método genera cloruro de vinilo y otros intermediarios tóxicos en elevada concentración.

1.7 Objetivos

Las actividades realizadas en este trabajo se enmarcan dentro de un proyecto de investigación destinado al uso combinado de nanopartículas y bacterias para la descontaminación de compuestos organoclorados. En este contexto, se abordó la degradación de TCE, compuesto moderadamente volátil, bajo distintas condiciones experimentales: a) selección y aislamiento de bacterias capaces de crecer en presencia de TCE, b) análisis de la degradación de TCE en ausencia y presencia de cometabolitos y c) propuestas para potenciar la efectividad de la degradación de TCE mediante la acción combinada de nanopartículas de hierro cerovalente y bacterias. En todos los casos se abordó bajo condiciones aeróbicas y empleando materiales que permitiesen un bajo coste de los experimentos. Los objetivos que se abordaron fueron los siguientes:

1. Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de TCE a partir de un suelo contaminado con lindano (compuesto clorado) mediante cultivos de enriquecimiento, utilizando TCE como fuente de carbono.
2. Estudio de la dinámica poblacional, a lo largo del tiempo, de los microorganismos presentes en el suelo contaminado en presencia del TCE.
3. Análisis de la degradación microbiana de TCE mediante cometabolismo utilizando como co-sustratos el fenol y dos componentes de aceites esenciales como son el limoneno y el citral.
4. Aproximaciones experimentales para la degradación de TCE mediante la aplicación combinada de nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI) y bioaumentación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Medios de cultivo

2.1.1 Crecimiento bacteriano y experimentación

- Medio GAE, para el crecimiento de microorganismos heterótrofos. La composición para un volumen de 750 ml de agua destilada es:
 - Glucosa: 7.5g.
 - L-Asparagina: 0.750g.
 - Levadura: 0.375g.
 - $MgSO_4$: 0.375g.
 - $FeSO_4$: 0.0075g.
 - Agar: 15g.
 - $K_2 HPO_4$: 1.5 ml (adición una vez autoclavado el medio).
- Medio Bushnell Haas Broth, medio mineral para el crecimiento de microorganismos degradadores. No contiene fuente de carbono, por lo que se suplementa con la fuente de carbono de interés (10, 20 mg/l TCE). Para su preparación se disuelven 3.27 g del medio en 1000 ml de agua destilada. La composición del medio se detalla a continuación:
 - $MgSO_4$: 0.2g/l.
 - $CaCl_2$: 0.02g/l.
 - $KHPO_4$: 1g/l.
 - K_2HPO_4 : 1g/l.
 - NH_4NO_3 : 1g/l.
 - $FeCl$: 0.05g/l.
- Medio Tryptic Soy Broth (TSB), para el crecimiento de microorganismos heterótrofos. Se añaden 30 g a 1000 ml de agua destilada. Su composición es:
 - Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína) 17,0g.
 - Bacto Soytone (digerido péptico de harina de soja) 3,0g.
 - Glucosa (dextrosa) 2,5g.

- Cloruro sódico 5,0g.
- Fosfato dipotásico de hidrógeno 2,5g.
- Medio mineral (MM), medio sintético para el crecimiento de microorganismos degradadores. Se suplementa con la fuente de carbono de interés (10 mg/l TCE) y su composición para un volumen de 1000 ml, ajustado a pH 7 se detalla a continuación:
 - KH_2PO_4 : 0.68g.
 - Na_2HPO_4 : 1.8g.
 - MgSO_4 : 0.05g.
 - CaCl_2 : 0.02g.
 - FeSO_4 : 0.02g.
 - Oligoelementos (preparado): 1ml.
 - $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: 1.93g/l.
 - $\text{MnO}_4\text{S} \text{H}_2\text{O}$: 0.18g/l.
 - H_3BO_3 : 0.45g/l.
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0.022g/l.
 - $\text{C}_4\text{SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$: 0.005g/l.
 - $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 0.003g/l.

2.1.2 Conservación de cepas bacterianas

- Liofilización:
 - Trehalosa 1.7%: 0.85g
 - Leche descremada: 1g
 - MOPs 0.125%: 0.625g
 - Agua milliQ: 50ml
- Crioconservación: para 500 ml
 - 75 ml de glicerol
 - 4.25 g de Cloruro de sodio
 - 425 ml de agua destilada.

2.2 Métodos de análisis microbiológico

2.2.1. Aislamiento de microorganismos degradadores de TCE mediante técnicas de enriquecimiento selectivo

La técnica de enriquecimiento selectivo se realizó en matraces con 100 ml de medio mineral BH suplementado con 10 mg/l o 20 mg/l de TCE como fuente de carbono. El medio fue inoculado con 1g de suelo contaminado con lindano (compuesto organoclorado más complejo que el TCE) y se incubó en agitación a 250 rpm y 25 °C durante una semana. Transcurrido ese tiempo, 1 ml del cultivo se transfirió a 100 ml del mismo medio de cultivo estéril. Pasados 15 días, se transfirió nuevamente 1 ml de cultivo a 100 ml del mismo medio. El proceso se repitió tres veces, con el propósito de seleccionar aquellos microorganismos que fuesen capaces de tolerar la presencia del TCE. Al final de cada una de las rondas de enriquecimiento se procedió al recuento y posterior aislamiento de los microorganismos cultivables, mediante diluciones y siembra en placa en el medio GAE y BH suplementado con glucosa. Paralelamente, se tomó una alícuota para la extracción de ADN total, el cual fue sometido a electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) con el objetivo de obtener información sobre los microorganismos totales presentes en cada uno de los pases de enriquecimiento y analizar la dinámica poblacional, a lo largo del tiempo, de los microorganismos en presencia del TCE.

2.2.2 Amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 16S

Una vez aisladas las bacterias cultivables, se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal (ARNr) 16S, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos conservados para Eubacterias, (pA:5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´;1492R:5´ACCTTGTTACGACTT 3´) (Bruce et al., 1992). El volumen de reacción fue de 50 µl, que incluyen, 25 µl de Master Mix (dNTPs, buffer, Optitaq ADN polimerasa), 2 µl del oligonucleotido pA (10 µM) y 2 µl del oligonucleótido 1492R (10 µM), 5 µl de ADN y 16 µl de agua. Las condiciones de reacción fueron: desnaturización inicial a 95 °C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturización a 95 °C

durante 1 minuto, anillamiento a 58 °C durante 1 minuto, y extensión a 70 °C durante 1 minuto y 30 segundos, seguidos de una extensión final a 70 °C durante 7 minutos. Los productos de ADN amplificados obtenidos son de 1500 pb, los cuales se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en Tris-Borato-EDTA (TBE), seguido de una tinción con el colorante Midori Green DNA Stain (Genetics) y posterior visualización bajo luz ultravioleta (UV) en el equipo Gel Logic 200 Imaging System. El patrón de peso molecular utilizado fue el ADN del fago Lambda digerido con el enzima de restricción *Pst*I. Los productos amplificados se purificaron con GeneMatrix Agarose-Out DNA Purification Kit y GeneMatrix Basic DNA Purification Kit (EURx), dependiendo de que la purificación del ADN sea a partir de una banda de agarosa rescatada del gel o bien directamente desde la reacción de PCR.

2.2.3 Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Las cepas bacterianas aisladas a partir de los enriquecimientos se agruparon en ribotipos, mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción del gen que codifica para el ARNr 16S. Para lo cual se digirieron los productos de PCR con dos enzimas de restricción, *Alu*I y *Hae*III. La mezcla de restricción se realizó en un volumen de 15 µl, que contenía: 0.5 µl del enzima, 1.5 µl del buffer de cada enzima, 7 µl del producto de PCR y 6 µl de agua. La mezcla se mantuvo en incubación durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se analizaron los fragmentos generados en un gel de agarosa al 1.5% de Tris-Borato-EDTA (TBE) teñido con el colorante Midori Green DNA Stain (Genetics) y visualizado en un transiluminador de luz UV.

2.2.4 Identificación y secuenciación de las bacterias cultivables

Los fragmentos del gen codificante del ARNr 16S de las bacterias que mostraron distintos perfiles de RFLP, se secuenciaron utilizando el kit BigDye R terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Los productos fueron sometidos con posterioridad a electroforesis capilar mediante el equipo de análisis genético ABI PRISM R 3130xL Genetic Analyzer (Servicios

Científico-Técnicos, Unidad de Secuenciación, Universidad de Oviedo) y las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software de análisis de datos Sequence Scanner Software v2.0 (Applied Biosystems). Finalmente, la identificación de las bacterias se realizó mediante la comparación de las secuencias obtenidas con aquellas secuencias presentes en la base de datos BLAST, procedente del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.5 Conservación de bacterias

Las bacterias cultivables aisladas se conservan utilizando técnicas de liofilización y crioconservación. Para ello es necesario obtener previamente cultivos bacterianos puros y frescos.

- **Liofilización:** Las células bacterianas obtenidas a partir de cultivos frescos, se resuspenden en 1 ml del medio de conservación, se disponen en los viales de vidrio adecuados. Estas suspensiones bacterianas se congelan a -80 °C y se subliman en un liofilizador (Teslta, Cryodos 80).
- **Crioconservación:** el contenido de una placa sembrada con la bacteria a conservar se introduce por medio del asa de siembra en un volumen de 500 µl del medio de conservación. Todo ello se conservará a -70 °C en criotubos graduados con junta de silicona y tapón rojo de 1.8 ml (Labbox) previamente autoclavados a 121 °C.

2.2.6 Análisis de las poblaciones bacterianas mediante DGGE

La técnica de DGGE (Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante) utiliza geles de poliacrilamida con una mezcla de urea y formamida que permite la separación vertical de fragmentos de ADN con un mismo tamaño pero con una secuencia de nucleótidos diferente. Los fragmentos que se separan provienen de la amplificación por PCR de regiones del ARNr 16S utilizando iniciadores que contienen en su extremo una cola formada por guaninas (G) y

citocinas (C) que impiden que las dos cadenas de ADN se separen completamente en el proceso de desnaturalización.

El ADN de doble cadena migra por el gel hasta encontrar una determinada concentración de la mezcla (concentración desnaturalizante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o es interrumpido. La concentración a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos que presente la muestra, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno, lo cual dependerá de la presencia de pares de bases adenina-timina o citosina-guanina (Myers et al., 1987). En general, los fragmentos ricos en GCs son más estables y permanecen en cadena doble aunque la concentración del agente desnaturalizante sea alta. La doble hélice avanza mejor en geles de poliacrilamida que la hélice simple, lo que hace a los fragmentos situarse en distintas posiciones del gel. El equipo utilizado para dicho análisis fue el DCode™ Universal Mutation Detection System (BIO-RAD), el protocolo desarrollado se basó en el de Muyzer et al., 1993.

Para el estudio de las muestras de ADN procedentes de los cultivos de enriquecimiento, se aisló el ADN total a partir de muestras obtenidas a los tiempos 15, 30 y 45 días. Los fragmentos amplificados con los cebadores P3GC:5'CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGC CTACGGGAGGCAGCAG 3' y 907R: 5'CCGTCAATTCCTTTRAGTTT 3' se cargaron en un gel cuyo contenido era: 6% de acrilamida/bisacrilamida (37.5:1, w/w) en un tampón TAE 0.5X (0.5X Tris-acetato 0.04 M; EDTA 0.001 M pH 8.0), con un gradiente de 35-65% de solución desnaturalizante (urea 2.8 M 16% formamida y urea 3.85 M 20% formamida). Los agentes polimerizantes del gel fueron los siguientes: TEMED (N, N, N', N'-Tetrametiletilenediamina) (1 µ/ml) y Persulfato de amonio al 10% (10 µl/ml). La electroforesis se realizó a 70 V durante 16 horas. Transcurrido este tiempo el gel se tiñó con el colorante Midori Green DNA Stain (Genetics) durante 45 minutos en oscuridad y posteriormente se visualizó en un transiluminador bajo luz ultravioleta utilizando el sistema Gel Logic 200 Imaging System (Kodak).

2.3 Degradación de TCE

2.3.1 Análisis de la degradación de TCE mediante cometabolismo bacteriano

El proceso experimental se llevó cabo en recipientes de 100 ml (con cierre hermético y parafilm para reducir en lo posible las pérdidas del TCE por volatilización) conteniendo 40 ml de medio de cultivo mineral (MM). Como fuente de carbono se añadió TCE a una concentración final de 10 mg/l y como cometabolitos se añadieron de forma independiente y a la concentración más adecuada descrita en la bibliografía fenol (100 mg/l), citral (61 mg/l) y limoneno (27 mg/l). Finalmente, se añadió 1 ml del inóculo bacteriano, previamente preparado en condiciones de esterilidad en el medio mineral suplementado con glucosa (5 g/l). Se analizó la capacidad de los microorganismos para degradar TCE mediante cometabolismo utilizando 3 bacterias aisladas en el laboratorio e identificadas como *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y una bacteria del orden *Sphingomonadales*. Las dos primeras bacterias se aislaron previamente de suelos contaminados con hidrocarburos y la última se aisló a partir de los cultivos de enriquecimiento en TCE (10 mg/l) realizados en este trabajo. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 150 rpm y 25 °C, tomándose muestras a los tiempos 0 y 7 días para cuantificar la concentración de TCE con el fin de determinar la degradación del compuesto por la acción bacteriana. Dado que el TCE es un compuesto moderadamente volátil, un bote conteniendo MM con TCE y cada uno de los cometabolitos utilizados, fue incorporado al diseño experimental para obtener una medida de la posible volatilidad del TCE.

2.3.2 Degradación de TCE mediante la combinación de nanopartículas de hierro cero valente y bacterias

Para establecer las bases previas en este apartado, es necesario determinar si la adición de las bacterias debe ser anterior o posterior a la de las nanopartículas. Por este motivo, hemos analizado el efecto de las nanopartículas sobre el crecimiento bacteriano con el fin de determinar el momento más adecuado para la adición de las bacterias y de las

nanopartículas. Para ello se utilizaron matraces de 100 ml con 18 ml de medio MM líquido suplementado con glucosa 5 g/l, a los que se añadieron nanopartículas de hierro cerivalente (NANOIRON s.r.o.), concretamente NANOFER STAR, a una concentración de 1 g/l. Posteriormente, se añadió 1 ml del inóculo bacteriano obtenido a partir del cultivo de 24 horas en el medio MM con glucosa y se incubaron en agitación a 250 rpm y 25 °C. A partir de dichos cultivos se tomaron muestras a las 0, 3 y 24 horas, desde las que se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en el medio TSB sólido con el fin de realizar un recuento bacteriano. Paralelamente, se corroboró el efecto de las NPs analizando la viabilidad bacteriana, mediante el uso de colorantes vitales, y observaciones con un microscopio láser confocal (apartado 2.3.3).

2.3.3 Análisis de la viabilidad bacteriana.

La viabilidad bacteriana se analizó utilizando el Live/Dead Bacterial Viability Kit, (Molecular Probes) compuesto por los fluoróforos SYTO 9 y Ioduro de Propidio (IP) basados en la detección de la integridad de la membrana observándose una tonalidad verde en las células viables y roja en las células no viables o dañadas. El análisis se realizó a los 7 días de haberse iniciado el experimento, en el caso del cometabolismo y a las 24 horas para analizar la posible interacción de las bacterias con las NPs en el caso del efecto de las nanopartículas. El procedimiento consistió en mezclar, volumen a volumen, la muestra con los colorantes, de manera que a 10 µl de la muestra se le añadieron 5 µl de cada uno de los colorantes de viabilidad (SYTO 9 e IP). Las observaciones se realizaron en un Microscopio Confocal Ultra-Espectral Leica TCS-SP2-AOBS disponible en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo. El principio de este tipo de microscopio, que funciona con láser, se fundamenta en la eliminación de la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco (Boyde, 1988). Esta técnica ofrece, frente a otras, una mayor nitidez y contraste de las imágenes obtenidas, mayor resolución vertical y horizontal, enfoque de un único plano de la muestra y obtención de cortes ópticos seriados permitiendo el estudio tridimensional de la misma. El funcionamiento se detalla en la Figura 4.

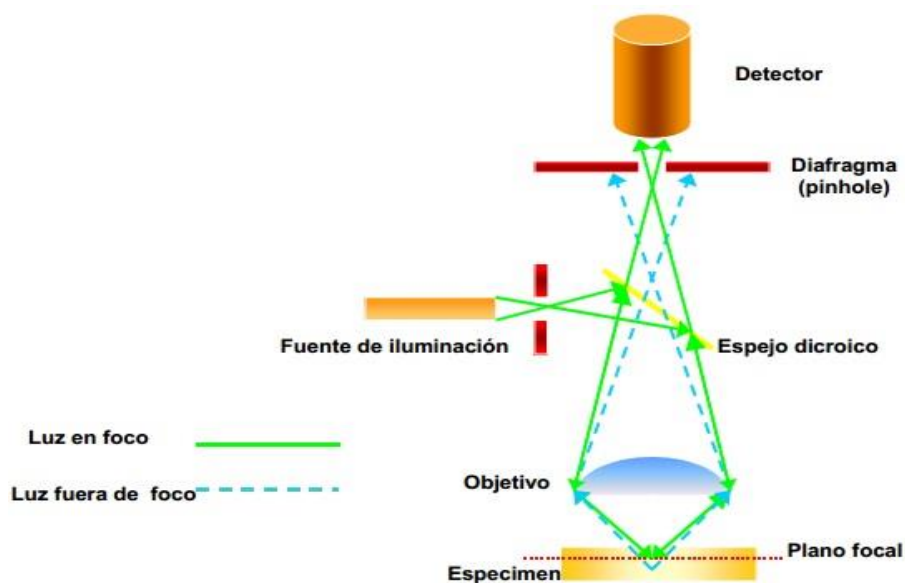


Figura 4. Componentes y fundamentos de un Microscopio Confocal.

2.3.3.1 Análisis de la viabilidad bacteriana durante el cometabolismo

Para analizar la viabilidad de las bacterias en los experimentos de degradación en medio MM con TCE como fuente de carbono y en presencia de cometabolitos, 7 ml de los cultivos tomados a los 7 días se centrifugaron en tubos Falcon. Tras recoger el sobrenadante para analizar la concentración de TCE, el sedimento conteniendo las células bacterianas se utilizó para observar la viabilidad bacteriana tal y como se describió arriba.

2.3.3.2 Análisis de la viabilidad bacteriana en presencia de nanopartículas de hierro cero valente

Tal y como se describe en el apartado 2.3.2 antes de realizar los experimentos de degradación de TCE combinando el uso de NPs y bacterias fue necesario determinar el grado de viabilidad de las bacterias en presencia de las NPs. Para ello, se tomaron muestras a las 24 horas que se tiñeron con los colorantes vitales y se observaron al microscopio confocal.

2.4 Análisis químico del TCE

La evaluación de la degradación de TCE en los experimentos de cometabolismo se realizó mediante la cuantificación del contaminante a distintos tiempos (0 y 7 días) utilizando la técnica de cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas (MS) en un laboratorio especializado. Se tomaron 7 ml que se mantuvieron en viales opacos de vidrio a 4°C hasta su análisis.

2.5 Análisis estadístico de la degradación de TCE mediante cometabolismo

Se realizó el análisis estadístico de los valores obtenidos de la cuantificación de TCE por GC-MS, para lo cual se utilizó el porcentaje de degradación para cada tratamiento. Se realizó mediante el programa de análisis estadístico IBM SPSS Statistics 22, para lo cual se utilizó el análisis descriptivo para la obtención de los valores de media y error con el objetivo de graficarlo mediante el programa Sigmaplot 13.0. Por otro lado se desarrolló el test ANOVA de un factor, basado en el análisis de la varianza, tomando como variable dependiente el porcentaje de degradación de TCE en cada tratamiento y como variable independiente cada una de las bacterias ensayadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudio microbiológico

3.1.1 Aislamiento e identificación de las bacterias cultivables procedentes de cultivos de enriquecimiento en presencia de TCE.

El desarrollo de cultivos de enriquecimiento a partir de suelos o aguas contaminadas con diferentes compuestos ha sido utilizado en diversos estudios, siendo destacable, en el caso de contaminantes como el diésel, el trabajo de Ciric et al., 2010. En el caso del TCE algunos artículos se han basado en la utilización de cultivos de enriquecimiento, a partir de aguas subterráneas contaminadas con TCE (Schmidt et al., 2013), en un medio mineral con sales. En ese caso concreto los tiempos de incubación eran excesivamente largos, de modo que el procedimiento se acortó siguiendo las indicaciones enunciadas en el apartado 2.2.1. Se analizaron las poblaciones bacterianas cultivables en los tiempos preestablecidos durante el diseño experimental y se realizaron diluciones seriadas (10^3 - 10^7) a partir de los cultivos de enriquecimiento, las cuales fueron sembradas en placas de medio GAE. A partir de las siembras en placa, se realizaron recuentos bacterianos (Figura 5) y se aislaron, mediante el método de siembra por estría, las bacterias predominantes que presentaban una morfología diferenciada.

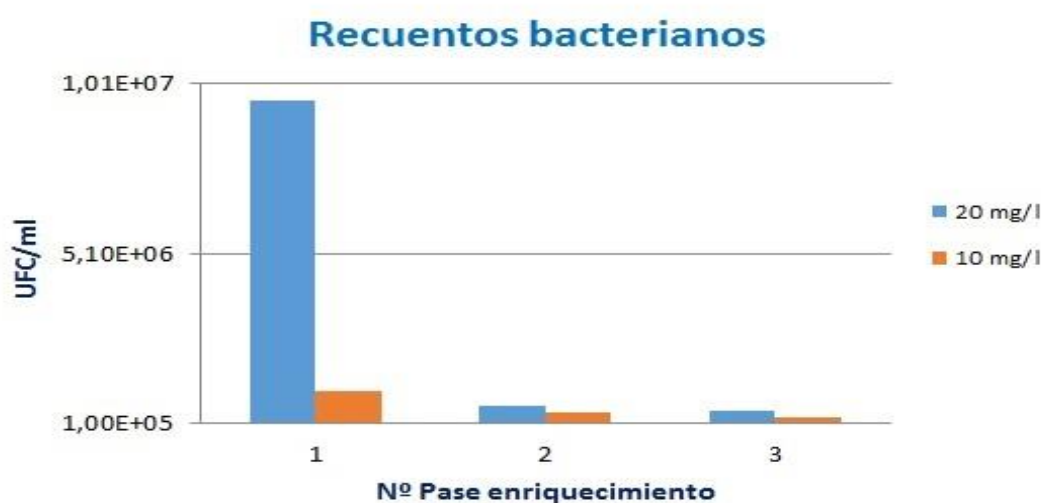


Figura 5. Recuento UFC/ml procedentes de los pases a 15, 30 y 45 días de los cultivos de enriquecimiento.

Lo que se observa a primera vista es que existe una mayor presencia de bacterias en los enriquecimientos en los que se utilizan 20 mg/l de TCE lo que podría explicarse por el hecho de que las bacterias mejoran sus capacidades degradativas para el compuesto al trabajar en conjunto con otras bacterias actuando como consorcios. A su vez el valor más elevado se obtiene en el pase 1, lo que puede ser debido a que parte de las bacterias proceden del suelo contaminado con lindano que se utilizó para iniciar el cultivo de enriquecimiento. Por otro lado, se puede apreciar que los valores de UFC/ml disminuyen a lo largo del tiempo.

La identificación de las bacterias cultivables se realizó mediante el aislamiento en placa, amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 16S (apartado 2.2.2) y su posterior secuenciación (apartado 2.2.4) y comparación en las bases de datos. Con el objetivo de descartar en la medida de lo posible aquellas bacterias que en placa parecían semejantes o que presentaban un crecimiento parecido a alguna otra bacteria se realizó RFLP (apartado 2.2.3). De ese modo se evitó identificar un gran número de bacterias que creyésemos diferentes y al final resultasen ser una misma bacteria. Cabe destacar que en ciertas ocasiones hay bacterias que a pesar de que en placa no tengan la misma morfología finalmente resultan ser el mismo individuo, como se comprobó en la posterior identificación bacteriana (Tabla 1). En la Figura 6 se muestra la electroforesis de los perfiles RFLP obtenidos a partir de la restricción del gen 16S de varias bacterias con los enzimas *AluI* y *HaeIII*. Se observa que algunos perfiles son idénticos (por ejemplo en el caso de las bacterias 4, 9 y 11), lo que muestra así mismo la identidad de las mismas.

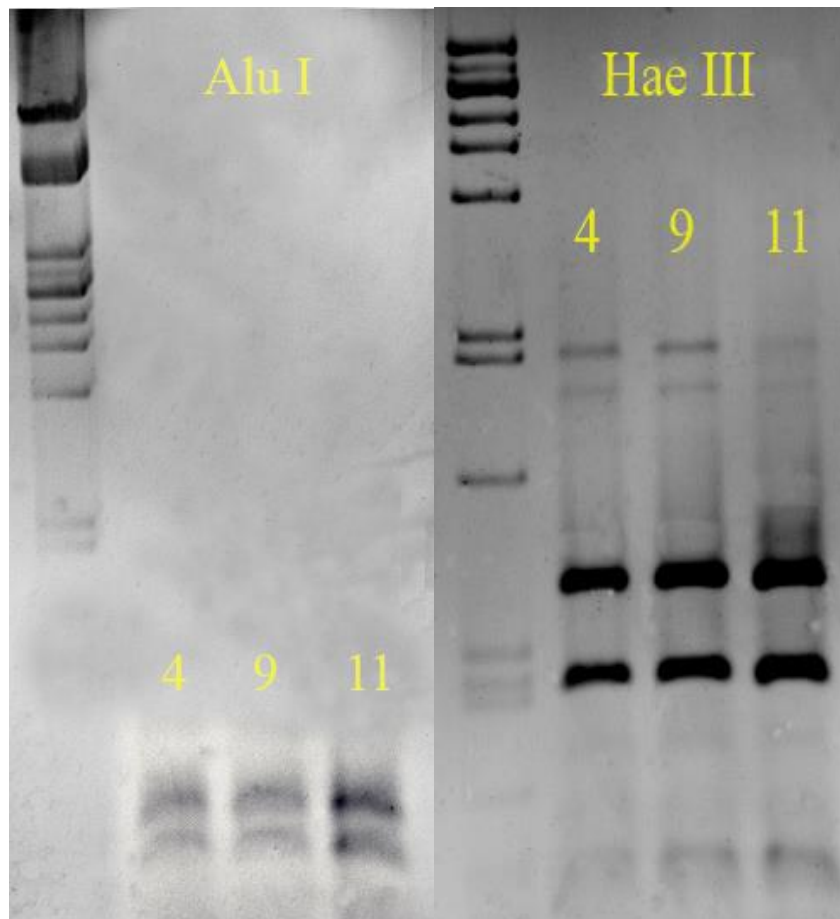


Figura 6. Gel de electroforesis de RFLP para las bacterias 4,9 y 11, utilizando los enzimas de restricción *Alu I* y *Hae III*.

Una vez descartadas aquellas bacterias iguales se procedió a la preparación de las muestras para su posterior secuenciación, mediante la cuantificación del material genético (ADN) y la realización de la PCR pre-secuencia. Una vez secuenciadas en los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Oviedo se obtuvo la identificación de dichas bacterias (Tabla 1).

CÓDIGO INTERNO	Nº Pase	DIVISIÓN BACTERIANA	IDENTIDAD %	Descripción (nombre, cepa, nº de acceso NCBI ,características)
Filo Proteobacteria				
Clase Alphaproteobacteria				
3, 24, 36	1,2,3	<i>Agrobacterium</i>	99	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , TG14, AF508099.1. Bacteria con capacidad degradativa para fenol y para la reducción de nitrato
6, 16	1	<i>Sinorhizobium</i>	99	<i>Sinorhizobium meliloti</i> , SH23, KC172024.1.
10	1	<i>Caulobacter</i>	99	<i>Caulobacter leidyia</i> , XFB-A, KC429616.1.
12	1	<i>Sinorhizobium</i>	99	<i>Sinorhizobium meliloti</i> , MSAP_P3, JF927937.1.
14	1	<i>Sinorhizobium</i>	99	<i>Sinorhizobium sp.</i> L1, AJ879127.1. Bacteria degradadora de 3-hidroxipiridina.
15	1	<i>Ensifer</i>	99	<i>Ensifer sp.</i> AC50a, JF450191.1.
17	1	<i>Sinorhizobium</i>	99	<i>Sinorhizobium meliloti</i> EFBRI 4, EU281312.1.
20	1	<i>Brevundimonas</i>	98	<i>Brevundimonas sp.</i> BRM7, HG942103.1.
22	2	<i>Aminobacter</i>	97	<i>Aminobacter aminovorans</i> , LR 1-3b, AY934494.1
23	2	<i>Aminobacter</i>	98	<i>Aminobacter sp.</i> TW23, JQ435722.1. Bacteria con capacidades de utilización de cloruro de vinilo en suelos.
25	2	<i>Agrobacterium</i>	99	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , TG12, AF508098.1. Bacteria con capacidad degradativa para fenol y para la reducción de nitrato.
27	2	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas sp.</i> DS18, EF494197.1. Bacteria utilizada para la remediación de terrenos contaminados con hexaclorociclohexano mediante bioestimulación.
28, 30	2	<i>Agrobacterium</i>	97	<i>Agrobacterium sp.</i> FRC_A2, EU331397.1.
29	2	<i>Ensifer</i>	98	<i>Ensifer sp.</i> AC50a, JF450191.1.
32	3	O. Sphingomonadales	98	TEMPHRAG12D02, HG322916.1. Bacteria obtenida del estudio de los efectos de compuestos organoclorados.
Clase Betaproteobacteria				
7	1	Massilia	98	<i>Massilia niabensis</i> , EA-4, JF496408.1.
Filo Actinobacteria				
Clase Actinobacteria				
1	1	<i>Microbacterium</i>	99	<i>Microbacterium sp.</i> ZS3, JQ977333.1
18	1	<i>Agromyces</i>	99	<i>Agromyces sp.</i> AK1, FN868445.1.
Filo Firmicutes				
Clase Bacilli				
4	1	<i>Brevibacillus</i>	99	<i>Brevibacillus sp.</i> DB3, JF734329.1. Bacteria con capacidad oxidativa para hidrocarburos, petróleo.
5	1	<i>Bacillus</i>	98	<i>Bacillus simplex</i> , SD5, KF844070.1.
13	1	<i>Brevibacillus</i>	99	<i>Brevibacillus agri</i> , MGH117, HG942103.1. Bacteria con alta tasa de biodegradación de hidrocarburos de petróleo en condiciones reducidas de nitrato.
19	1	<i>Bacillus</i>	98	<i>Bacillus beringensis</i> , KUII-9, JF895482.1.
33	3	<i>Bacillus</i>	99	<i>Bacillus sp.</i> IR-451, GU586307.1. Bacteria degradadora de petróleo en suelos contaminados.
34	3	<i>Bacillus</i>	99	<i>Bacillus pumilus</i> , NKCM3201, LC034563.1.

Tabla 1. Identificación bacteriana de las cepas obtenidas de los cultivos de enriquecimiento.

Se observa que algunas bacterias se repiten en los diferentes países del enriquecimiento como es el caso de las 3, 24, 36; 6,16; 28 y 30. En la Tabla 1 se han detallado las características de interés para nuestro estudio. Por ejemplo, las bacterias 3, 24 y 36 presentan un 99% de identidad con *Agrobacterium tumefaciens* cepa TG14, que tiene capacidades degradativas sobre el fenol y para la reducción de nitrato. Esto sugiere que estas bacterias podrían ser usadas de forma eficaz en el experimento de degradación de TCE mediante cometabolismo utilizando fenol como co-sustrato. Además, la capacidad de degradación de dicho compuesto puede estar acompañada con otras capacidades degradativas para otros compuestos. Por otro lado, las bacterias 4, 13 y 33 muestran un 99% de identidad con géneros bacterianos implicados en la degradación de hidrocarburos del petróleo, abriendo la puerta a futuros ensayos. Del mismo modo, la bacteria 23 presenta un 98% de identidad con *Aminobacter* sp. cepa TW23, que posee capacidades de utilización de cloruro de vinilo en suelos; la bacteria 27 muestra un 98% de identidad con *Sphingomonas* sp. cepa DS18, la cual ha sido utilizada en la remediación de terrenos contaminados con hexaclorociclohexano mediante bioestimulación y la bacteria 32 presenta un 98% de identidad con *Sphingomonadales*, cepa TEMPHRAG12D02, obtenida a partir del estudio de los efectos de compuestos organoclorados en la rizosfera de plantas (San Miguel et al., 2014). Todas estas bacterias serían candidatas a ser utilizadas en procesos de biorremediación de emplazamientos contaminados con estos compuestos.

3.1.2 Dinámica de las poblaciones bacterianas presentes en los cultivos de enriquecimientos a lo largo del tiempo, en presencia de distintas concentraciones de TCE.

La dinámica poblacional presente en los cultivos de enriquecimiento a lo largo del tiempo y en presencia de distintas concentraciones de TCE (10 mg/l y 20 mg/l) se analizó utilizando la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE). Con esta aproximación obtendremos un patrón correspondiente a las poblaciones tanto cultivables como no cultivables y

además, se podrá determinar la posible persistencia de algún individuo a lo largo de los distintos pases de enriquecimiento (1, 2, 3) y en las diferentes concentraciones de TCE.

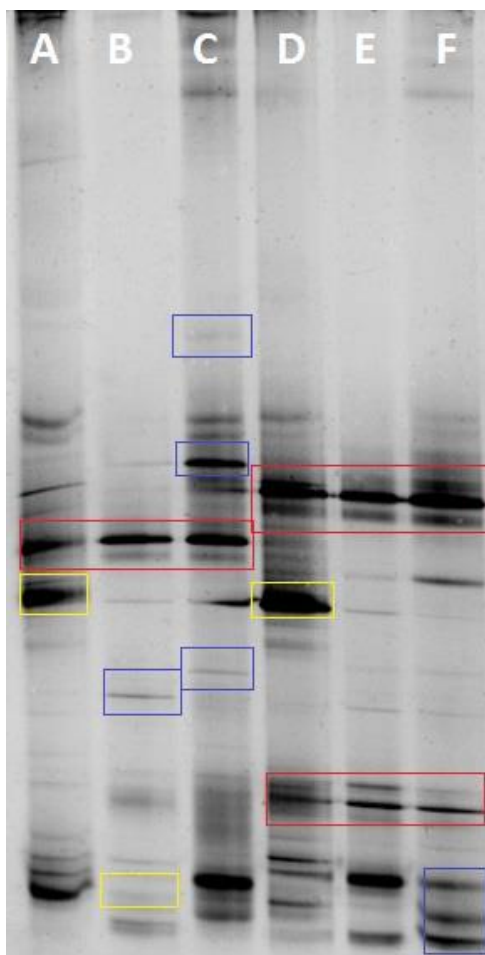


Figura 7. Gel de electroforesis de DGGE a partir del ADN cromosómico total, A, B y C (cultivo de enriquecimiento con 20 mg/l TCE), D, E y F (cultivo de enriquecimiento con 10 mg/l TCE) de los pases 1, 2 y 3 del cultivo de enriquecimiento.

En la Figura 7 se observa el patrón de bandas obtenido a partir de ambos cultivos de enriquecimiento. Las bandas corresponden tanto a bacterias cultivables como no cultivables de modo que nos da un valor global más representativo de las poblaciones presentes. Las calles A, B, C muestran las poblaciones microbianas presentes en el cultivo de enriquecimiento con 20 mg/l de TCE a los pases 1, 2 y 3 respectivamente. En este caso, destaca la presencia de ciertas bandas que se mantiene a lo largo del tiempo (señaladas en rojo en la imagen). A su vez se observa, la presencia de ciertas bandas

(señaladas en azul), que no se presentan en la muestra tomada a los 15 días (calle A) y que por el contrario están presentes en la población en tiempos posteriores (calles B y C). Por otro lado, se observan bandas que se han ido perdiendo a lo largo del tiempo (señaladas en amarillo), lo cual sugiere una cierta especialización de la población. Del mismo modo, las calles D, E y F representan las poblaciones microbianas presentes a los pases 1, 2 y 3 en el cultivo de enriquecimiento donde la concentración de TCE es de 10 mg/l. Como en el caso anterior, aparecen bandas que se mantienen a lo largo de tiempo (señaladas en rojo), bandas que se intensifican a lo largo del tiempo (señaladas en azul) y otras que desaparecen después del primer pase de cultivo (señaladas en amarillo). Lo que sugiere, como en el caso anterior, un proceso de adaptación bacteriana. El hecho de que en ambos cultivos de enriquecimiento no se observe una repetición en el patrón de bandas en los distintos tiempos analizados, indica que aún es necesario mantener dichos cultivos un tiempo más prolongado que permita obtener un consorcio estable y especializado con las capacidades metabólicas necesarias que permitan su uso futuro en aplicaciones biotecnológicas destinadas a la recuperación de emplazamientos contaminados con TCE.

3.2 Degradación de TCE

3.2.1 Análisis de la degradación de TCE mediante cometabolismo bacteriano

La degradación cometabólica del TCE ha sido ampliamente evaluada en numerosas publicaciones (Frasconi et al., 2014). En el caso de este trabajo la degradación cometabólica se abordó utilizando tres tipos diferentes de cometabolitos: fenol y componentes de aceites esenciales derivados de plantas concretamente el citral y el limoneno (ver Introducción, apartado 1.5). La cuantificación del TCE se llevó a cabo mediante análisis químico (GC-MS; apartado 2.6). Paralelamente se realizaron recuentos bacterianos a 0 y 7 días y por último se observó la viabilidad de las bacterias ensayadas (*Pseudomonas*, *Rhodococcus* y la bacteria del orden *Sphingomonadales*)

mediante microscopía láser confocal a los 7 días de haberse iniciado el experimento.

Se realizó un experimento inicial de degradación siguiendo la metodología previamente expuesta (apartado 2.3.1) acompañado del estudio de viabilidad. Los datos de cuantificación de TCE se exponen en las Tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. Cuantificación de TCE mediante GC-MS a los tiempos 0 y 7 días, en el experimento de degradación de TCE con *Pseudomonas*.

TRATAMIENTO	% DEGRADACIÓN
CONTROL (MM+TCE)	63
TCE (MM+TCE+bacteria(B))	61.3
CITRAL (MM+TCE+B+citral)	69.5
LIMONENO (MM+ TCE+B+lim)	67.4
FENOL (MM+TCE+B+fenol)	58.5

Los porcentajes de degradación de TCE obtenidos con *Pseudomonas* en presencia de co-sustratos son muy semejantes en todos los casos estando incluso próximos al valor obtenido en el ensayo donde no se adicionó la bacteria. A la vista de los resultados, no puede concluirse que la bacteria tenga un papel en la degradación del TCE ya que la volatilidad del TCE está jugando un papel importante en la desaparición del compuesto a lo largo del tiempo. Por otra parte las observaciones al microscopio láser confocal para determinar la viabilidad de la bacteria después de 7 días confirman que esta es viable en presencia de TCE (Figura 8).

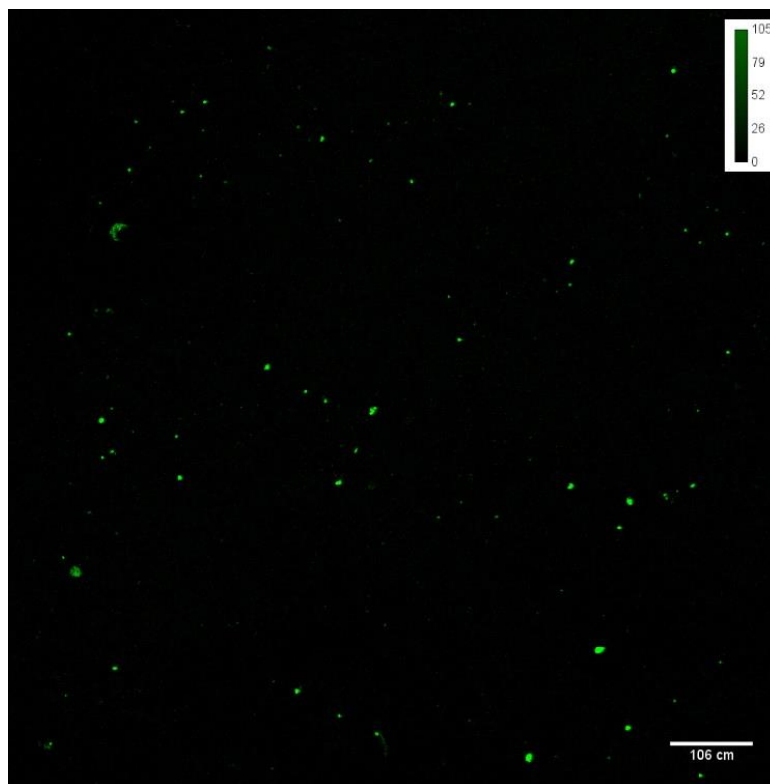


Figura 8. Imagen de Microscopía Láser Confocal de la bacteria *Pseudomonas* en presencia de TCE. En verde aparecen las células viables teñidas con el colorante SYTO 9.

Tabla 3. Cuantificación de TCE mediante GC-MS a los tiempos 0 y 7 días, en el experimento de degradación de TCE con *Rhodococcus*.

TRATAMIENTO	% DEGRADACIÓN
CONTROL (MM+TCE)	63
TCE (MM+TCE+bacteria(B))	93.75
CITRAL (MM+TCE+B+citral)	91.6
LIMONENO (MM+ TCE+B+lim)	63.4
FENOL (MM+TCE+B+fenol)	62.5

Por otra parte, los resultados de la Tabla 3 indican que *Rhodococcus* sin la adición de co-sustratos tiene un efecto positivo muy apreciable sobre la degradación de TCE, mostrando un resultado muy semejante a lo observado cuando el co-sustrato utilizado es el citral. Por el contrario, la adición tanto de limoneno como de fenol tiene un efecto negativo sobre la degradación. En

síntesis, los compuestos anteriores no tienen un papel cometabólico apreciable en la degradación de TCE e incluso perjudican el proceso. En cuanto a la viabilidad, se observó un resultado positivo en TCE en el microscopio de fluorescencia de barrido láser confocal (Figura 9).

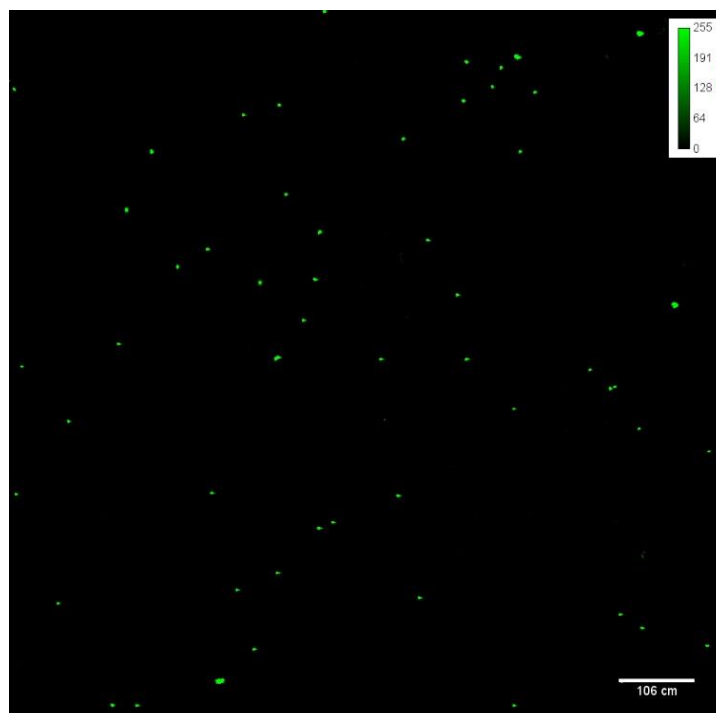


Figura 9. Imagen de Microscopía Láser Confocal tomadas a partir del cultivo de *Rhodococcus* en presencia de TCE. En verde aparecen las células viables teñidas con el colorante SYTO 9.

Tabla 4. Cuantificación de TCE mediante GC-MS a los tiempos 0 y 7 días, durante el experimento de degradación de TCE con la bacteria del orden Sphingomonadales.

TRATAMIENTO	% DEGRADACIÓN
CONTROL (MM+TCE)	63
TCE (MM+TCE+bacteria(B))	93.6
CITRAL (MM+TCE+B+citral)	51.7
LIMONENO (MM+ TCE+B+lim)	90.5
FENOL (MM+TCE+B+fenol)	72.6

En el caso de la bacteria 32 perteneciente al orden Sphingomonadales los resultados son similares a los discutidos arriba con *Rhodococcus* pero en este caso el limoneno tiene efecto positivo, mientras que el citral y en menor proporción el fenol, afectan negativamente a la degradación. Al igual que en el caso anterior, los ensayos de viabilidad indican que la bacteria crece en presencia de TCE y se mantiene viable a lo largo del tiempo (Figura 10).

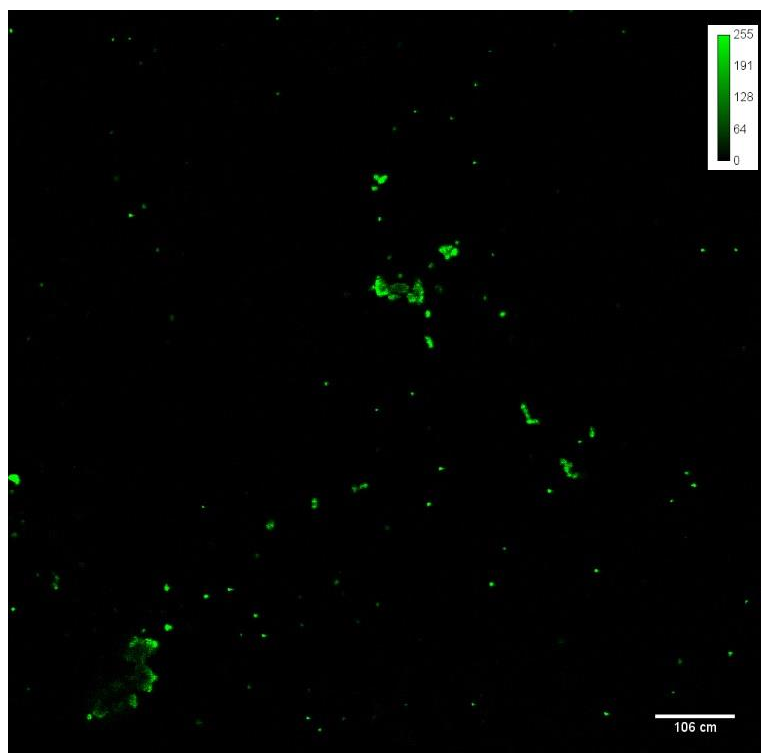


Figura 10. Imágen de Microscopía Láser Confocal tomadas a partir del cultivo de la bacteria perteneciente al orden *Sphingomonadales* en presencia de TCE. En verde aparecen las células viables teñidas con el colorante SYTO 9.

Debido a la implicación de la volatilidad del TCE que motiva una notable ambigüedad en los datos de degradación en presencia de las bacterias, se repitieron los experimentos anteriores incluyendo controles de volatilidad para cada tratamiento. Los valores de TCE obtenidos para cada cepa se pueden observar en las Tablas 5, 6 y 7.

Tabla 5. Porcentajes de degradación, obtenidos a partir de los datos de cuantificación de TCE por GC-MS a los 0 y 7 días, en el experimento con *Pseudomonas*.

TRATAMIENTO	% DEGRADACIÓN
CONTROL (MM+TCE)	62
TCE (MM+TCE+B)	74.8
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+citral)	52.6
CITRAL (MM+TCE+B+Citral)	73.7
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+Limoneno)	38.5
LIMONENO (MM+TCE+B+Lim)	64.4
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+Fenol)	57.6
FENOL (MM+TCE+B+fenol)	57.3

Tabla 6. Porcentajes de degradación, obtenidos a partir de los datos de cuantificación de TCE por GC-MS a los 0 y 7 días, en el experimento con *Rhodococcus*.

TRATAMIENTO	% DEGRADACIÓN
CONTROL (MM+TCE)	62
TCE (MM+TCE+B)	80.7
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+citral)	48
CITRAL (MM+TCE+B+Citral)	72.8
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+Limoneno)	14.1
LIMONENO (MM+TCE+B+Lim)	61.1
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+Fenol)	50.4
FENOL (MM+TCE+B+fenol)	78.4

Tabla 7. Porcentajes de degradación, obtenidos a partir de los datos de cuantificación de TCE por GC-MS a los 0 y 7 días, en el experimento de degradación de TCE con la bacteria de la clase Sphingomonadales.

TRATAMIENTO	% DEGRADACIÓN
CONTROL (MM+TCE)	62
TCE (MM+TCE+B)	63.5
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+citral)	39
CITRAL (MM+TCE+B+Citral)	71.7
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+Limoneno)	49.7
LIMONENO (MM+TCE+B+Lim)	72.5
CONTROL VOLATILIDAD (MM+TCE+Fenol)	65.6
FENOL (MM+TCE+B+fenol)	47.4

A partir de los resultados anteriores se realizó un estudio estadístico utilizando el programa SPSS IBM Statistics 22. Primero se realizó el análisis de los estadísticos descriptivos, Se obtuvieron los valores de la media y el error, éstos fueron representados gráficamente en las Figuras 11, 12 y 13. Posteriormente se realizó el test ANOVA de un factor (Figura 14), mediante el cual se realizó el análisis de la varianza estudiando los diferentes tratamientos utilizados (TCE, citral, limoneno y fenol) y los porcentajes de degradación obtenidos para cada uno de ellos entre los tiempos 0 y 7 días.

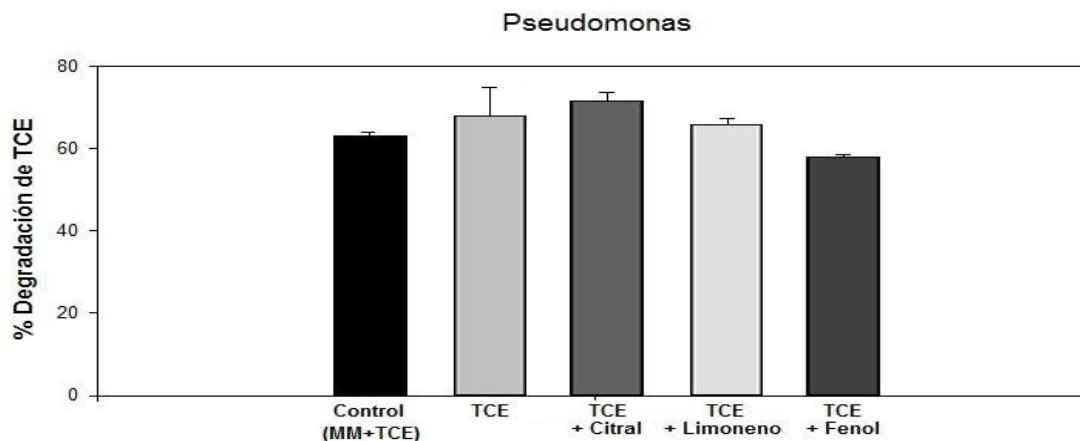


Figura 11. Influencia de las diferentes tratamientos sobre la degradación de TCE en el caso de la bacteria *Pseudomonas*.

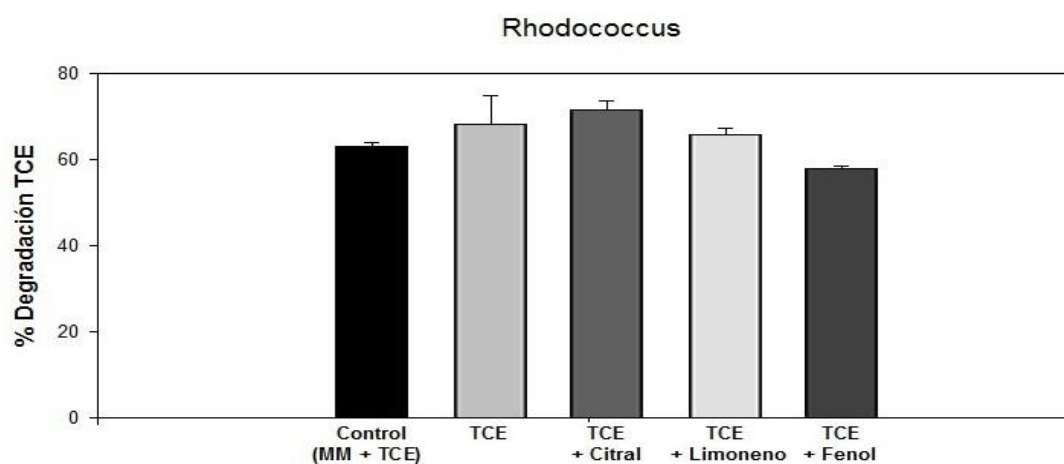


Figura 12. Influencia de las diferentes tratamientos sobre la degradación de TCE en el caso de la bacteria *Rhodococcus*.

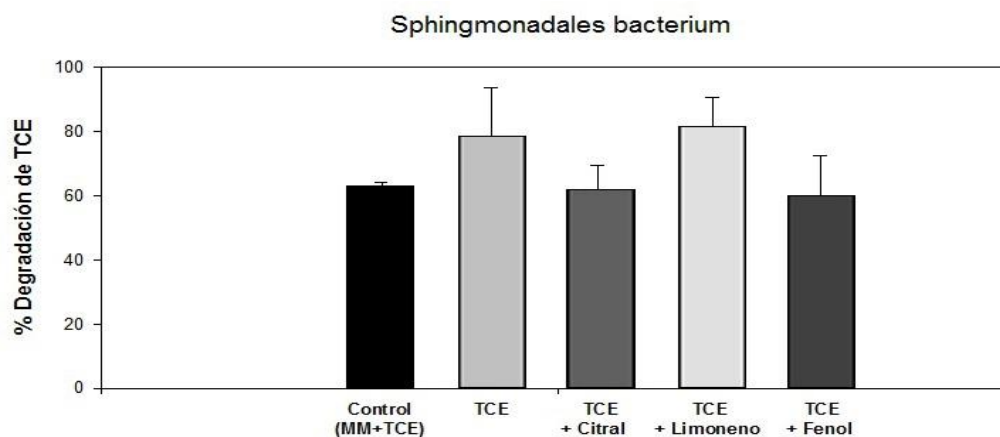


Figura 13. Influencia de las diferentes tratamientos sobre la degradación de TCE en el caso de la bacteria *del orden Sphingomonadales*.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
TCE	Entre grupos	703,671	3	234,557	1,486	,346
	Dentro de grupos	631,281	4	157,820		
	Total	1334,952	7			
Citral	Entre grupos	537,455	3	179,152	1,849	,279
	Dentro de grupos	387,540	4	96,885		
	Total	924,995	7			
Limoneno	Entre grupos	489,234	3	163,078	3,811	,114
	Dentro de grupos	171,145	4	42,786		
	Total	660,379	7			
fenol	Entre grupos	180,814	3	60,271	,540	,680
	Dentro de grupos	446,645	4	111,661		
	Total	627,459	7			

Figura 14. Datos obtenidos a partir del Test ANOVA de un factor.

Se observa que los valores de significancia son ≥ 0.05 , lo que indica que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos utilizados para cada cepa bacteriana.

Los resultados obtenidos de los dos experimentos de degradación de TCE son contradictorios en el caso de *Pseudomonas* y la bacteria del orden Sphingomonadales, en el medio mínimo MM con TCE sin adición de co-sustratos. *Rhodococcus* es la bacteria que muestra evidencias más consistentes de degradar TCE. Si consideramos, no obstante, la volatilidad del TCE en las condiciones específicas de cada experimento y los valores de degradación en cada uno de ellos, la degradación de TCE por *Rhodococcus* o la bacteria del orden Sphingomonadales en presencia de citral o limoneno es también significativa (Tablas 6 y 7).

Por otra parte, se realizaron recuentos bacterianos a los 0 y 7 días en los distintos medios (Figuras 15,16 y 17).



Figura 15. UFC/ml de *Pseudomonas*, en los tiempos 0 y 7 días.

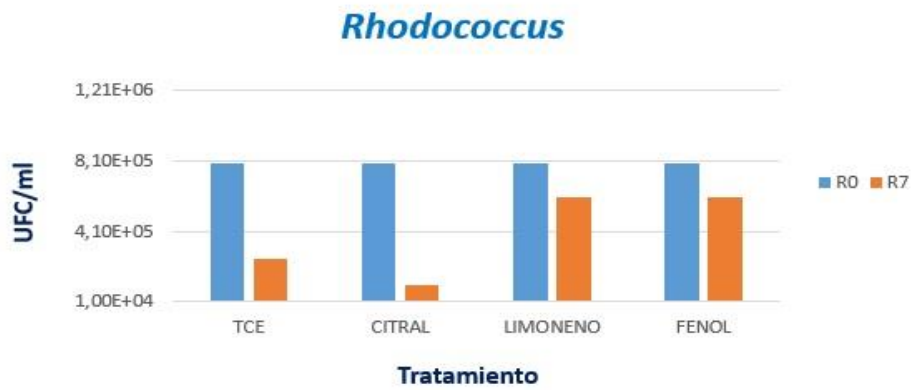


Figura 16. UFC/ml de *Rhodococcus*, en los tiempos 0 y 7 días.



Figura 17. UFC/ml de la bacteria del orden Sphingomonadales, en los tiempos 0 y 7 días.

De forma general se observa que las poblaciones bacterianas disminuyen a los 7 días, debido probablemente a la limitación nutricional en cuanto a la fuente de carbono. Sin embargo, esta disminución es menos acusada en *Pseudomonas* en el medio con TCE y citral (Tabla 5) y *Rhodococcus* en los medios con TCE con fenol y limoneno (Tabla 6). Hay que hacer notar, por otra parte, que podría existir una degradación parcial del TCE en presencia de las correspondientes oxigenasas (Introducción, apartado 1.5), inducidas o no cometabólicamente, sin que esto se refleje en el crecimiento bacteriano.

3.2.2 Degradación de TCE mediante combinación de nanopartículas nZVI y bacterias.

El objetivo de este apartado era analizar la combinación de NPs y bacterias para potenciar la degradación de TCE. Previamente es necesario determinar el orden del tratamiento (simultaneo o sucesivo), ya que en diversos trabajos se observó un efecto negativo de las nanopartículas sobre las bacterias presentes (Barnes et al., 2010). Para analizar esta posibilidad en nuestro caso, hemos llevado a cabo un experimento con las bacterias anteriores, incluyendo también a *Bacillus* sp y *Agrobacterium tumefaciens* obtenidas mediante el cultivo de enriquecimiento (apartado 2.3.2). Las bacterias se cultivaron en presencia de las nanopartículas nZVI y se procedió al recuento (Figuras 18 a 22), realizándose paralelamente un estudio de la viabilidad bacteriana a las 24 horas de exposición a las NPs (Figura 23).

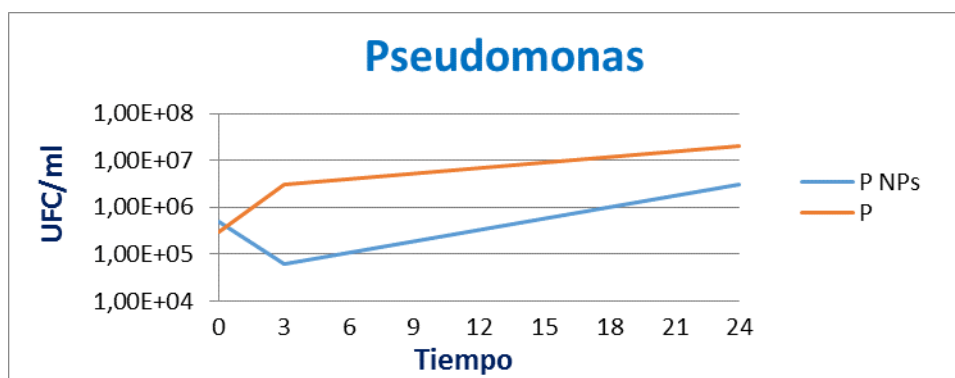


Figura 18. Recuentos bacterianos de un cultivo de *Pseudomonas* en ausencia y presencia de NPs.

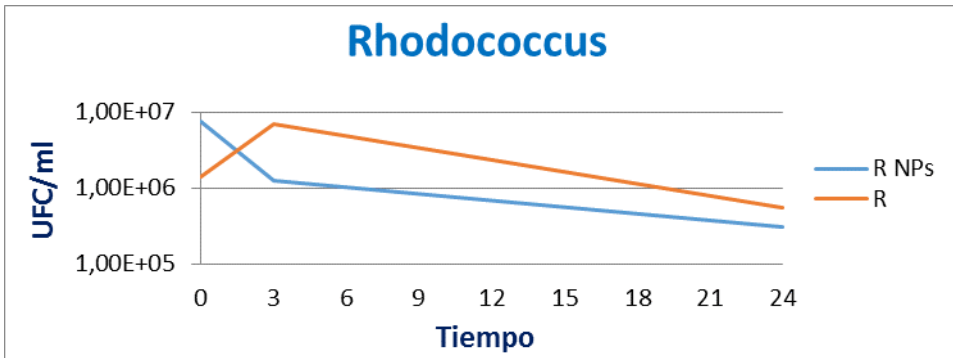


Figura 19. Recuentos bacterianos de un cultivo de *Rhodococcus* en ausencia y presencia de NPs.

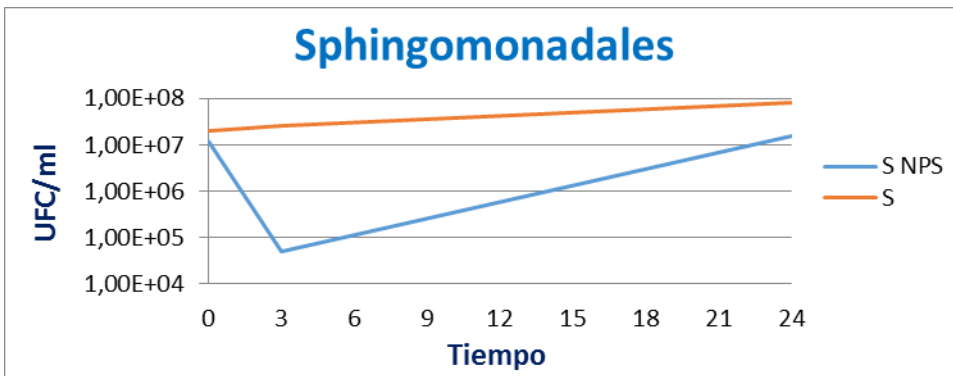


Figura 20. Recuentos bacterianos de un cultivo de la bacteria del orden Sphingomonadales en ausencia y presencia de NPs.

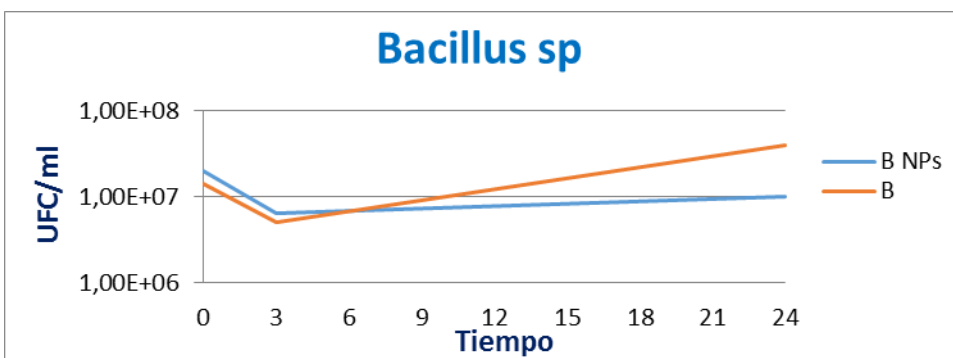


Figura 21. Recuentos bacterianos de un cultivo de *Bacillus.sp* en ausencia y presencia de NPs.

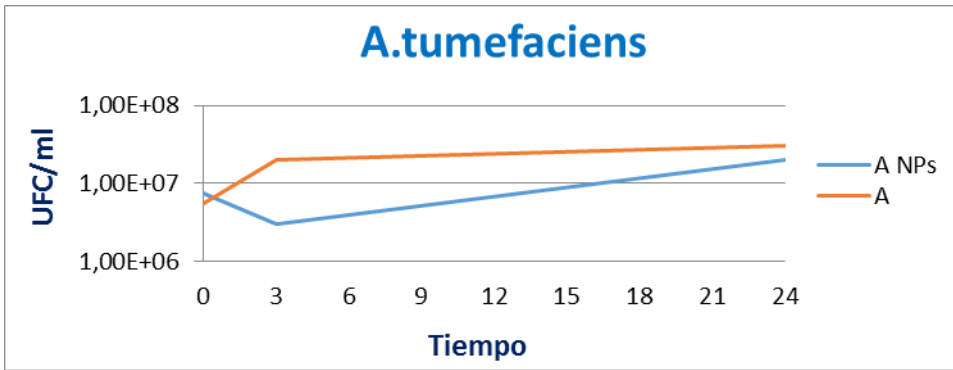


Figura 22. Recuentos bacterianos de un cultivo de *A.tumefaciens* en ausencia y presencia de NPs.

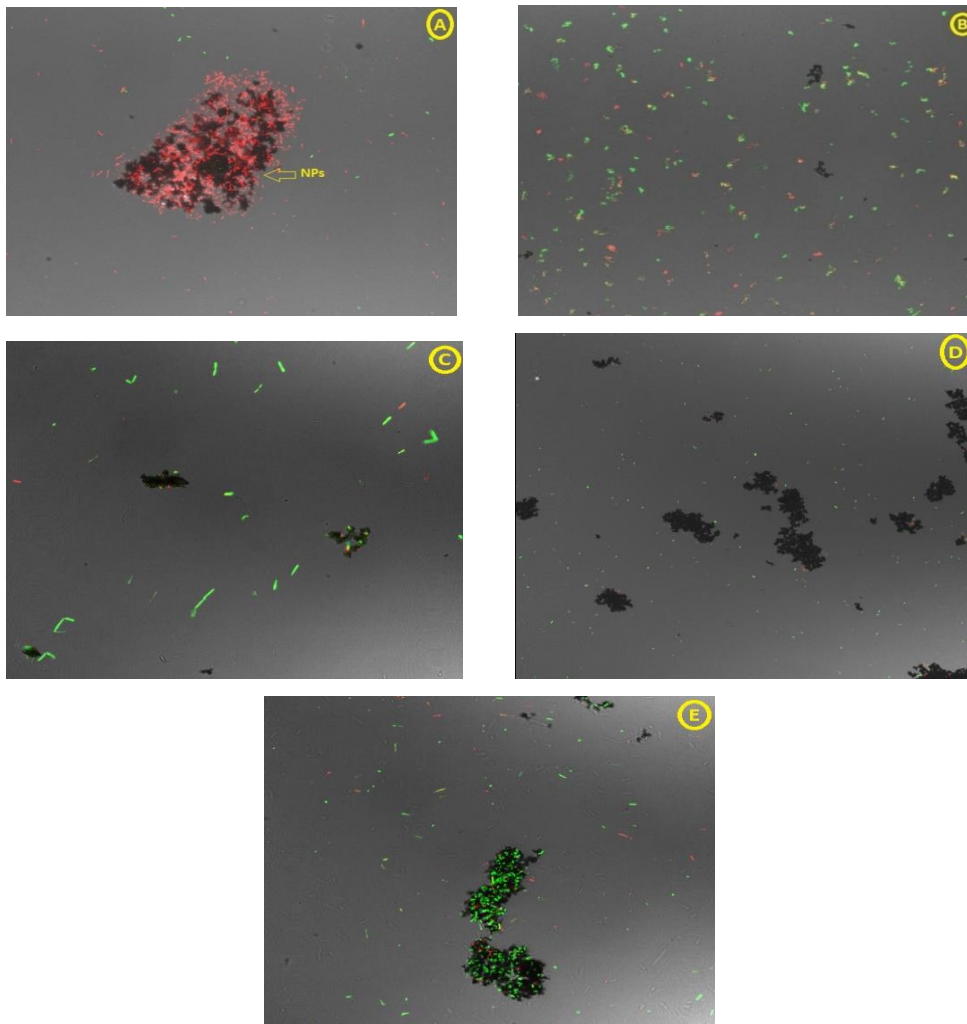


Figura 23. Análisis de la viabilidad bacteriana a las 24 horas en presencia de las NPs. Imágenes de Microscopía Confocal A) *Pseudomonas*, B) *Rhodococcus*, C) bacteria del orden Sphingomonadales, D) *Bacillus sp.*, E) *Agrobacterium tumefaciens*.

A la vista de los resultados representados en las tablas anteriores se puede decir que la adición de las NPs ejerce un efecto negativo sobre las bacterias, en las 3 primeras horas (caso de *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y bacteria del orden Sphingomonadales). Sin embargo, la población se recupera alcanzando recuentos bacterianos muy similares a los obtenidos en ausencia de NPs, por lo que se puede concluir que el efecto de las NPs tiene lugar entre las 0-24 horas. *Rhodococcus* tiene un crecimiento muy lento, por lo que sería necesario tomar medidas a tiempos superiores a las 24 horas. El análisis de viabilidad de las bacterias corrobora los datos anteriores, observándose células vivas y muertas; sin embargo, la sensibilidad es diferente entre las bacterias, siendo el ejemplo más evidente el de *Pseudomonas*, que muestra una acusada sensibilidad (Figura 23A) y *Agrobacterium*, donde las células en contacto con las NPs aparecen viables (Figura 23E).

Estos resultados sugieren que en los experimentos de degradación de TCE mediante la acción combinada de NPs y bacterias, la estrategia más adecuada es una adición consecutiva: primero las NPs y a partir de las 24 horas las bacterias. Sin embargo, sería necesario conocer previamente la sensibilidad del TCE hacia las NPs a lo largo del tiempo y profundizar en la volatilidad del TCE durante los experimentos.

4. CONCLUSIONES

1. La mayoría de las bacterias aisladas de los cultivos de enriquecimiento pertenecen a géneros con capacidades degradativas para diferentes compuestos, principalmente para organoclorados (*Aminobacter*, *Sphingomonas* y la bacteria del orden Sphingomonadales), hidrocarburos (*Brevibacillus* y *Bacillus*), fenol y otros (*Agrobacterium* y *Sinorhizobium*).

2. A partir del estudio de las poblaciones mediante DGGE se ha observado que estas aún no se han estabilizado en el tercer pase de enriquecimiento. No obstante, se han aislado 24 bacterias potencialmente útiles para ser aplicadas en técnicas de bioaugmentación.

3. Se han seleccionado cinco bacterias a partir del enriquecimiento para el análisis de sus capacidades de degradación de TCE y resistencia a la acción de las NPs nZVI.

4. Las bacterias seleccionadas muestran una notable resistencia a las NPs, por lo que pueden ser utilizadas en combinación con estas; también muestran capacidad de degradación del TCE, especialmente en el caso de *Rhodococcus* y la bacteria 32 (Orden Sphingomonadales).

5. El análisis estadístico de los resultados de degradación del TCE en presencia de cometabolitos muestra que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos utilizados para cada cepa bacteriana.

6. La volatilidad juega un punto fundamental en los experimentos de degradación de TCE, por lo que es necesario modificar las condiciones experimentales y mejorar la estadística en los análisis químicos.

7. Los resultados sugieren que la estrategia más adecuada para el tratamiento combinado NPs-bacteria, es la adición de NPs, posteriormente, a las 24 horas la adición de las bacterias. Esto requiere un análisis detallado del efecto de las NPs sobre el TCE durante ese tiempo.

5. REFERENCIAS:

1. Arnold WA, Roberts AL. (2000). Pathway and kinetics of chlorinated ethylene and chlorinated acetylene reaction with Fe (0) particles. *Jour. Sci & Tech*, 9: 1794-1805.
2. Artiola JF and Ramirez M. (2007). Chlorinated Solvent Contaminants in Arizona Aquifers. Part II: Innovative remediation methods and site characterization strategies. University of Arizona Superfund Basic Research Program-Translation Core. *SciTransfer*, Issue 002.
3. Barnes RJ, Van der Gast CJ, Riba O, Lehtovirta LE, Prosser JI, Dobson PJ, Thompson IP. (2010). The impact of zero valent iron nanoparticle on a river water bacterial community. *Jour. Hazard. Mat*, 184: 73-80.
4. Bennett P, He F, Zhao D, Aiken B, Feldman L. (2010). In situ testing of metallic iron nanoparticle mobility and reactivity in a shallow granular aquifer. *J. Contam. Hydrol*, 116:35-46.
5. Bhattacharyya D, Xu J, Smuleac V, Lewis S, Ormsbee L, Bachas L. (2010). Nanotechnology for TCE and PCB Dechlorination from Water: Nanoparticle Synthesis and Reactivity. *World Environmental and Water Resources Congress*, 411-416.
6. Boyde, A. (1988). Confocal optical microscopy. *Microscopy and analysis*, Enero, pp 7-13.
7. Bruce KD, Hiorns WD, Hobman JL, Osborn AM, Strike P, Ritchie DA. (1992). Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol*, 58: 3413–3416.
8. Chen Y, Lin T, Huang C, Lin J, Hsieh F. (2007). Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *Jour. Hazard.Mat*, 148: 660-670.
9. Chen Y, Lin TF, Huang C, Lin JC. (2008). Cometabolic degradation kinetics of TCE and phenol by *Pseudomonas putida*. *Chemosphere*, 72: 1671-1680.
10. Ciric L, Philip JC, Whiteley AS. (2010). Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. *FEMS Microbiol Letters*, 303:116-122.

11. Doucette WJ, Chard JK, Fabrizzi H. (2007). Trichloroethylene uptake into fruits and vegetables: Three years field monitoring study. *Environ Sci & Tech*, 41: 2505-2509.
12. Frascari D, Pinelli D, Nocentini M, Baleani E, Cappelletti M and Fedi E. (2008). A kinetic study of chlorinated solvent cometabolic biodegradation by propane-grown *Rhodococcus* sp. PB1. *Biochem. Eng. J*, 42: 139–147
13. Frascari D, Zanaroli G, Danko AS. (2014). In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review. *Jour. Hazard. Mat*, 283: 382-399.
14. Grieger KD, Fjordbølge A, Hartmann NB, Eriksson E. (2010). Environmental benefits and risks of Zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade off?. *Jour. Cont. Hydro*, 118: 163-183.
15. He F, Zhao D, Paul C. (2010). Field assessment of carboxymethyl cellulose stabilized iron nanoparticles for in situ destruction of chlorinated solvents in source zones. *Water. Res*, 44: 2360–70.
16. Henn KW, Waddill DW. (2006). Utilization of nanoscale zero-valent iron for source remediation—a case study. *Remed. J.*:57–76.
17. Hwang JW, Choi YB, Park S, Choi CY, Lee EY. (2007). Development and mathematical modelling of a two-stage reactor system for trichloroethylene degradation using *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biodegradation*, 18: 91–101.
18. Kocameci BA, Cecen F. (2010). Biological removal of the xenobiotic trichloroethylene (TCE) through cometabolism in nitrifying systems. *Bioresour Technol*, 101:430–433
19. Li XQ, Zhang WX. (2006). Iron nanoparticles: the core-shell structure and unique properties for Ni (II) sequestration. *Lagmuir*, 22: 4638-4642
20. Li Y, Wang C-P, Fan J-Z, Sun H-W. (2014). Aerobic Degradation of Trichloroethylene by Co-Metabolism Using Phenol and Gasoline as Growth Substrates. *J. Mol. Sci*, 15: 9134-9148; doi: 10.3390/ijms15059134.
21. Liu CC, Tseng DH, Wang CY. (2006). Effects of ferrous ions on the reductive dechlorination of trichloroethylene by zero-valent iron. *J. Hazard. Mater*, 136: 706-13.

22. Morono Y, Unno H, Tanji Y, Hori K. (2004). Addition of aromatic substrates restores trichloroethylene degradation activity in *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol*, 70:2830–2835.
23. Muyzer G, Waal E.C and Uitterlinden A.G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*, 59: 695-700.
24. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Method. Enzymol*, 155: 501-527.
25. Nzila A. (2013). Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environ.Pol*, 178: 474-482.
26. Noell A. (2009). Estimation of sequential degradation rate coefficients for chlorinated ethenes. *Practical Periodical of Hazardous Toxic and Radioactive Waste Management*, 13: 35–44.
27. O'Carroll D, Sleep B, Krol M, Boparai H, Kocur C. (2013). Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Adv. Water. Resour*, 51: 104-122. doi: 10.1016/j.advwatres.2012.02.005.
28. Pant P, Pant S. (2009). A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *Jour. Environ. Sci*, 22: 116-126.
29. Pardo JL, Perdomo MC, Benavides JL. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2: 1-108.
30. San Miguel A, Roy J, Gury J, Monier A, Coissac E, Ravane P, Geremia Raveton M. (2014). Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere. *Appl. Microbial. Biotechnol*, 98: 4257-4266.
31. Sánchez J, Peláez AI, Gallego JLR (2014). Biorremediación: conceptos, ámbito de aplicación y fundamentos metodológicos” En “Biotecnología y Medioambiente. I. Marín, JL. Sanz, R. Amils (Eds), pp: 70-87, Ephemera. Madrid.

32. Schmidt KR, Gaza S, Voropaev A, Ertl S, Tiehm A. (2013). Aerobic biodegradation of trichloroethene without auxiliary substrates. *Water research*, 59: 112-118.
33. Song H, Carraway ER. (2005). Reduction of chlorinated ethanes by nanosized zerovalent iron: kinetics, pathways, and effects of reaction conditions. *Environ. Sci. Technol*, 39: 6237–6345.
34. Suttinun O, Muller R, Luepromchai E. (2009). Trichloroethylene cometabolic degradation by *Rhodococcus* sp. L4 induced with plant essential oils. *Biodegradation*, 20: 281–291.
35. Suttinun O, Muller R, Luepromchai E (2010). Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Rhodococcus* sp. Strain L4 immobilized on plant materials rich in essential oils. *Appl. Environ. Microbiol*, 76(14):4684–4690
36. Suttinum O, Luepromchai E, Müller R. (2012). Cometabolism of trichloroethylene: concepts, limitations and available strategies for sustained biodegradation. *Environ. Sci. Biotechnol*, 12: 99-114.
37. Wang CB, Zhang WX. (1997). Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of TCE and PCBs. *Environ.Sci & Tech*, 31: 2154-2156.
38. Wei YT, Wu SC, Chou CM, Che CH, Tsai SM, Lien HL. (2010). Influence of nanoscale zero-valent iron on geochemical properties of groundwater and vinyl chloride degradation: a field case study. *Water. Res*, 44:131–40.
39. Xu J, Dozier A, Bhattacharyya D. (2005). Synthesis of nanoscale bimetallic particles in polyelectrolyte membrane matrix for reductive transformation of halogenated organic compounds. *J. Nanopart. Res*, 7:449–467.
40. Zhang W-x. (2003). Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. *J. Nanopart. Res*, 5: 323-332.

Información online:

1. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR), Toxicological profiles for trichloroethylene. Acceso: 09/04/2015. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp19.pdf>.
2. Derek R. Lovley, Ph.D. In situ Bioremediation of groundwater contaminated with trichloroethylene & Perchloroethylene (TCE & PCE). University of Massachusetts Amherst. Acceso 06/05/2015.

<https://www.umass.edu/research/situ-bioremediation-groundwater-contaminated-trichloroethylene-perchloroethylene-tce-pce>

3. Ordoñez JL. (2001). Procesos y tecnologías emergentes de remediación de aguas subterráneas contaminadas con disolventes clorados. IGME, Sevilla. Acceso: 09/04/2015.
<http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib15/022.pdf>
4. Superfund Research Program. In situ Bioremediation of TCE. National Institute of Environmental Health Sciences. USA. Acceso: 30/04/2015
<https://www.niehs.nih.gov/research/supported/dert/programs/srp/phi/archives/remediation/insitu/index.cfm>