



Universidad de Oviedo

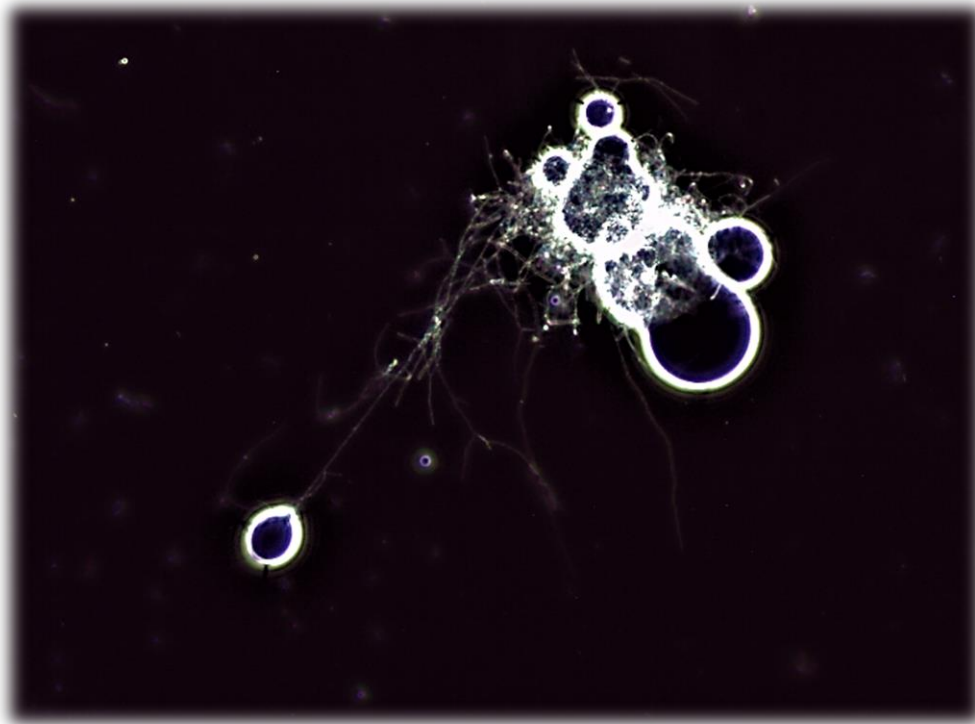
TRABAJO FÍN DE MÁSTER



Respuesta de las poblaciones microbianas de los suelos
contaminados con metales pesados a tratamientos de
descontaminación con nanopartículas

-

Response of microbial populations of soils contaminated with
heavy metals to decontamination treatments with nanoparticles



José Ignacio Gayo Peláez

Grupo de Tecnología, Biotecnología y Geoquímica Ambiental
(BIOGEOAMB)

Julio 2018

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y LA SALUD

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

TRABAJO FIN DE MASTER

**Respuesta de las poblaciones microbianas de
los suelos contaminados con metales pesados
a tratamientos de descontaminación con
nanopartículas**

Julio 2018

Certificado para la presentación del Trabajo Fin de Master del alumno José Ignacio Gayo Peláez bajo la tutorización de Ana Isabel Peláez Andrés, que autoriza la presentación del proyecto.

Tutor:

Ana Isabel Peláez Andrés

Estudiante:

José Ignacio Gayo Peláez

Firma

Firma

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que me han apoyado durante mi etapa académica que hoy culmina con la presentación de este trabajo.

*En primer lugar quisiera agradecer a mis **padres**, a mi **hermano** y a mis **abuelos**, que aunque algunos ya no están, se hubiesen sentido igual de orgullosos. Gracias a su apoyo, esfuerzo y ánimos he conseguido finalizar lo que un día empecé por pasión. Se dice que la genética es importante, pero aún más importante es el ambiente en el que te desarrollas; y desde pequeño me habéis enseñado a ser perseverante, trabajador, a luchar por lo que quieres y no darse por vencido, por todo ello y más, gracias.*

*También quiero agradecer a la **Dra. Ana Isabel Peláez**, ya que en su momento me dió la oportunidad de unirme a su grupo de investigación, siempre guiándome por el camino correcto, depositando su confianza y haciendo que tras un duro año; con su esfuerzo, este trabajo fuese presentado. De igual modo, quiero agradecer al **Dr. José Luis Rodríguez Gallego**, ya que siempre ha aportado su granito de arena y ha estado dispuesto a ofrecer su mano en lo que fuese. Al igual que el **Dr. Jesús Sánchez**, al que la pasión que transmite y el gran volumen de ideas generado llegan a ser una fuente de ingenio.*

*No me puedo olvidar de mis compañeros de laboratorio, ya que han hecho posible poder trabajar en un ambiente creativo en el que todas las ideas y errores fueron un impulso para mí. Gracias a **Alexander**, por darme consejos, solucionar problemas insolucionables a mi juicio y por ser una biblioteca de información que siempre tiene la respuesta. A **Verónica**, por ayudarme a sacar adelante experimentos que sin su paciencia no habrían visto la luz. A **Diego**, porque gracias a su actitud hizo que la definición de estrés fuese solo una cosa más para leer; por enseñarme la química de las “cosas” y aprender a sembrar “bichos”.*

*Por último y no menos importante, quiero agradecer a mi **novia**, a mis **amigos** de biología y a mis **amigos** de Tineo por el apoyo y confianza, tanto a distancia como presencial, que entre risas hacían que los momentos de agobio se olvidasen por unos instantes.*

“La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad” - Jules Verne

José Ignacio Gayo Pelaez (JULIO 2018)

RESUMEN

Hemos explorado la posibilidad de combinar tratamientos físico-químicos eficaces y poco agresivos medioambientalmente, como son las nanopartículas (NPs) de hierro cerovalente (nZVI) o goethita (oxihidróxido de hierro III), y la biorremediación, para el tratamiento de tres suelos contaminados de Avilés y zonas de Langreo, Asturias, que contienen altas concentraciones de Zn y Pb, además de Cu, As, Ni, Cr, Hg y Cd. Se aislaron de estos suelos bacterias cultivables, pertenecientes a los filos taxonómicos Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroidetes y Firmicutes, encontrándose bacterias altamente resistentes al As(V), y muy pocas a Hg y As(III). Se estudió su capacidad para utilizar diésel, hexadecano, naftaleno y fenol como fuentes de carbono, sin resultados concluyentes, excepto para *Chryseobacterium indoltheticum*, que mostró crecimiento en diesel y *Streptomyces* spp, en diesel, naftaleno o fenol.

En general, las NPs fueron mas eficaces para la fijación del Pb que del Zn, obteniéndose la reducción máxima a los tres días de tratamiento, aunque las nZVI fueron mas eficientes que la goethita en la eliminación del Zn y esta última más eficiente en la eliminación del Pb. En el caso del Zn los descensos fueron inferiores a los del Pb. La goethita también se mostró relativamente eficaz en la eliminación del Cu y menos del Cd. Respecto a los controles sin NPs, se observó una cierta inhibición del número de células bacterianas a los tres días en presencia de goethita y nZVI, recuperándose el nivel a los 30 días, coincidiendo con la disminución de los metales pesados. La diversidad bacteriana observada en las colonias desarrolladas en las placas de cultivo parece modificarse en presencia de las NPs, lo que se corroboró mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, DGGE, que mostró cambios específicos en las bandas de ADNr 16S amplificadas y separadas en los geles desnaturizantes.

ABSTRACT

We have explored the possibility of combining effective physical-chemical treatments and environmentally-friendly ones, such as nanoparticles (NPs) of zero-valent iron (nZVI) or goethite (iron oxyhydroxide III), and bioremediation, for the treatment of three contaminated soils in Avilés and areas of Langreo, Asturias, which contain high concentrations of Zn and Pb, as well as Cu, As, Ni, Cr, Hg and Cd. Cultivable bacteria belong to the taxonomic phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes, and were highly resistant to As (V), and very few to Hg and As (III). Its capacity to use diesel, hexadecane, naphthalene and phenol as carbon sources was studied, without conclusive results, except for *Chryseobacterium indoltheticum*, which showed growth in diesel, and *Streptomyces* spp, in diesel, naphthalene or phenol.

In general, the NPs were more effective for the fixation of Pb than Zn, obtaining the maximum reduction after three days of treatment, although the nZVI were more efficient than the goethite in the elimination of Zn and the latter more efficient in elimination of Pb. In the case of Zn, the decreases were lower than those of Pb. Goethite was also relatively effective in eliminating Cu and less in the case of Cd. Compared with controls without NPs, a certain inhibition of the number of bacterial cells was observed at three days in the presence of goethite and nZVI, recovering the level at 30 days, coinciding with the decrease in heavy metals. The bacterial diversity observed in the colonies developed in the culture plates seems to be modified in the presence of the NPs, which was corroborated by the gel electrophoresis technique with denaturing gradient, DGGE, which showed specific changes in the 16S rDNA bands amplified and separated in the denaturing gels.

ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal
- BDT: Big Dye Terminator
- BH: Bushnell Haas
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- DGGE: Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante
- ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- NPs: Nanopartículas
- nZIV: Nanopartículas de Hierro Cerovalente
- pb: pares de bases
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- Rpm: Revoluciones por minuto
- TAE: Tris-Acetato-EDTA
- TBE: Tris-Borato-EDTA
- TCLP: Toxicity Characteristic Leaching Procedure
- TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilediamina
- TSB: Tryptic Soy Broth
- UFC: Unidad Formadora de Colonia
- USEPA: United States Environmental Protection Agency
- UV: Ultravioleta
- V: Voltios

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIAL Y MÉTODOS	8
2.1. Emplazamientos de estudio	8
2.1.1. Toma de muestras	10
2.2. Caracterización de los emplazamientos	10
2.2.1. Caracterización química	10
2.2.2. Caracterización microbiológica	11
2.2.2.1. Recuento en placa y aislamiento bacteriano	11
2.2.2.2. Identificación bacteriana	11
2.2.2.3. Resistencia a metal(oid)es pesados en el medio	13
2.2.2.4. Degradación de hidrocarburos	14
2.3. Nano-remediación	15
2.3.1. Nanopartículas	15
2.3.2. Experimento de Nano-remediación	15
2.3.2.1. Caracterización química de la Nano-remediación	16
2.3.2.1.1. Análisis de las características de toxicidad mediante lixiviación (TCLP)	16
2.3.2.2. Caracterización microbiológica	16
2.3.2.2.1. Recuentos bacterianos en placa	16
2.3.2.2.2. DGGE	17
3. RESULTADOS	18
3.1. Caracterización emplazamientos	18
3.1.1. Caracterización química	18
3.1.2. Caracterización microbiológica	20
3.1.2.1. Recuentos en placa iniciales	20
3.1.2.2. Identificación bacteriana y resistencia a metal(oid)es pesados	21
3.1.2.3. Degradación de hidrocarburos	22
3.2. Nano-remediación	28
3.2.1. Caracterización química	28
3.2.2. Caracterización microbiológica	32
3.2.2.1. Recuentos en placa	32
3.2.2.2. DGGE	36
4. DISCUSIÓN	38
5. CONCLUSIONES	44
6. BIBLIOGRAFÍA	45

1. INTRODUCCIÓN

El rápido desarrollo de la industria durante el S.XIX y S.XX fue responsable de la extracción y diseminación de metales pesados sin ningún control por grandes áreas geográficas (Diels et al., 1999; Cecchin et al., 2017). Con el cese de la actividad industrial, se abandonaron una gran cantidad de emplazamientos con una mezcla de diversas sustancias contaminantes, tanto orgánicas como inorgánicas (Galdames et al., 2017). Esta mezcla de diversas sustancias, tanto de fuentes naturales como antropogénicas, hace que sea difícil identificar su procedencia en el medio ambiente (Peña-Fernández et al., 2014; Gil-Díaz et al., 2017).

Los metales pesados son uno de los contaminantes más frecuentes en suelos europeos (Tóth et al., 2016; Gil-Díaz et al., 2017), existiendo 2,5 millones de emplazamientos contaminados, de los cuales el 14% requieren actuación para su restauración y remediación según la Agencia Europea del Medio Ambiente (Braunschweig et al., 2013; Peña-Fernández et al., 2014; Tóth et al., 2016; Gil-Díaz et al., 2017). De igual manera, en Estados Unidos existen aproximadamente 350.000 lugares contaminados con varios compuestos tóxicos y se ha estimado que su restauración requiera más de 30 años (Cecchin et al., 2017). Estos datos reflejan la magnitud del problema, siendo una de las mayores preocupaciones medioambientales mundiales por sus efectos nocivos (Pandey et al., 2015;). Por su parte la Unión Europea ha desarrollado una estrategia para la protección del suelo en una directiva marco (Diario Oficial de la Unión Europea C168/29, 2007), en la cual se reconoce que la degradación del suelo tiene consecuencias graves para otros ámbitos de interés común en la UE, como el agua, la salud pública, el cambio climático, la protección de la naturaleza, la diversidad biológica y la seguridad alimentaria, y se establece la necesidad de aplicar procedimientos sistemáticos para determinar y frenar la degradación del suelo adoptando medidas preventivas.

Adicionalmente, con el aumento de la densidad de población, la productividad agrícola y la urbanización hacen que las concentraciones de estos contaminantes se incrementen progresivamente en los suelos, afectándolos negativamente debido a que no se degradan, tienen alta toxicidad, son muy persistentes y tienen la capacidad de lixiviarse (Satpathy et al., 2014) y alterar la cadena trófica (Pandey et al., 2015). Esta

situación tiene consecuencias potencialmente graves para la salud humana (Zhang et al., 2015).

Existe controversia en cuanto a las concentraciones nocivas de estos metales en el medio, ya que muchos son esenciales para el correcto funcionamiento de los sistemas biológicos y deben estar presentes en un determinado rango. Sin embargo este rango debe considerar el hecho de que a bajas concentraciones pueden afectar la actividad metabólica y a altas concentraciones provoquen toxicidad (Diels et al., 1999). En el ser humano, dependiendo de la naturaleza del contaminante, se sabe que la exposición crónica a metales pesados y metaloides, incluso a niveles relativamente bajos puede originar diferentes problemas para la salud, debido a que se puede acumular en diferentes partes del cuerpo (Qu et al., 2012; Peña-Fernández et al., 2014) y producir efectos tóxicos, como la carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad. La contaminación por metales pesados está directamente relacionada con defectos en recién nacidos, lesiones cutáneas, retardo físico y mental, discapacidad de aprendizaje, daño en hígado y riñón, y una multitud de otras enfermedades debido a que estos metales interaccionan con proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Park et al., 2008).

Los mayores reservorios de metales pesados son las áreas mineras, industriales y refinerías (Pandey et al., 2015). En el estudio que presentamos, se trata de suelos en áreas de terrenos industrializados de Avilés y zonas cercanas a la minería asturiana como es Langreo (Candín), emplazamientos que contienen principalmente altas concentraciones de Zn y Pb.

El Zn es uno de los metales pesados más tóxicos tanto en aguas como en suelos debido a su gran movilidad (Park et al., 2008). Produce toxicidad gastrointestinal y respiratoria y puede afectar a la inmunología del individuo (Walsh et al., 1994). El Pb por su parte ha sido reconocido como uno de los metales pesados emergentes más peligrosos entre los contaminantes ambientales, procedente de baterías eléctricas, fundición y minería entre otros (Achal et al., 2012). Provoca en la salud humana cólicos, encefalopatías, anemia o enfermedades renales, descritas desde la antigüedad, y más recientemente ampliadas a otros problemas como la hipertensión, déficits neurológicos y cognitivos, malformaciones congénitas, inmunotoxicidad y problemas en el desarrollo y

crecimiento. Incluso a pequeñas cantidades, el plomo induce proliferación celular ya que es un cofactor de la carcinogénesis; además compite con el calcio alterando las funciones de muchas enzimas (Goyer, 1990; Missoun et al., 2010). Estos efectos son más acusados en niños y jóvenes, donde inducen cambios en el comportamiento como hiperactividad o el déficit de atención y otros problemas (Wasserman et al., 1998; Peña-Fernández et al., 2014). En cualquier caso, el peligro de estos emplazamientos contaminados se incrementa al no presentarse usualmente un único contaminante, sino una mezcla que hace que los efectos negativos sobre la salud se acrecenten.

Hoy en día existen diferentes tecnologías disponibles para el tratamiento de este tipo de suelos contaminados, las cuales tienen como objetivo eliminar por inmovilización, absorción o transformación a productos menos dañinos estos metales pesados (Braunschweig et al., 2013).

Algunas de las técnicas tradicionales que se han venido desarrollando y utilizando hasta la actualidad en estos terrenos son la excavación del suelo, encapsulación, uso de coagulantes químicos, lavado del suelo, desorción térmica, incineración, recuperación por evaporación, tratamiento electrocinético y vitrificación de plasma, entre otras; muchas de ellas son costosas en términos económicos y energéticos y alteran notablemente las propiedades del suelo (Park et al., 2008; Fu y Wang, 2011; Michálková et al., 2014; Pandey et al., 2015). En los últimos años se han desarrollado otras técnicas alternativas en las cuales se usan microorganismos como bacterias, hongos, actinomycetes, levaduras o plantas para transformar los metales en sustancias no tóxicas o menos tóxicas, y también contaminantes orgánicos. Estas nuevas tecnologías (biorremediación), utilizan el potencial metabólico de los microorganismos, específicamente su capacidad para biodegradar parcial o totalmente una amplia gama de compuestos, con el fin de limpiar terrenos y aguas contaminadas (Madigan et al., 2015; Pandey et al., 2015), y ha sido utilizada desde hace años por el grupo BIOGEOAMB de la Universidad de Oviedo (ver abajo).

Los microorganismos del suelo son extremadamente importantes para el ciclo natural de los nutrientes en el medio ambiente y la reducción de la diversidad de las poblaciones microbianas en ambientes con diferentes contaminantes puede afectar el

rendimiento de los procesos de biorremediación (Cecchin et al., 2017), aunque el resultado final depende del papel funcional de las poblaciones afectadas en relación con los mismos (Jung et al., 2016). El suelo es un sistema biológico complejo, estructurado, heterogéneo, discontinuo y dinámico, y es difícil identificar los factores que determinan la diversidad y función de las comunidades microbianas en las diferentes condiciones medioambientales (Nannipieri et al., 2017). Aun así, es muy importante entenderlo para poder predecir el resultado cuando se aplican procesos de biorremediación, solos o combinados con otras tecnologías, como se comenta más adelante.

La biorremediación es económicamente accesible, competente, minimiza el uso de compuestos químicos, es selectiva para metales específicos con posibilidad de recuperarlos, fácil de aplicar en sitios contaminados y causa muy poca o ninguna contaminación secundaria derivada del proceso, por lo que tiene una menor agresividad medioambiental (Park et al., 2008; Singh et al., 2009; Kumar et al., 2011; Rizwan et al., 2014). Esto es posible debido a que los microorganismos tienen la maquinaria genética y estrategias de supervivencia que les permite vivir en estos hábitats contaminados, incluyendo mecanismos de detoxificación como la biotransformación, biomineralización o bioabsorción (Park et al., 2008; Pandey et al., 2015). Estos procesos microbianos modifican el comportamiento químico de los metales, especialmente su toxicidad, solubilidad y movilidad.

La biorremediación se basa en tres metodologías: atenuación natural, bioestimulación o bioaumentación.

- Se denomina atenuación natural, biorremediación intrínseca o biorremediación natural cuando se deja que los procesos naturales actúen y reduzcan por si mismos las concentraciones de contaminantes a lo largo del tiempo, con la participación de procesos físicos, químicos y/o biológicos. Los microorganismos autóctonos son los encargados de llevar a cabo estos procesos de mineralización o degradación de los contaminantes (Rizwan et al., 2014; Sánchez et al., 2014).

- Se denomina bioestimulación cuando se aplica externamente aceptores de electrones como el oxígeno y/o nutrientes como fertilizantes a los terrenos contaminados, con la finalidad de potenciar la acción de los organismos allí presentes para modificar/degradar los contaminantes (Rizwan et al., 2014; Sánchez et al., 2014).
- Se denomina bioaumentación a la adición de microorganismos especializados al medio contaminado, con el fin de potenciar y optimizar la eliminación de los contaminantes. Esta técnica es más efectiva en suelos con pocos microorganismos degradadores del contaminante (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010; Rizwan et al., 2014).

Además, la biorremediación se puede aplicar de dos formas: biorremediación *in situ* y biorremediación *ex situ* (Vidali, 2001; Singh et al., 2009; Kumar et al., 2011; Rizwan et al., 2014; Cecchin et al., 2017).

- La biorremediación *in situ* consiste en tratar el terreno contaminado sin moverlo del lugar en el que se encuentra: por ejemplo, aireando el terreno directamente o mediante el arado (*landfarming*) (Menendez-Vega et al., 2007; Sánchez et al., 2014; Cecchin et al., 2017). Este proceso tiene un menor coste debido a que no es necesario transportar el terreno contaminado a ningún lugar, minimizándose además la liberación de partículas contaminadas (Rizwan et al., 2014).
- La biorremediación *ex situ* consiste en realizar los procesos de tratamiento de los terrenos contaminados después de la excavación del suelo, denominándose *on site* si los procesos se realizan en el mismo lugar donde se encuentra la excavación o *ex situ* si se lleva a tratar a un lugar diferente a donde se realiza la excavación. Estas técnicas pueden utilizar biorreactores (*bioslurry*) o tratamientos de compostaje sobre láminas impermeables o en biopilas (*landfarming*) (Sánchez et al., 2014; Cecchin et al., 2017). Este proceso es más rápido que el equivalente *in situ*, debido a que se controlan mejor todos los parámetros y condiciones durante el tratamiento del suelo (Rizwan et al., 2014).

La biorremediación es considerada la técnica más respetuosa medioambientalmente (“eco-friendly”) y sostenible, pudiendo ser empleada en diferentes condiciones, con diferentes diseños y técnicas complementarias para realizar la descontaminación

(Rizwan et al., 2014; Kumari y Singh, 2016; Cecchin et al., 2017). Sin embargo, requiere largos periodos de tratamiento y puede no ser muy efectiva sobre altas concentraciones de contaminantes por la toxicidad para los microorganismos existentes. Por ello, su integración con nuevas tecnologías como la nanotecnología ofrece una interesante alternativa, con gran potencial para hacer la biorremediación más eficiente sin perder su carácter sostenible (Cecchin et al., 2017). El uso de nanomateriales, particularmente nanopartículas (partículas de tamaño menor a 100nm) para acelerar el proceso de descontaminación incrementando la eficiencia de la biorremediación se define como “Nanobiorremediación”. Efectos positivos potenciales sobre los microorganismos en el proceso, son la mejora del crecimiento microbiano por la inmovilización de los contaminantes, la inducción de enzimas degradadores/transformadores y/o la inducción de surfactantes que aumentan la solubilidad de los contaminantes (Kumari y Singh, 2016).

Sin embargo, uno de los retos pendientes para aplicar adecuadamente estas nuevas aproximaciones experimentales es la necesidad de entender detalladamente el comportamiento físico-químico de las nanopartículas en el medio y su interacción con los metales y con los microorganismos que habitan el suelo contaminado (Pandey et al., 2015; Cecchin et al., 2017). Por un lado se sabe que la utilización de las nanopartículas, provoca la inmovilización de metales pesados, reduciendo así su movilidad y biodisponibilidad (Kumari y Singh, 2016), facilitando, al menos teóricamente, la biorremediación. Por otra parte, los datos sobre los efectos en la microbiota del suelo al aplicar nanopartículas son contrapuestos, al haberse realizado fundamentalmente en el laboratorio, sobre especies concretas. En estas circunstancias, se han descrito efectos bactericidas (siendo más acusados sobre gram negativas como *Escherichia coli* o *Pseudomonas*), algicidas y en menor grado, fungicidas (Cagigal et al. 2018; Lei et al., 2018). Sin embargo, cuando se aplican al suelo, los efectos sobre las comunidades microbianas pueden variar, dependiendo del contenido en materia orgánica y mineral, entre otros parámetros (Pawlett et al., 2013; Lei et al., 2018), pudiendo incluso favorecer el desarrollo de comunidades microbianas específicas, como las que se benefician de la producción de H₂ en anaerobiosis, en

presencia de nanopartículas de hierro de valencia cero (metanogénicas, homoacetogénicas o sulfatorreductoras) (Cagigal et al. 2018; Lei et al., 2018).

Las nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI) son las más comúnmente utilizadas por sus propiedades físico-químicas: son un buen donador de electrones y actúan como precursoras para óxidos de hierro por su oxidación espontánea de Fe(0) a Fe(II) y Fe(III), inmovilizando así metal(oid)es de una forma muy efectiva (Galdames et al., 2017; Gil-Díaz et al., 2017; Cagigal et al. 2018; Lei et al., 2018). Aunque su efecto frente a los metales pesados ha sido estudiado extensamente, aún no existe, como se ha mencionado arriba, un modelo claro de los efectos locales sobre la microbiota (Pawlett et al., 2013; Cecchin et al., 2017; Cagigal et al. 2018; Lei et al., 2018). Aunque el hierro está clasificado como un agente no tóxico, diversos estudios indican que puede actuar negativamente en las células a través de las especies reactivas de oxígeno generadas por las nanopartículas o por los iones metálicos producidos (algo aún no aclarado totalmente) (Lei et al., 2018). En cuanto a las nanopartículas de goethita, debido a los pocos estudios realizados a día de hoy, la información sobre su aplicación medioambiental es aún más incompleta. Tan solo algunos estudios han comprobado la toxicidad en aguas, incluyendo a los invertebrados o peces (González et al., 2017). Además, debido a su coste, no han sido muy utilizadas en remediación, en comparación con otros tipos de nanopartículas de hierro. Ambos tipos de nanopartículas (nZVI y goethita) están siendo también utilizadas por el grupo BIOGEOAMB de la Universidad de Oviedo, en el contexto del desarrollo de nuevas tecnologías de remediación de suelos (Menéndez et al., 2016; Gil-Díaz et al., 2017; Cagigal et al. 2018).

De todo lo expuesto aquí se deduce que, a la hora de seleccionar tecnologías mixtas, además de factores como los contaminantes, naturaleza del suelo, el coste, tiempo requerido y la complejidad de la tecnología de descontaminación, es necesario tener en cuenta los tipos de nanopartículas que se van a usar y su toxicidad potencial para los microorganismos del medio ambiente. La situación más deseable es utilizar simultáneamente o secuencialmente (Menéndez et al., 2016) nanopartículas efectivas para eliminar el/los contaminantes sin que afecten a las poblaciones implicadas en los procesos de biorremediación.

Los objetivos planteados para este trabajo son:

- Caracterizar microbiológicamente diferentes suelos de Asturias, contaminados con metales pesados.
- Comparar la efectividad de dos tipos de nanopartículas de hierro: hierro de Valencia cero (nZVI) y Goethita (oxihidróxido de hierro III), en la eliminación de metales pesados de suelos contaminados.
- Comprobar la toxicidad de las nanopartículas anteriores sobre las bacterias medioambientales durante el tratamiento descontaminante.
- Observar la evolución de las poblaciones microbianas durante todo el estudio en los suelos seleccionados, usando técnicas dependientes e independientes de cultivo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Emplazamientos de estudio

Los emplazamientos seleccionados para este estudio se encuentran en el territorio del Principado de Asturias. El primero de ellos está localizado en una de las principales áreas industriales que más ha sufrido las consecuencias de esta industrialización, en el entorno de la ciudad de Avilés, dónde actividades como la siderurgia, la producción de zinc o la fabricación de fertilizantes se encuentran integradas en el espacio urbano. Consiste en una parcela ubicada en la zona costera de la ciudad, colindante con la playa de El Espartal y una de las parcelas propiedad de la empresa Asturiana de Zinc. Diversos estudios indican que los niveles de contaminación, tanto atmosférica (Gallego et al., 2002) como de los suelos (Sierra et al., 2014), son elevados, pudiendo llegar a generar un riesgo tanto para la salud humana como para el medioambiente.

Se han seleccionado dos zonas para realizar el muestreo. La primera de ellas ha sido tomada en la zona más próxima a la costa (Figura 1, Avilés A), mientras que la segunda ha sido muestreada en la zona posterior al cordón dunar (Figura 1, Avilés B) que atraviesa la parcela dividiéndola en dos.



Figura 1: Lugar de recogida de muestra del emplazamiento denominado Avilés (A y B).

El segundo emplazamiento cubre 80km² en una zona minera de carbón del municipio de Langreo, denominada Candín (Figura 2). Tiene una historia de actividad minera e industrial que data de la década de 1850 (Martínez et al., 2014). Esta actividad dejó un legado de sitios contaminados, convirtiendo a esta zona en una de las más contaminadas del norte de España (Gallego et al., 2016).

La región se encuentra a lo largo del río Nalón, que es el más largo y voluminoso de Asturias. Las altitudes en el área varían desde 200m (ubicación de las áreas urbanas y la industria) a 900m (entornos rurales, bosques), con la presencia de montañas escarpadas. La muestra ha sido tomada en las cercanías de las instalaciones mineras del pozo Candín, perteneciente a HUNOSA.



Figura 2: Lugar de recogida de muestra del emplazamiento denominado Candín.

Estos suelos (Avilés A, Avilés B y Candín) se seleccionaron por sus diferentes características, tanto físicas como químicas, resaltando las diferentes concentraciones de metales pesados que en ellos se encuentran.

2.1.1. Toma de muestras.

En ambos emplazamientos las muestras han sido recogidas mediante una sonda holandesa, tomándose muestras de suelo correspondientes al horizonte superficial (0-30cm de profundidad) que se depositaron en bolsas individuales de plástico estériles para la posterior homogenización.

2.2. Caracterización de los emplazamientos

2.2.1. Caracterización Química

Las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron empleando un tamiz de 2mm. La caracterización de estos suelos se realizó en un laboratorio externo acreditado (Eurofins Analytico, Países Bajos) en el cual se determinaron las concentraciones totales de los 8 elementos más frecuentemente presentes en los suelos mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

En base a que las concentraciones totales son elevadas se observó el porcentaje lixiviable (fracción biodisponible) mediante la realización del TCLP (“Toxicity Characteristic Leaching Procedure”).

La prueba TCLP de acuerdo con el Método USEPA 1311 (1992) se utilizó para evaluar los metales presentes en las muestras de suelo. El TCLP es un método de extracción de una muestra de suelo para simular la lixiviación a través de un perfil de suelo. El método sirve para determinar si el residuo producido presenta características tóxicas. En el método TCLP primero se determina el pH de la muestra y posteriormente se somete a contacto con una mezcla de ácido acético/hidróxido de sodio (sosa cáustica) en una proporción 1:20 (Muestra:Solvente).

Para ello se pesa 1 gramo de muestra utilizando la balanza de precisión Cobos XT-220A (I.C.T, S.L., ESPAÑA). La muestra se introduce en un tubo Falcon estéril y se le añaden 20mL de reactivo. Esta mezcla se agita durante 18 horas a 170 rpm, para a continuación centrifugar a 11.000 rpm durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur de plástico y se procede a su filtrado a 0,25micras. Una vez filtrado se acidifican las muestras para su conservación y se envían al laboratorio de la Universidad de Oviedo para su análisis mediante ICP-MS que nos proporciona la parte lixiviable de cada suelo (biodisponible).

2.2.2. Caracterización microbiológica

2.2.2.1. Recuento en placa y aislamiento bacteriano

Se extrajo 1g de muestra homogénea de las tres diferentes áreas estudiadas y se transfirió a un tubo de polietileno estéril. Las bacterias fueron separadas de las partículas de tierra usando un método de suspensión en pirofosfato, para el cual al gramo de tierra se le añaden 30mL de solución 0.1M de pirofosfato de sodio y se agita durante 7-10 minutos para formar la suspensión.

Tras 5 minutos después de la agitación cuando la materia orgánica más pesada ha precipitado se extrae 1mL de sobrenadante que es usado para preparar diluciones en serie hasta 10^{-8} ; 100 μ L de cada dilución son usados para sembrar las bacterias en placas con medio TSB (Tryptic Soy Broth, Honeywell Fluka) mediante esparcimiento con asa de siembra. Las bacterias fueron incubadas a 28°C durante 3 días. Pasados los 3 días, las colonias que eran visualmente diferentes se re-sembraron por agotamiento en estrías en una nueva placa de medio TSB para obtener cultivos puros con el fin de poder identificar cada colonia por métodos genéticos.

Además, también se realiza un recuento de todas las colonias crecidas en cada placa, expresadas como UFC (Unidades Formadoras de Colonia) por gramo de suelo.

2.2.2.2. Identificación bacteriana

Para la identificación bacteriana de las colonias cultivables aisladas se usaron métodos genómicos de secuenciación, amplificando el gen que codifica para el ARN ribosomal (rARN) 16S mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa; Bruce et al., 1992). El ADN procedente de las bacterias aisladas se extrajo usando el kit comercial de extracción PowerSoil DNA Isolation (MO BIO, USA).

El ADN bacteriano de cada cepa se usó para amplificar los genes ARNr 16S en una reacción de PCR usando DNA Polymerase (EURx) y los oligonucleótidos cebadores 27F y 1492R (Byers et al., 1998):

El volumen de reacción fue de 50 μ L, que incluyen 25 μ L de Master Mix (dNTPs, buffer, Optitaq ADN polimerasa), 2 μ L del oligonucleótido 27F (10 μ M) y 2 μ L del oligonucleótido 1492R (10 μ L), 1-6 μ L de ADN y completando hasta 21 μ L de H₂O. Los productos de ADN amplificados son de \approx 1500pb, los cuales se analizan mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa E (1%) en Tris-Borato-EDTA (TBE), seguido de una tinción con el colorante Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics, Japón) y se corre a 65V durante 1,5 horas. Este gel se visualiza posteriormente usando el equipo Gel Logic 200 Imaging System (Eastman Kodak, USA) con luz UV. El patrón de peso molecular utilizado fue el ADN del fago Lambda digerido con el enzima de restricción *Pst*I. Las bandas que contienen los genes 16S amplificados nos indican que la amplificación se realizó correctamente y se puede purificar el ADN para la secuenciación usando el Kit comercial illustra GFXTM (PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, UK). Tras la purificación, se analiza el contenido de ADN (ng/ μ L) con el equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Singapur). El gen codificante del ARNr 16S se envía al Laboratorio de Secuenciación de Unidad de Citometría y Secuenciación de los Servicios Científico Técnico de la universidad de Oviedo donde se realiza la secuenciación mediante el secuenciador Sanger, pero anteriormente se debe hacer pre-secuenciación. El ciclo de pre-secuenciación se realizó usando 1 μ L de BDT (Big Dye Terminator, contiene terminadores dideoxi ddNTPs marcados), 1,5 μ L buffer BDT, 1 μ L oligonucleótido, 0-6.5 ADN (concentración entre 200-500ng totales) y 0-6.5 H₂O, hasta completar 10 μ L totales de reacción. El oligonucleótido usado es el 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') a 1:5 (Oligonucleótido:H₂O).

Las secuencias obtenidas tras la secuenciación son analizadas usando el visor de cromatogramas FinchTV Versión 1.5.0 (Geospiza Inc., USA) y la identificación de las secuencias se realizó por comparación con aquellas presentes en la base de datos BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) usando la librería de genes del RNA ribosómico 16S (Bacteria y Archaea), procedente del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se empleó el algoritmo de búsqueda para secuencias similares

(MegaBlast); la recompensa y la penalización para las bases de coincidencia y desajuste se establecieron en +1 y -4, respectivamente. Las cepas se identificaron hasta los géneros, y en los casos de secuencias suficientemente largas (> 700 bases) y una identidad estrechamente emparejada (99%) hasta la especie.

2.2.2.3. Resistencia a metal(oid)es pesados en el medio

Se ensayó la resistencia de las colonias aisladas a diferentes concentraciones de metal(oid)es pesados como el As o el Hg, por ser los más comunes y estar presentes en la gran mayoría de terrenos contaminados. Para evaluar la resistencia al As(III), As(V) y Hg, se cultivaron en un medio de TSB con concentraciones crecientes de los diferentes metal(oid)es como se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Medios de cultivo TSB con As(III), As(V) y Hg.

As(III)					As(V)				
Concentración	As(III)	H ₂ O	TSA	Volumen final	Concentración	As(V)	H ₂ O	TSA	Volumen final
0 mM	0 mL	12 mL	18 mL	30 mL	0 mM	0 mL	15 mL	15 mL	30 mL
2 mM	1,2 mL	10,6 mL	18 mL	30 mL	20 mM	0,6 mL	14,4 mL	15 mL	30 mL
5 mM	3 mL	9 mL	18 mL	30 mL	50 mM	1,5 mL	13,5 mL	15 mL	30 mL
10 mM	6 mL	6 mL	18 mL	30 mL	100 mM	3 mL	12 mL	15 mL	30 mL
15 mM	9 mL	3 mL	18 mL	30 mL	200 mM	6 mL	9 mL	15 mL	30 mL
20 mM	12 mL	0 mL	18 mL	30 mL	300 mM	9 mL	6 mL	15 mL	30 mL
					400 mM	12 mL	3 mL	15 mL	30 mL
Hg									
Concentración	HgCl ₂	H ₂ O	TSA	Volumen final					
0 mM	0 mL	1,2 mL	28,8 mL	30 mL					
25 mM	0,075 mL	1,125 mL	28,8 mL	30 mL					
50 mM	0,15 mL	1,05 mL	28,8 mL	30 mL					
100 mM	0,3 mL	0,9 mL	28,8 mL	30 mL					
200 mM	0,6 mL	0,6 mL	28,8 mL	30 mL					
300 mM	0,9 mL	0,3 mL	28,8 mL	30 mL					
400 mM	1,2 mL	0 mL	28,8 mL	30 mL					

Una vez realizado el medio de cultivo con el metal, se vertió sobre placas de Petri que se dividieron virtualmente en zonas donde se sembró cada bacteria extraída de los terrenos contaminados. Las bacterias se cultivaron durante una semana a 30°C y durante todo ese tiempo se revisaron y fotografiaron diariamente.

2.2.2.4. Degradación de hidrocarburos

Para la examinar la posible degradación por las bacterias cultivables aisladas se prepararon medios líquidos a los cuales se les añadieron los hidrocarburos más comunes.

Las bacterias se cultivaron en 3mL de medio líquido con medio Bushnell Haas (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), en tubos de ensayo. Este medio contiene todos los nutrientes excepto la fuente de carbono (Tabla 2), por lo que solo crecerán aquellas bacterias que pueden descomponer el hidrocarburo que se le adiciona (Diesel, Hexadecano, Naftaleno o Fenol) (Tabla 2).

Además también se cultivaron en medio TSB (Apartado 2.2.2.1), como control positivo de crecimiento bacteriano en medio líquido en Bushnell Haas sin fuente de carbono, como control negativo, y para facilitar la comparación con el crecimiento en presencia de hidrocarburo, y en Bushnell Haas con glucosa para comprobar la utilización de una fuente de carbono general. Se preparó una alícuota con cada bacteria aislada, la cual mediante un asa de siembra se dispersó en agua destilada para añadir 100µL de esta mezcla a cada tubo de ensayo

Tabla 2: Composición de los medios con los diferentes hidrocarburos.

BUSHNELL HAAS (BH)	2,6g/800mL H ₂ O
TSB	2,4g/800mL H ₂ O
BH + GLUCOSA	1g/100mL BH
BH + DIESEL	2,8mL/100mL BH
BH + HEXADECANO	2,8mL/100mL BH
BH + NAFTALENO	0,5g/100mL BH
BH + FENOL	10mg/100mL BH

Los cultivos se mantuvieron en agitación (150 rpm), a 28°C de temperatura durante 12 días, durante los cuales se tomaron medidas con el espectrofotómetro (Hach Lange DR 2800, Alemania) a 625nm para medir la densidad óptica del posible crecimiento bacteriano y comparar el primer día con los sucesivos. Además, debido a que algunas bacterias en medio líquido crecen en agregados que dificultan los análisis espectrofotométricos, en este caso el crecimiento se analizó por peso seco. Para ello se pesaron los tubos de ensayo vacíos al inicio del experimento, una vez sometidos a la temperatura de 70°C (1 hora en estufa), y los mismos al acabar el experimento. El

crecimiento bacteriano y la ausencia de contaminación se comprobaron también mediante observaciones directas en un microscopio óptico de contraste de fases (Nikon Eclipse E200).

2.3. Nano-remediación

2.3.1. Nanopartículas

Dos tipos de nanopartículas fueron incluidas en el estudio: Nanopartículas de Hierro Valencia Cero (nZVI) y de Goethita (oxihidróxido de hierro III), $\text{Fe}^{3+}\text{O}(\text{OH})$. Se utilizó una dispersión de agua estabilizada comercial de nZVI NANOFER 25S (NANO IRON Rajhrad, República Checa). El contenido de Fe (0) fue 14-18% y 2-6% de óxidos de hierro. El ácido poliacrílico se usó para estabilizar la suspensión de nZVI frente a la agregación. Detalles adicionales sobre las características físicas y químicas están disponibles en www.nanoiron.cz. Las nanopartículas se usaron inmediatamente después de la recepción. Antes de su uso, la solución se cubrió con papel de aluminio para evitar la degradación por la luz y se agitó durante 1h. El pH de la suspensión de nZVI fue alcalino (12.2 ± 0.1). En este experimento se utilizó una concentración del 5% de nZVI, que representa 7-9 g de Fe (0) por kg de suelo.

También se utilizó una dispersión acuosa de nanopartículas de goethita <5nm (Sigma Aldrich, EEUU) con una concentración de 19.5-20.5%, aunque la concentración utilizada en el experimento fue de 1%. El pH de la solución acuosa es de 2.5-3.5 y una pureza del 99.5%.

2.3.2. Experimento de Nano-remediación

El experimento se desarrolló poniendo en contacto las nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI) y de goethita con 20g de cada suelo contaminado (Avilés A, Avilés B y Candín) en un recipiente estéril para muestras con el fin de verificar el comportamiento de la microbiota de los suelos con la adición de las nanopartículas en tratamientos de Nano-remediación. Además se realizó un experimento control para cada suelo al que no se le adicionó nanopartículas.

Las muestras y tratamientos se realizaron por triplicado en cada suelo según se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Tratamiento de los diferentes suelos.

Suelo	Tratamiento	Dosis NP	Suelo	H ₂ O
Avilés A	Control	0%	20g	7mL
	Goethita	1%	20g	6,2mL
	nVZI	5%	20g	6,2mL
Avilés B	Control	0%	20g	6mL
	Goethita	1%	20g	5,2mL
	nVZI	5%	20g	5,2mL
Candín	Control	0%	20g	20mL
	Goethita	1%	20g	20mL
	nVZI	5%	20g	19,2mL

Tras realizar la mezcla de nanopartículas y suelo, se mantuvieron en agitación durante 30 días a 300rpm y a temperatura ambiente ($\approx 24^{\circ}\text{C}$). Se tomaron muestras a los tiempos 0, 3 y 30 días para observar como disminuían los metales con el tratamiento, y como afectaba este a la microbiota presente en los suelos.

2.3.2.1. Caracterización química de la Nano-remediación

2.3.2.1.1. Análisis de las características de toxicidad mediante lixiviación (TCLP)

Durante todo el proceso de toma de muestras (en los tiempos 0, 3 y 30 días) se aplicó el método TCLP descrito en el apartado 2.2.1 para observar las variaciones presentes en la fracción biodisponible de los suelos a causa de la adición de nanopartículas, lo que nos permite a su vez comparar como esos cambios en la química del suelo puede afectar a los microorganismos presentes.

2.3.2.2. Caracterización microbiológica

2.3.2.2.1. Recuentos bacterianos en placa

Para el seguimiento de las poblaciones microbianas y su cuantificación se sigue la metodología de recuentos en placa descrita en el punto 2.1.2.2. Los análisis se llevaron a cabo a los 3 días de cultivo en las placas, contando las colonias crecidas en las diferentes diluciones, y reflejándose los resultados como UFC (unidad formadora de colonia) por gramo de suelo.

2.3.2.2.2. DGGE

Para tener una idea inicial de la presencia de bacterias (no necesariamente solo las cultivables) y poder comparar las distintas muestras, se lleva a cabo un análisis en base a la detección y separación de marcadores filogenéticos en geles de poliacrilamida. El método más directo es la técnica de DGGE (Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante), que 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 citosinas (C) que impiden que las dos cadenas de ADN se separen completamente en el proceso de desnaturalización (ver abajo).

El ADN de doble cadena migra por el gel hasta encontrar una determinada concentración desnaturalizante de la mezcla a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas se detiene. La concentración a la cual las cadenas se detienen depende de la secuencia de nucleótidos, ya que el contenido de dobles o triples enlaces de puentes de hidrogeno será diferente en presencia de pares de adenina-timina o citosina-guanina (Myers et al., 1987). El equipo utilizado para este análisis fue DCode™ Universal Mutation Detection System (BIO-RAD, EE.UU.) y el protocolo desarrollado se basó en el creado por Muyzer et al. (1993).

Para el estudio de las muestras de ADN procedentes de los terrenos contaminados sometidos a los tratamientos con nanopartículas, se extrajo 0,25g de tierra de cada muestra del triplicado de cada tratamiento a los tiempos 0, 3 y 30 días para la extracción de ADN directamente del suelo usando un kit comercial (Soil DNA Purification Kit, EURx, Poland). El ADN extraído se sometió a amplificación del gen 16S realizando la PCR de todas las bacterias presentes en el suelo (tanto cultivables como no cultivables) usando polimerasa BioTaq (Bioline) y los siguientes oligonucleótidos:
P3GC 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3';
907R 5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'

La concentración de ADN tras la amplificación se midió con el Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Singapur). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 6% de 0,8 mm de grosor en un tampón TAE 0.5X (0.5X Tris-acetato 0.04M; EDTA 0.001M Ph8.0). Se usó un gradiente desnaturalizante de 42-45% (ajustado para una mayor resolución) que aumenta en la dirección de la electroforesis.

Los agentes polimerizantes del gel fueron: TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina) y Persulfato de amonio al 10%. La electroforesis se realizó con una migración inicial a 110V durante 5min y después se dejó a 70V durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo el gel se tiñó con SYBR Gold (Life Technologies, EE. UU.) durante 45 minutos en oscuridad y posteriormente se visualizó en el transiluminador Gel Logic 200 Imaging System con luz UV.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de los emplazamientos

3.1.1. Caracterización química

Para la caracterización química de los tres diferentes suelos se determinaron las concentraciones totales de los 8 principales elementos que pueden producir contaminación (Tabla 4).

Tabla 4: Cantidad de metal(oides)es totales en los diferentes suelos

Análisis	Unidad	Candín	Avilés B	Avilés A
Características				
Materia seca	% (m/m)	81,2	95,8	98,6
Metales				
Arsénico (As)	mg/kg ms	84	56	30
Cadmio (Cd)	mg/kg ms	0,96	8	21
Cromo (Cr)	mg/kg ms	31	13	13
Cobre (Cu)	mg/kg ms	70	56	650
Mercurio (Hg)	mg/kg ms	1,9	1,3	88
Níquel (Ni)	mg/kg ms	28	8	7,8
Plomo (Pb)	mg/kg ms	340	260	2900
Zinc (Zn)	mg/kg ms	350	2200	6800

Se observa que los elementos que están presentes en mayor cantidad son el Zn, Pb en los tres emplazamientos, y el Cu en el caso de Avilés A. También hay que destacar que la zona con mayores concentraciones de estos metales pesados es Avilés A, donde el Zn llega a concentraciones de 6800 mg/kg ms; en Avilés B también se obtuvieron altas

concentraciones de Zn pero menores que en Avilés A, y en Candín es el emplazamiento con menores concentraciones de los tres seleccionados.

Según la resolución del 20 de marzo de 2014, de la Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente, por la que se establecen los Niveles Genéricos de Referencia para metales pesados en Suelos del Principado de Asturias, el emplazamiento de Avilés A tiene concentraciones totales de Pb muy superiores para un uso industrial (el más permisivo) del suelo; también el Zn estaría por encima de los límites en un uso recreativo, junto con los elementos Cd, Cu y Hg, estando este último cercano a los límites de concentración para un uso industrial.

En el suelo de Avilés B, las concentraciones son mucho menores y solo sobrepasarían las concentraciones límites cuando se le atribuye un uso a los suelos que no sea industrial, residencial o recreativo. En relación al emplazamiento Candín tan solo el Pb estaría cercano al límite para un uso residencial o recreativo del lugar. Estas concentraciones son totales por lo que se debe tener en cuenta que la biodisponibilidad de estos metales en el suelo puede variar, y será esta fracción biodisponible la que afecte directamente a la microbiota. En la Tabla 5 están reflejadas las concentraciones biodisponibles de los cuatro elementos más abundantes que están por encima de los límites de detección de los equipos empleados.

Tabla 5: Elementos presentes en los suelos muestreados, en su forma lixiviable.

	Cu	Zn	Cd	Pb
Avilés A	1,85 ppm	670,54 ppm	3,37 ppm	36,89 ppm
Avilés B	0,62 ppm	243,67 ppm	2,08 ppm	1,49 ppm
Candín	0,43 ppm	12,18 ppm	0,08 ppm	1,50 ppm

Debemos destacar que las fracciones biodisponibles de los elementos Zn y Pb siguen siendo las más abundantes en los suelos seleccionados. En cuanto al Zn, se encuentra en mayor proporción en Avilés A, siendo menor en Avilés B, y mucho menor en Candín. En relación al Pb es mayoritario en Avilés A y mucho menor en Avilés B y Candín. Los elementos Cu y Cd son minoritarios y con muy poca concentración en relación al Zn y Pb, estando además muy cerca del límite de detección de los equipos.

3.1.2. Caracterización microbiológica

3.1.2.1. Recuentos en placa iniciales

En la Figura 3 se muestra el cultivo en placa de los tres diferentes suelos, en los cuales se realizó un recuento inicial para observar como varía la población bacteriana de una muestra de suelo recién recogida y las muestras utilizadas en el experimento de nano-remediación. Además de este procesamiento inicial de suelo, se aislaron todas las bacterias que presentaban una morfología diferente, para su identificación.

Como se puede observar los recuentos iniciales mostrados en la Figura 4, nos indican que la cantidad de bacterias presentes en los diferentes emplazamientos es muy similar. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 3, la diversidad fenotípica aparente en Avilés (A y B) es mayor que en Candín.

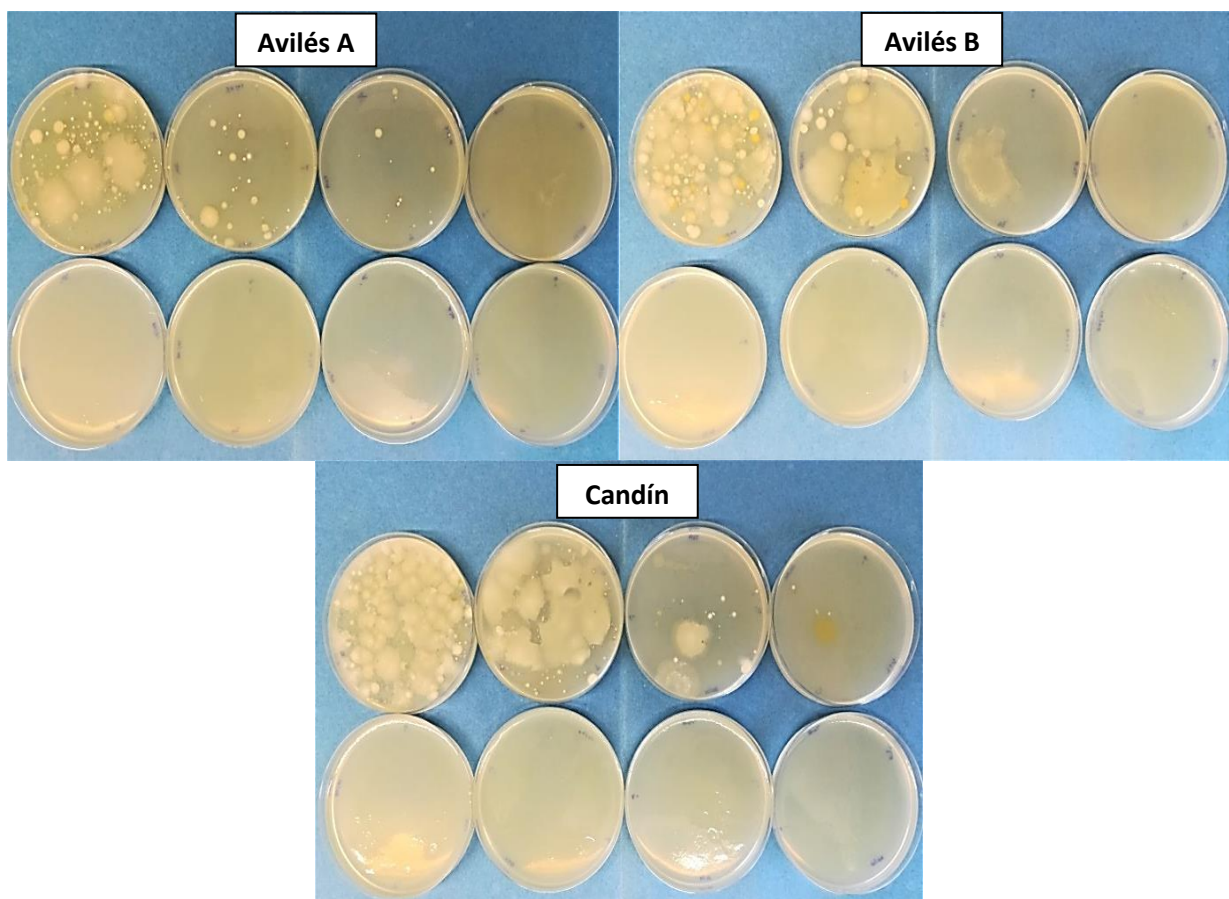


Figura 3: Crecimiento bacteriano en placa de cada suelo, de mayor a menos dilución (izquierda a derecha y de arriba a abajo).



Figura 4: Recuentos iniciales de las poblaciones microbianas presentes en los diferentes emplazamientos.

3.1.2.2. Identificación bacteriana y resistencia a metal(oid)es pesados

En la Tabla 6 se muestran las identificaciones bacterianas llevadas a cabo tras la secuenciación del gen ARN ribosomal 16S de cada una de las bacterias aisladas en los diferentes suelos. Como se observa en la Tabla, se obtuvo una mayor diversidad bacteriana en el suelo de Avilés B, seguido de Candín y por último de Avilés A, donde las concentraciones de metales son mayores. Los resultados de las bacterias con menor a un 99% de identidad permitieron solamente identificar el género, siendo posible la identificación de la especie únicamente en aquellas en las que la identidad era del 99% o superior. Además en los experimentos en medios con metal(oid)es se obtuvo una mayor resistencia para altas concentraciones de As(V), ocurriendo lo contrario para el As(III), que es más tóxico. En el medio con mercurio se observa que tan solo dos especies bacterianas (*Arthrobacter subterraneus* en Avilés A y *Streptomyces spp.* en Candín) son capaces de crecer con una concentración de 100µM de mercurio en el medio, obteniéndose unas resistencias muy bajas o nulas en el resto.

Tabla 6: Identificación bacteriana de los diferentes géneros y especies presentes en los tres tipos de suelos, así como su resistencia al crecimiento en medios con As(III), As(V) y Hg.

Emplazamiento	Nomenclatura	Género/Especie	Identidad	Resistencia (μM)		
				As (III)	As(V)	Hg
Avilés A	A1	<i>Arthrobacter spp.</i>	98%	0	400	25
	A2	<i>Variovorax soli</i>	99%	2	400	25
	A3	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	99%	5	400	0
	A4	<i>Bacillus spp.</i>	98%	5	400	0
	A6-1	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	100%	2	400	25
	A6-2	<i>Pseudomonas mandelii</i>	99%	5	400	25
Avilés B	B1	<i>Pontibacter spp.</i>	97%	2	400	0
	B2	<i>Bacillus spp.</i>	98%	5	200	0
	B3	<i>Paenibacillus peoriae</i>	99%	2	0	25
	B4	-	-	2	400	25
	B5	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99%	2	300	0
	B6	<i>Bacillus simplex</i>	100%	2	400	0
	B7-1	-	-	5	400	0
	B7-2	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	99%	2	400	100
	B8	<i>Streptomyces spp.</i>	99%	2	400	0
	B9	<i>Bacillus toyonensis</i>	99%	2	200	0
B10	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	5	400	0	
Candín	C1	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	99%	0	400	0
	C3	<i>Streptomyces spp.</i>	99%	0	100	100
	C4-1	<i>Flavobacterium spp.</i>	98%	2	200	25
	C4-2	-	-	2	400	0
	C5	<i>Bacillus mycoides</i>	99%	0	200	0
	C6	-	-	2	400	0
	C7-1	-	-	0	100	0
	C7-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	2	20	0
C8	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99%	2	400	25	

3.1.2.3. Degradación de hidrocarburos

La Figura 5 muestra las curvas de crecimiento en medio TSB. Aunque la mayoría de las bacterias crecen en este medio, se observan diferencias notables entre ellas, algo normal para algunos de los microorganismos del suelo, que pueden estar adaptados a concentraciones de nutrientes muy inferiores a las presentes en ese medio.

En la Figura 6 se muestra el crecimiento bacteriano en medio Bushnell Haas (BH) al que se le adicionó como fuente de carbono la glucosa. Un resultado interesante es que existe una mayor disparidad en cuanto a la rapidez y eficacia de utilización de esta fuente de carbono (son pocas las bacterias que presentan un crecimiento apreciable a los dos días de incubación y la mayoría presentan un máximo de crecimiento a los 5-6 días). Además, una proporción significativa no crecen en esta fuente de carbono, lo que muestra de nuevo un grado de especialización notable para las bacterias que crecen en esos ambientes contaminados

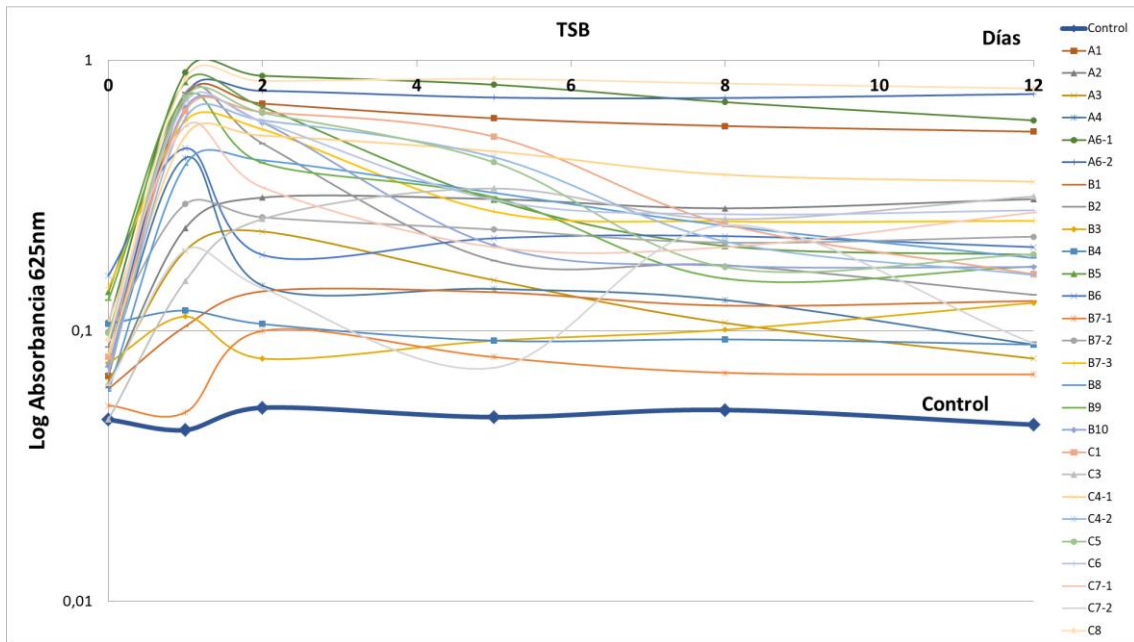


Figura 5. Curvas de crecimiento (absorbancia a 625nm) de las bacterias aisladas, en medio TSB.

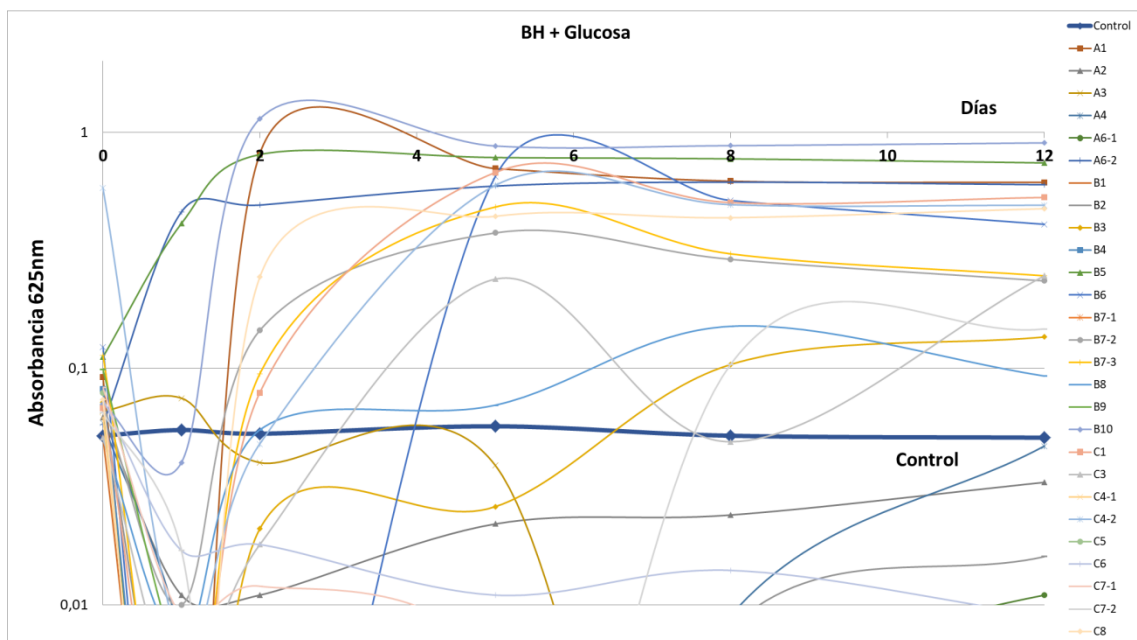


Figura 6. Curvas de crecimiento (absorbancia a 625nm) de las bacterias aisladas, en medio BH con glucosa.

En la Figura 7 se muestra el crecimiento bacteriano en medio BH con diesel como fuente de carbono. En este caso solo dos cepas mostraron un crecimiento significativo: B1 y A6-1, que corresponden a *Pontibacter* spp. y *Chryseobacterium indoltheticum*.

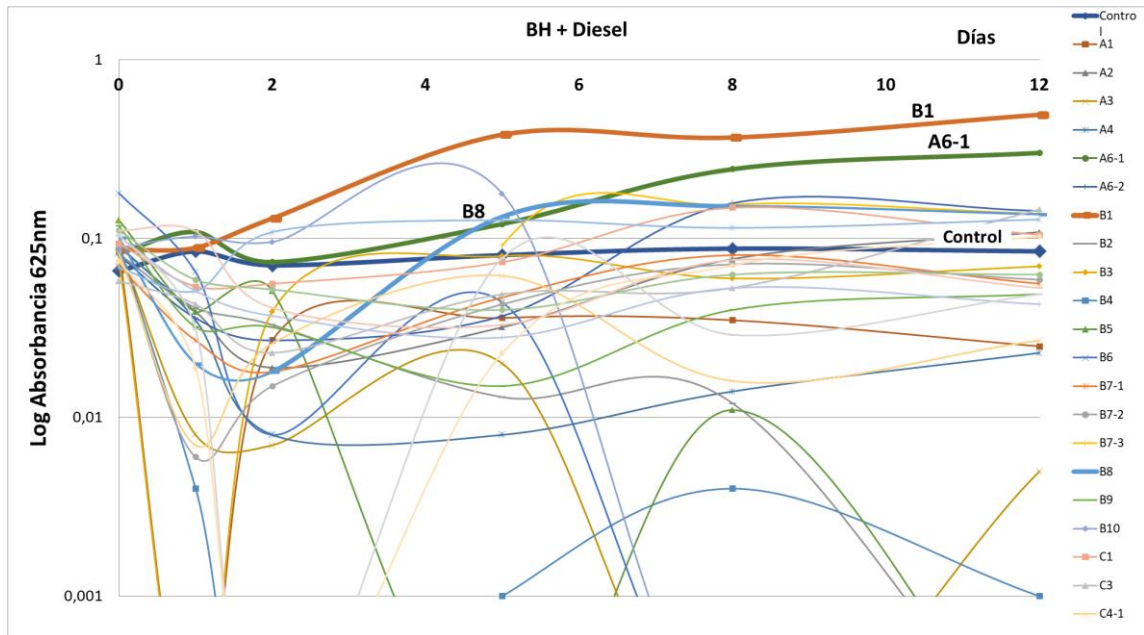


Figura 7. Curvas de crecimiento (absorbancia a 625nm) de las bacterias aisladas, en medio BH con diesel.

Sin embargo, las observaciones en el microscopio en el caso de *Pontibacter* indicaron que el aumento de la densidad óptica del medio era debido a la turbidez motivada por la posible producción de surfactantes y no por el aumento de la densidad celular (Figura 8). La presencia de metales es uno de los factores que inducen la producción de biosurfactantes en microorganismos (Kiran et al., 2011), por lo que la turbidez puede originarse por la disgregación de las gotas de los hidrocarburos.



Figura 8. Observación de un cultivo de *Pontibacter spp.* en medio BH+Diesel a los 5 días en el microscopio de contraste de fases (40x) La flecha roja indica gotas de diesel y la flecha verde las bacterias

También se observó cierto crecimiento a los 5 días de la bacteria B8 (*Streptomyces spp.*) (Figura 9).

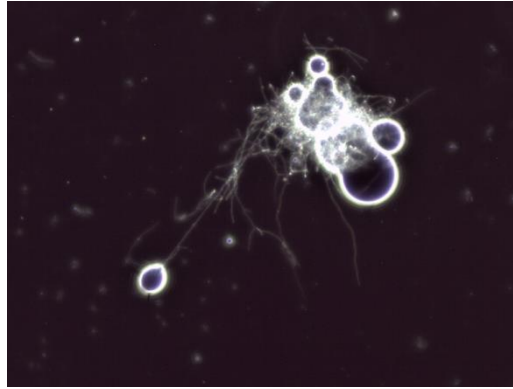


Figura 9. Bacteria B8 (*Streptomyces spp.*) en medio BH + Diesel, adherida a gotas de Diesel. Observación en campo oscuro (100x).

En la Figura 10 se muestra el crecimiento bacteriano en un medio BH que contiene hexadecano como fuente de carbono. En este caso tan solo una bacteria (A6-1, *Chryseobacterium indoltheticum*) parece mostrar crecimiento, aunque las observaciones al microscopio mostraron una cantidad de bacterias menor a la esperada, lo que sugiere, como en el caso de *Pontibacter* con diésel, que el incremento de la densidad óptica del cultivo se debe a otras causas.

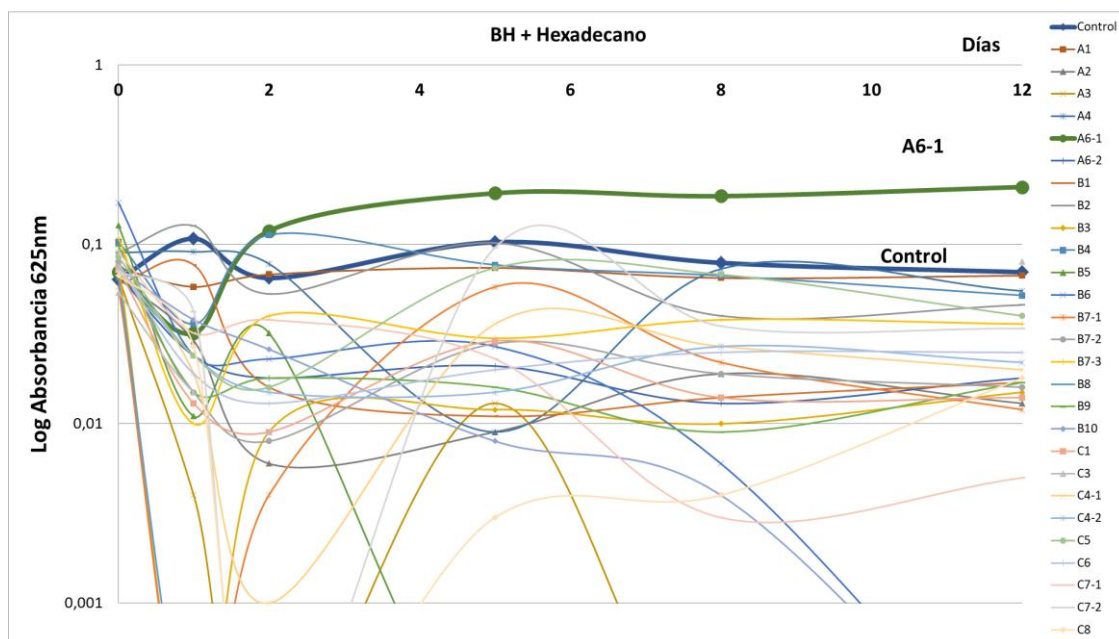


Figura 10. Curvas de crecimiento (absorbancia a 625nm) de las bacterias aisladas, en medio BH con hexadecano.

En la Figura 11 se muestra el crecimiento bacteriano en un medio BH que contiene naftaleno como fuente de carbono. El crecimiento es muy pobre y solamente tres bacterias parecen presentar algo de crecimiento respecto al control como son las

cepas B6, B8 y B10, identificadas como *Bacillus simplex*, *Streptomyces spp.* y *Bacillus megaterium*. Sin embargo, las observaciones al microscopio indicaron que solamente la bacteria B8 desarrolla un crecimiento micelial característico de *Streptomyces spp.* en ese medio (Figura 12).

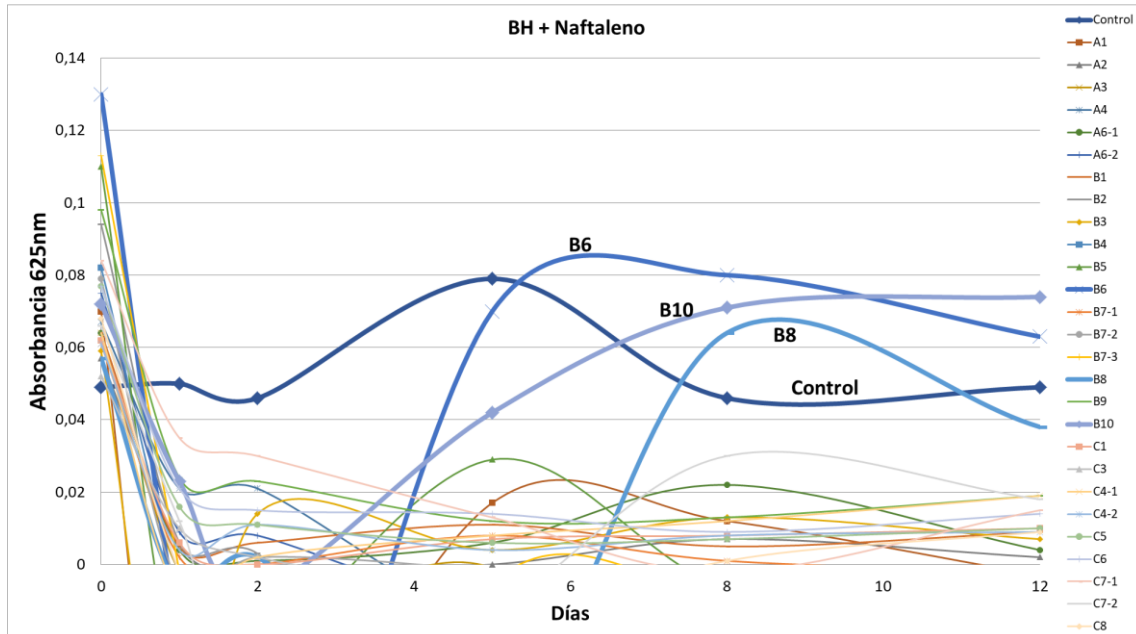


Figura 11. Curvas de crecimiento (absorbancia a 625nm) del crecimiento de las bacterias aisladas, en medio BH con naftaleno.

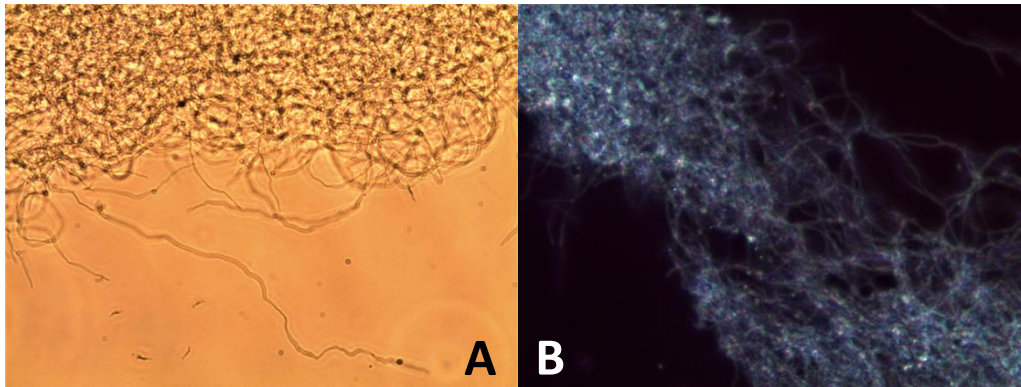


Figura 12. Observación de C3 (*Streptomyces spp.*) en el microscopio de contraste de fases óptico (100x) (A) y en campo oscuro (B) en medio BH + Naftaleno

Por último, en la Figura 13 se muestra el crecimiento bacteriano en un medio BH que contiene fenol como fuente de carbono. Ninguna de las bacterias analizadas es capaz de utilizar el fenol en los tiempos ensayados.

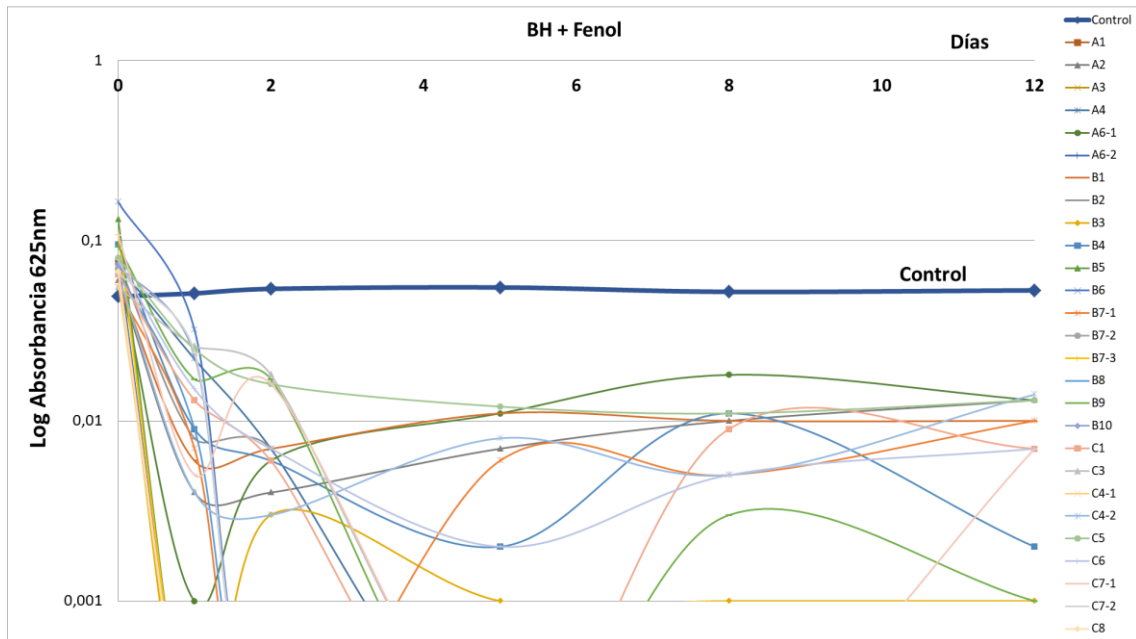


Figura 13. Curvas de crecimiento (absorbancia a 625nm) de las bacterias aisladas, en medio BH con fenol.

La bacteria C3 (*Streptomyces spp.*) Creció en todos los medios ensayados formando agregados, haciendo imposible medir su densidad óptica, por lo que el crecimiento se estimó por peso seco (apartado 2.2.2.4).

Los resultados a los 12 días de incubación mostraron que esta bacteria presenta una notable capacidad para crecer en el medio sintético Bushnell Haas con fenol o diésel como fuente de carbono (Figura 14). El crecimiento de *Streptomyces spp.* se comprobó mediante observaciones al microscopio (Figura 15).

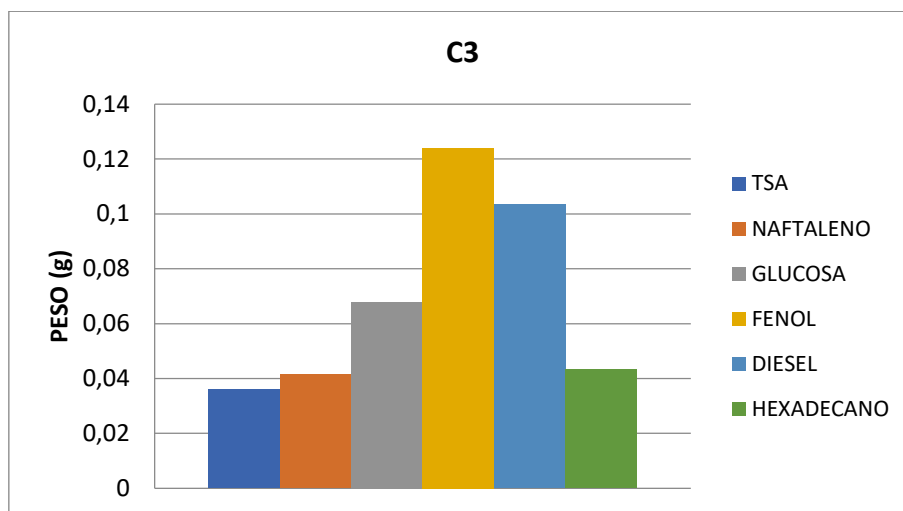


Figura 14. Crecimiento (peso seco) de *Streptomyces spp.* en los diferentes medios a los 12 días de incubación.

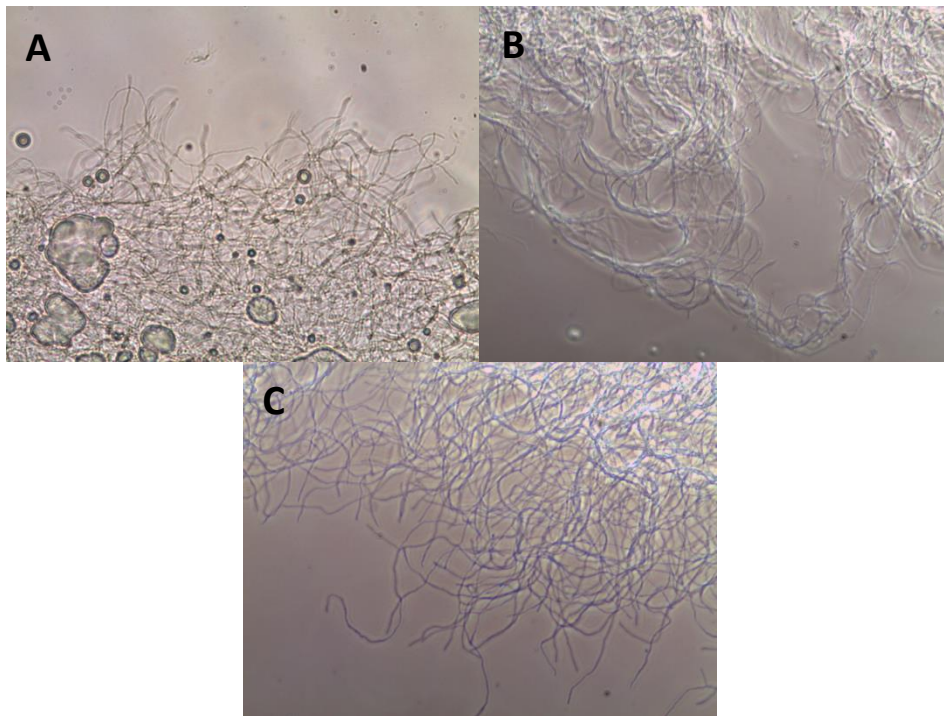


Figura 15. Observación de la bacteria C3 (*Streptomyces spp.*) en el microscopio de contraste de fases (100x). A) Medio BH con Diesel, B) Medio BH con Fenol, C) Medio BH con Naftaleno.

3.2. Nano-remediación

3.2.1. Caracterización química

En la Tabla 7 se muestran los descensos en tanto por ciento respecto a las muestras control, de los 4 elementos contaminantes (Cu, Zn, Cd, Pb) que superaron el límite de detección de los equipos en los emplazamientos estudiados, a los 3 días de tratamiento. Los elementos Zn y Pb son los que mejores resultados (mayores descensos) mostraron. Las concentraciones de Cu y Cd en los emplazamientos son bajas (cerca al límite de detección) y por tanto una variación puede suponer un alto porcentaje sin ser realmente un cambio muy notable o que se pueda atribuir al efecto de la nanopartícula. Por otra parte, las nanopartículas de hierro cerovalente (Nanofer 25S) tienen mayor efecto en el Zn en los tres tipos de suelos, siendo Avilés B donde se observa la mayor reducción (52%). Por el contrario, en el caso del Pb las nanopartículas que mejor actúan son las de goethita, siendo también en Avilés B donde se observa una mayor disminución (96%).

Tabla 7: Representación de la disminución en tanto por ciento de los elementos Cu, Zn, Cd y Pb con los dos tipos de nanopartículas en los diferentes emplazamientos respecto al control en el Tiempo 3.

Descenso en %			Cu	Zn	Cd	Pb
T3	Avilés A	Goethita	53%	9%	29%	73%
		Nanofer 25S	-61%*	19%	8%	36%
	Avilés B	Goethita	59%	36%	12%	96%
		Nanofer 25S	11%	52%	39%	92%
	Candín	Goethita	47%	9%	12%	40%
		Nanofer 25S	-33%	23%	15%	26%

*Números negativos se deben a procesos químicos que pueden alterar la medida de los elementos respecto al control, siendo superior ese elemento en ese tratamiento respecto al medio control.

En la Tabla 8 se muestran los descensos a los 30 días. En este caso se observa que las nanopartículas de hierro cerivalente siguen teniendo un mayor efecto en cuanto a la reducción de Zn que las de goethita, como ocurre a los tres días; sin embargo, estos descensos son menores en Avilés A y B, y algo mayores en Candín (39%) respecto al tiempo anterior. En cuanto al Pb los valores obtenidos no cambian significativamente con respecto a los tres días.

Tabla 8: Representación de la disminución en tanto por ciento de los elementos Cu, Zn, Cd y Pb con los dos tipos de nanopartículas en los diferentes emplazamientos respecto al control en el Tiempo 30.

Descenso en %			Cu	Zn	Cd	Pb
T30	Avilés A	Goethita	35%	1%	5%	73%
		Nanofer 25S	-118%*	3%	-16%	29%
	Avilés B	Goethita	51%	34%	17%	94%
		Nanofer 25S	-19%	40%	32%	90%
	Candín	Goethita	48%	4%	-4%	37%
		Nanofer 25S	-20%	39%	-4%	24%

*Números negativos, ver leyenda Tabla 7.

En la Figura 16 se muestran los resultados de los tratamientos con nanopartículas de hierro cerovalente y goethita en los tres tiempos estudiados para los elementos Zn y Pb en el suelo Avilés A. Se observa como veíamos anteriormente en las Tablas que las nanopartículas de goethita actúan mucho mejor en la reducción del Pb que del Zn, y las de hierro cerovalente (Nanofer 25S) en la reducción del Zn. La mayor reducción de estos elementos se produce entre el tiempo 0 y tres días, llegando a estabilizarse o aumentar en muy pequeña cantidad a los 30 días. Este suelo es el que presenta una mayor concentración inicial de Zn y Pb respecto a Avilés B y Candín, reduciéndose de 670 ppm a 550 ppm (Zn) con Nanofer 25S, y de 36 ppm a 10 ppm (Pb) con goethita.

En la Figura 17 se muestran los resultados de los tratamientos en el suelo Avilés B. Las nanopartículas de goethita actúan mucho mejor en la reducción del Pb que del Zn, y las de hierro cerovalente en la reducción del Zn. Como en el emplazamiento anterior, la mayor reducción de estos elementos se produce a los tres días, estabilizándose o disminuyendo ligeramente en el caso de Zn con las nanopartículas de goethita, a los 30 días. Este suelo tiene una concentración intermedia de los contaminantes estudiados, reduciéndose a los tres días las concentraciones de Zn de 243 ppm a 134 ppm con Nanofer 25S, y de Pb de 1,49 ppm a 0,06 ppm con goethita.

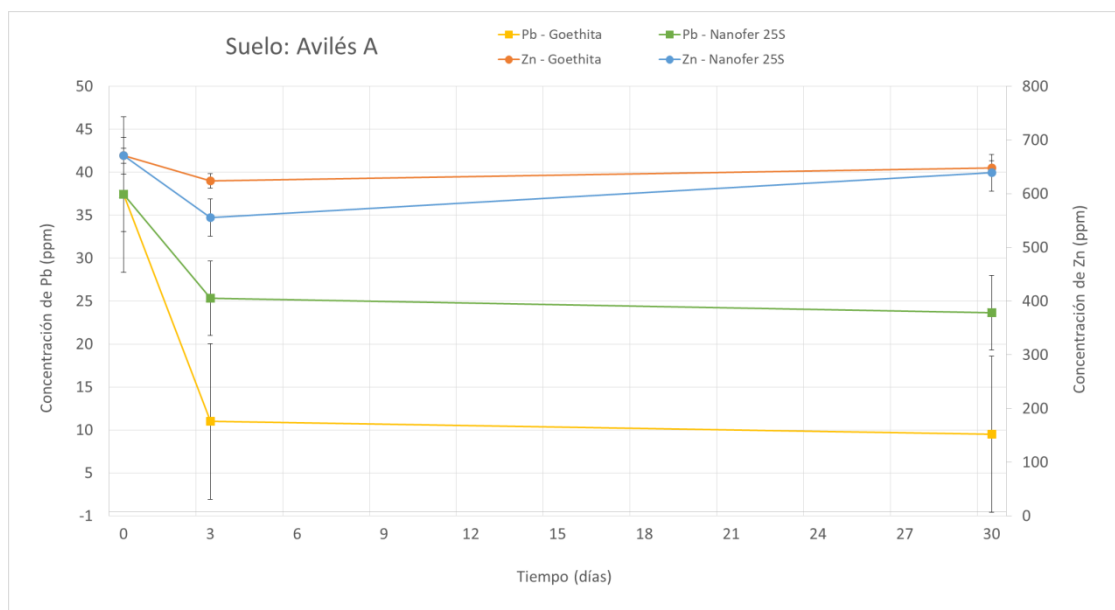


Figura 16. Disminución de los metales Zn y Pb a los tres y treinta días tras la aplicación de las nanopartículas de hierro cerovalente y goethita al suelo de Avilés A.

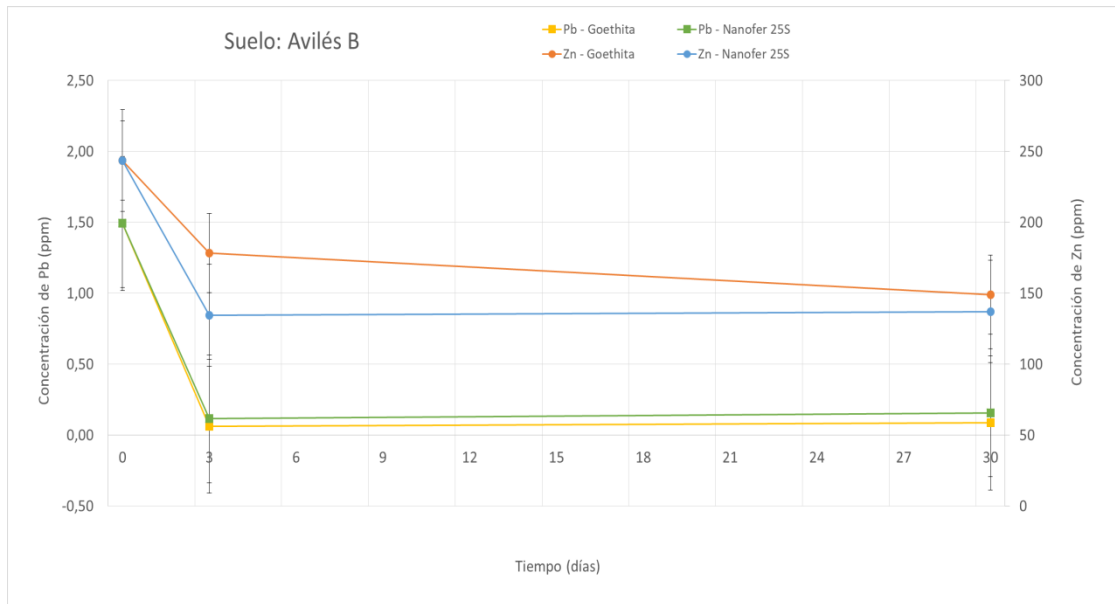


Figura 17. Disminución de los metales Zn y Pb a los tres y treinta días tras la aplicación de las nanopartículas de hierro cerovalente y goethita al suelo de Avilés B.

La Figura 18 muestra los resultados de los tratamientos en el suelo Candín. Los resultados son similares a los de los suelos anteriores, aunque la mayor reducción de Zn y Pb se produce a los 30 días. Las concentraciones de los contaminantes son bajas; no obstante, se aprecia una reducción del Zn de 12 ppm a 6 ppm con Nanofe 25S, y del Pb, de 1.5 ppm de a 0.84 ppm con goethita.

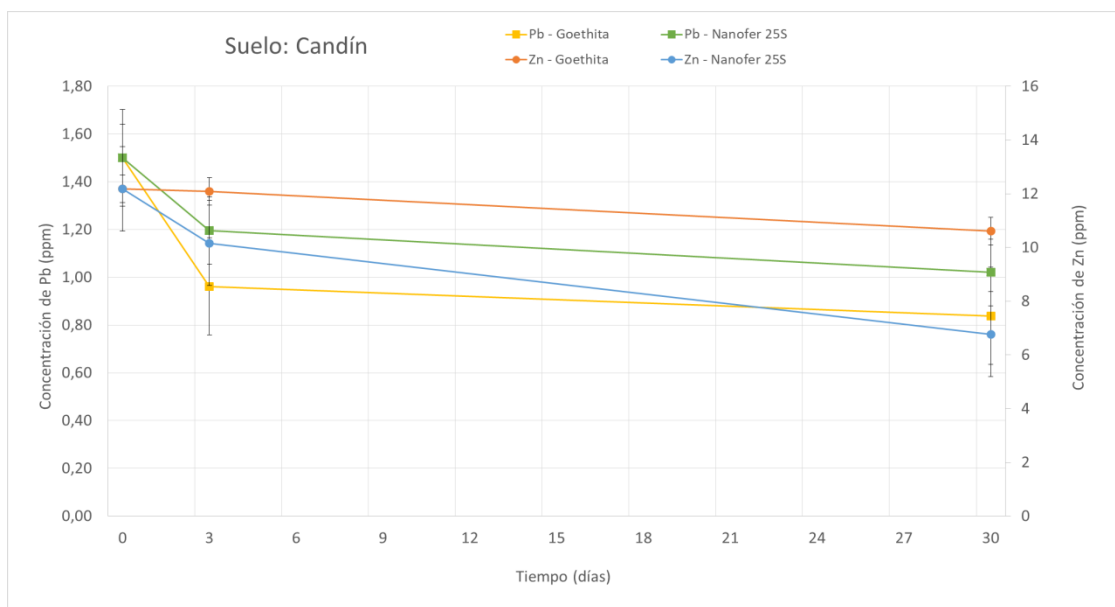


Figura 18. Disminución de los metales Zn y Pb a los tres y treinta días tras la aplicación de las nanopartículas de hierro cerovalente y goethita al suelo de Candin.

3.2.2. Caracterización microbiológica

3.2.2.1. Recuentos en placa

Tabla 9: Disminución o aumento en % de los recuentos respecto al medio control en los tiempos 3 y 30 para los medios donde se aplicó Goethita y nZVI.

%	AVILÉS A		AVILÉS B		CANDÍN	
	Tiempo 3	Tiempo 30	Tiempo 3	Tiempo 30	Tiempo 3	Tiempo 30
GOETHITA	-95	49	-92	431	-98	-88
nZVI	-31	318	-75	39	-96	49

*Números negativos indican disminución (%) y positivos aumento (%) respecto al medio control.

En las Figuras 19 y 20 se representan los recuentos a diferentes tiempos y tratamientos en el suelo Avilés A, así como el aspecto de las colonias en las placas. El número de bacterias se incrementa respecto al control, a los 30 días en un 49% y 318% (Tabla 9), pudiendo ser el aumento debido a la existencia de posibles niveles basales de nutrientes en los suelos, junto con la adición de agua y aumento de la temperatura ambiental (24°C). Sin embargo, en las muestras tratadas con goethita a los 3 días hay una disminución significativa del 95% (Tabla 9 y Figura 19) que revierte a los 30 días. Además, la morfología de las colonias varía en los distintos tratamientos respecto al control (Figura 20), lo que sugiere que las nanopartículas afectan a la diversidad bacteriana, aunque esta suposición requiere estudios con técnicas “Omicas” más detalladas.

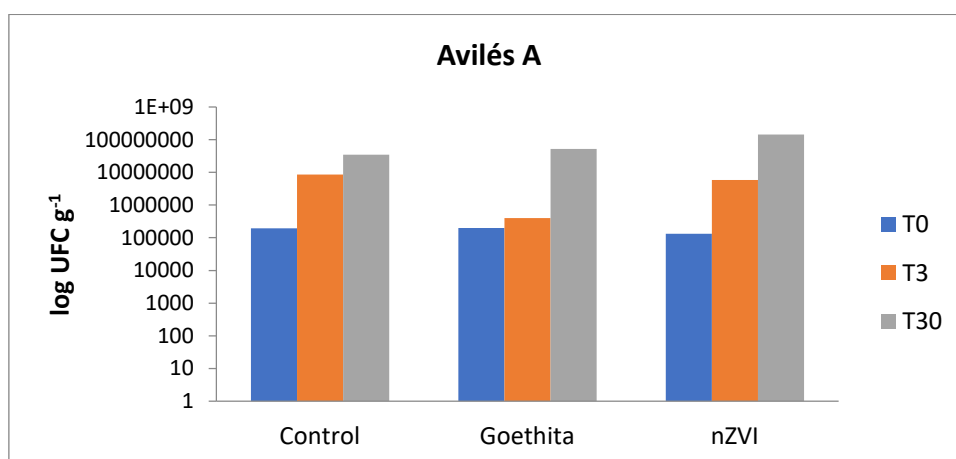


Figura 19. Representación de los recuentos bacterianos en base logarítmica realizados a los tiempos 0, 3 y 30 días, para cada tratamiento en el suelo Avilés A.

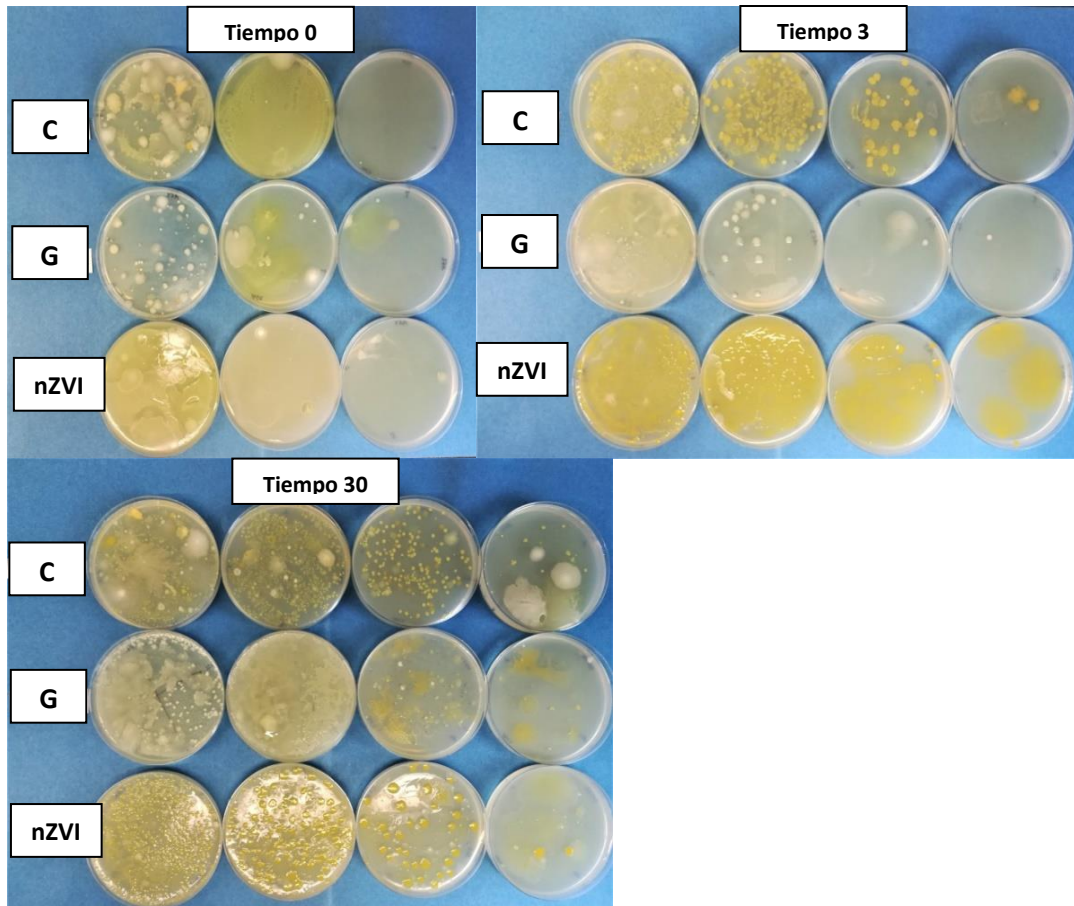


Figura 20. Aspecto de las placas de recuento bacteriano en los distintos tratamientos: control (C), nanopartículas de goethita (G) y nZVI en el suelo Avilés A en los tres tiempos analizados (0, 3 y 30 días). Diluciones crecientes de izquierda a derecha (de 10^{-1} a 10^{-4} , excepto en T0 de 10^{-1} a 10^{-3}).

En las Figuras 21 y 22 se muestran los resultados del suelo Avilés B. De nuevo se repite que la goethita motiva una disminución de las bacterias al día 3 en un 92% (Tabla 9), respecto al control. Además, existe una cierta inhibición por el hierro cerivalente a los 3 días del 75% (Tabla 9), pero ambas se restablece el numero incluso incrementándose para ambas nanoparticulas al tiempo 30 (Tabla 9). Asimismo se muestra una cierta heterogeneidad en la morfología de las colonias en las placas, más apreciable en el tratamiento con hierro cerivalente (Figura 28).

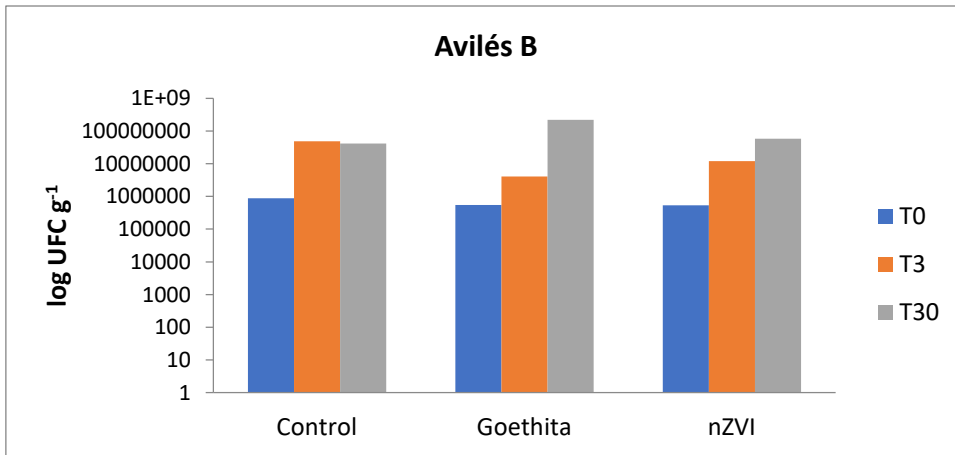


Figura 21. Representación de los recuentos bacterianos en base logarítmica de los UFC por gramo de suelo realizados a los tiempos 0, 3 y 30 días, para cada tratamiento en el suelo Avilés B.

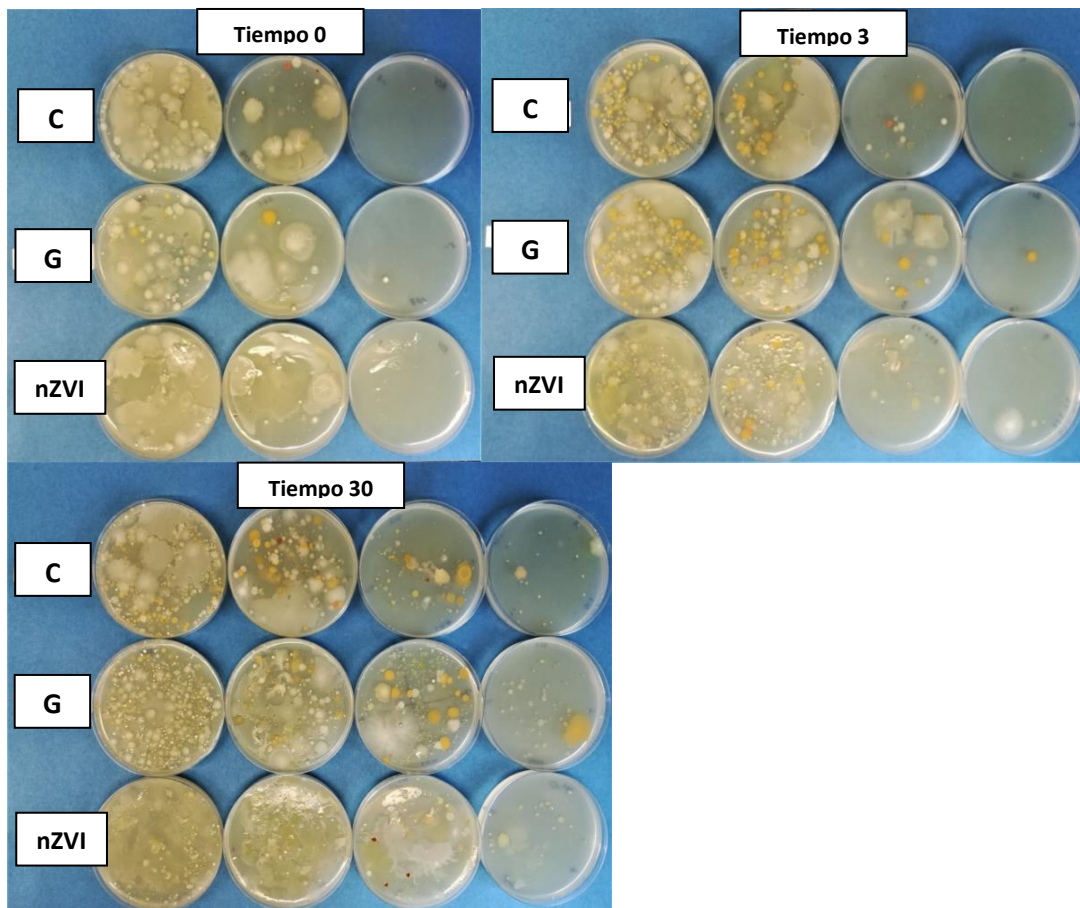


Figura 22. Aspecto de las placas de recuento bacteriano en los distintos tratamientos: control (C), con nanopartículas de goethita (G) y nZVI en el suelo Avilés B. Ver leyenda de la Figura 20.

Finalmente se muestran los resultados de los tratamientos en el suelo Candín (Figuras 23 y 24). Los efectos más aparentes son la aparente inhibición de las poblaciones bacterianas por la goethita y el hierro cerivalente a los 3 días en un 98% y 96%,

respectivamente, que se extiende a los 30 días (-88% respecto al control) en el primer caso. Por otra parte, parece existir una menor diversidad fenotípica en este suelo (Figura 24), que podría explicar el efecto de las nZVI.

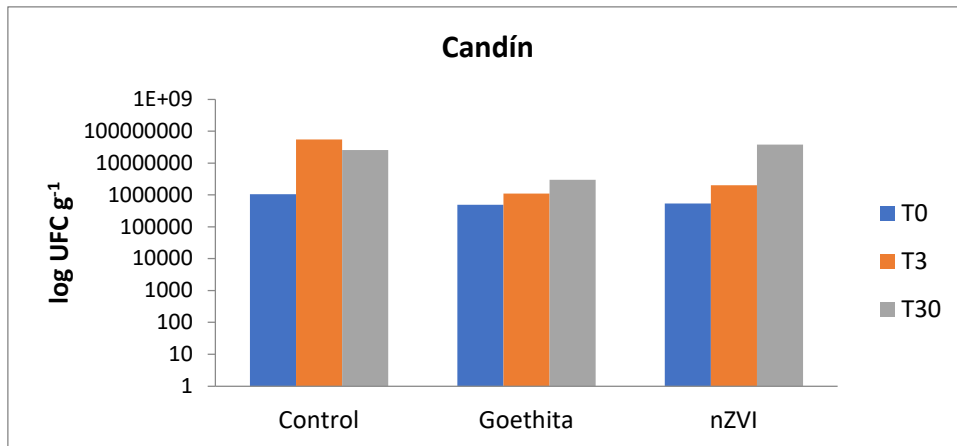


Figura 23. Representación de los recuentos bacterianos en base logarítmica de los UFC por gramo de suelo realizados a los tiempos 0, 3 y 30 días, para cada tratamiento en el suelo Candín.

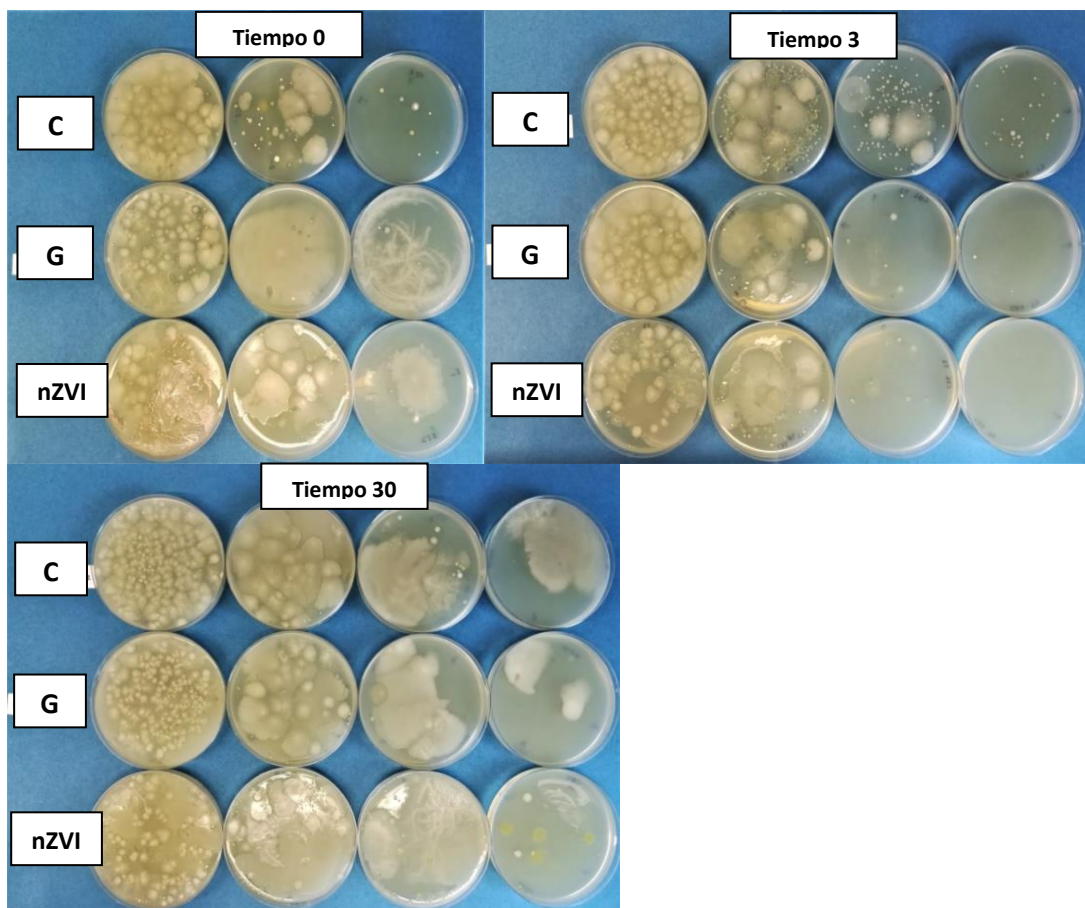


Figura 22. Aspecto de las placas de recuento bacteriano en los distintos tratamientos: control (C), con nanopartículas de goethita (G) y nZVI en el suelo Candín. Ver leyenda de la Figura 20.

3.2.2.2. DGGE.

En la Figura 25 podemos observar como varían las poblaciones bacterianas en los diferentes tratamientos aplicados al suelo en muestras recogidas a los tiempos 0, 3 y 30 días en el suelo Avilés A. Aunque no se obtuvo mucha resolución debido a la complejidad de la técnica y las bandas aparecen algo difuminadas, como se muestra en el gel existen diferencias en bandas individuales en los tres tiempos y tratamientos. Estas diferencias se aprecian con claridad en algunos tiempos, como es el caso del tratamiento con nZVI donde a los tres días aparecen tres bandas más marcadas; también se observan bandas menos marcadas en presencia de goethita a los 30 días. Incluso en el tiempo 0 se distinguen bandas que no están presentes en el control, como en el caso de nZVI (parte superior del gel), pudiendo ser debido a una rápida acción de las nanopartículas o a la heterogeneidad de las muestras.

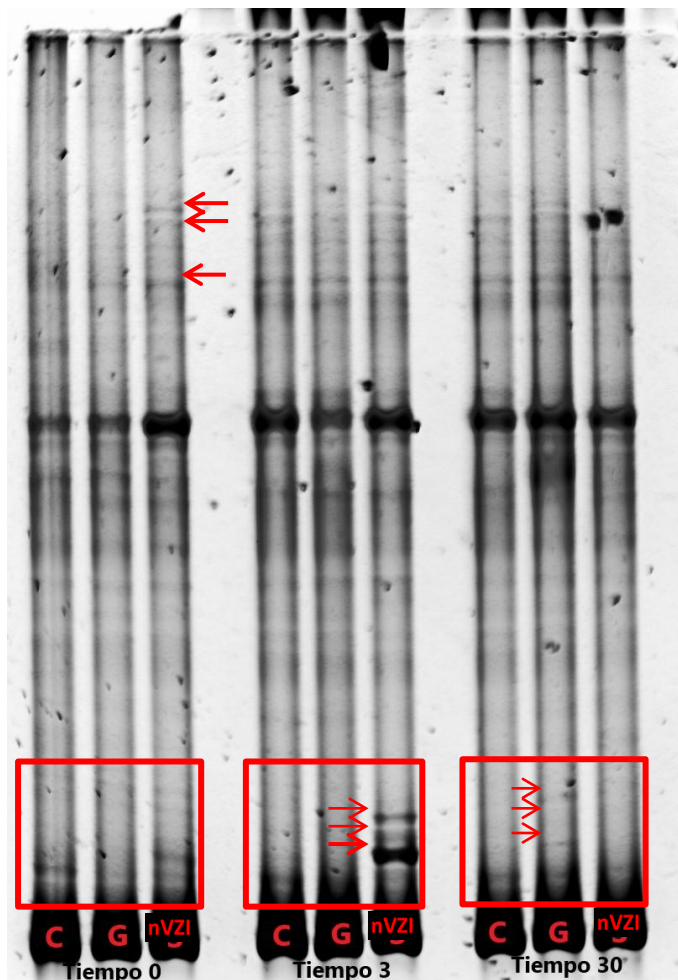


Figura 25. DGGE de los fragmentos amplificados del ADNr 16S de las muestras de suelo Avilés A tratado con nanopartículas de goethita (G) o nZVI, en los tiempos 0, 3 y 30 días. C: suelo sin tratar. Las flechas de distinto tamaño indican pequeñas o grandes diferencias.

En la Figura 26 se muestra un experimento análogo en el suelo Avilés B. Las diferencias más significativas se observan en la parte superior e inferior del gel, donde en el tiempo 0 aparecen bandas nítidas (flechas) en los tratamientos con nanopartículas de goethita (arriba) y nZVI (abajo), que reaparecen de nuevo con goethita a los 30 días, aunque menos marcadas. También se observa la aparición de alguna banda en la parte superior del gel, en presencia de nZVI, a los tres días (flecha).

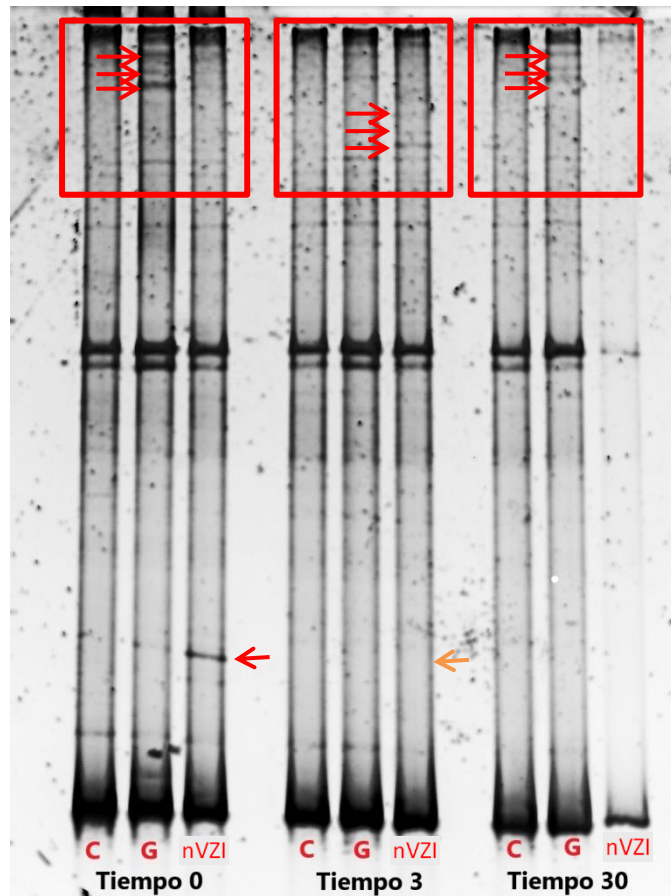


Figura 26. DGGE de los fragmentos amplificados del ADNr 16S de las muestras de suelo Avilés B tratado con nanopartículas de goethita (G) o nZVI, en los tiempos 0, 3 y 30 días. C: suelo sin tratar. Las flechas indican diferencias.

Por último, en la Figura 27 se muestran los resultados del suelo Candín. De nuevo las diferencias más significativas las encontramos en la parte inferior del gel, donde en el tiempo 0 se observan bandas marcadas en el tratamiento con nanopartículas de goethita, que vuelven a aparecer menos intensas a los 30 días. En este último tiempo también aparece una nueva banda durante el tratamiento con nZVI (flecha).

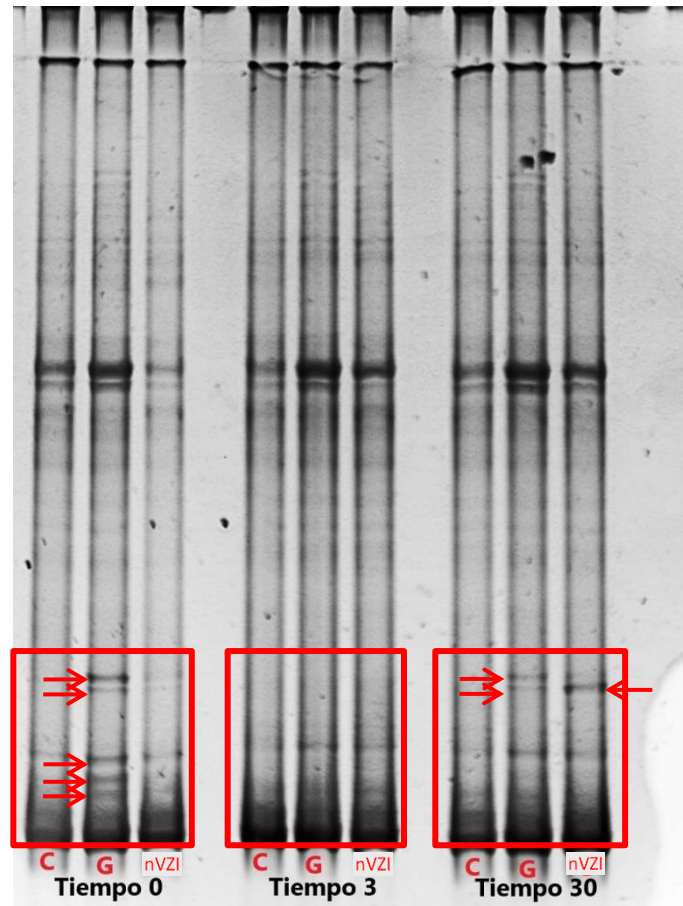


Figura 27. DGGE de los fragmentos amplificados del ADNr 16S de las muestras de suelo Candín tratado con nanopartículas de goethita (G) o nZVI, en los tiempos 0, 3 y 30 días. C: suelo sin tratar. Las flechas indican diferencias.

Es necesario resaltar que las bandas que se observan en los geles no necesariamente corresponden a las de las bacterias aisladas en las placas, ya que el DGGE detecta las bacterias predominantes en el medio ambiente, independientemente de que crezcan o no en los medios de cultivo. En cualquier caso esas bacterias podrían identificarse mediante la secuenciación de las bandas de los geles. De ahí su utilidad para complementar los estudios de diversidad realizados a partir de las bacterias cultivables

4. DISCUSIÓN

La contaminación por metales pesados es una de las principales amenazas para los servicios ecosistémicos basados en el suelo, incluida la producción de alimentos y piensos (Tóth et al., 2016). Los emplazamientos seleccionados en Asturias para llevar a cabo este estudio presentan altas concentraciones de metales pesados, derivados de la industrialización y la minería en esas áreas, en las que destaca la contaminación por Pb y Zn. La contaminación y biodisponibilidad en el suelo es alta en el emplazamiento

Avilés A, media en Avilés B y baja en Candín según los análisis realizados. Estas características influyen en la diversidad microbiana encontrada, aunque los recuentos iniciales muestren una cantidad de colonias bacterianas similar en los tres tipos de suelo. La diversidad microbiana encontrada en Avilés A, reflejada en las bacterias cultivables tras su identificación, fue la más baja (6 colonias diferentes), lo que puede relacionarse con el hecho de que sea el emplazamiento con mayor contaminación, que actúa como vector de selección (Singh et al., 2014). Los metales pesados afectan a las comunidades microbianas directa e indirectamente.

El problema central planteado por el vínculo entre la diversidad microbiana y la función del suelo es comprender las relaciones entre la diversidad genética y la estructura de la comunidad, y entre la estructura y la función de la comunidad. Una mejor comprensión de estos factores requiere no solo el uso de ensayos precisos para caracterizar taxonómicamente y funcionalmente el ADN y el ARN extraídos del suelo, sino también técnicas de alta resolución para detectar células microbianas inactivas y activas en la matriz del suelo (Nannipieri et al., 2017). Por otra parte, la relación entre la diversidad microbiana y la función ecológica implica compensaciones entre los diversos procesos ecológicos (unos aspectos funcionales se ven perjudicados y otros potenciados), y por lo tanto no se puede generalizar como una relación positiva, neutral o negativa (Jung et al., 2016). Las comunidades microbianas muestran funciones críticas involucradas en el ciclo global de nutrientes y debido a que algunas especies bacterianas son funcionalmente redundantes, y un cambio en la composición taxonómica no se traduce necesariamente en pérdidas funcionales (Lefevre et al., 2016).

La diversidad y la estructura de las poblaciones se ve afectada por los contaminantes, no solo como consecuencia de los efectos tóxicos directos, sino porque disminuye la eficiencia de la conversión de materia orgánica en nueva biomasa microbiana, y los microorganismos compiten por sustratos que pueden usar para la respiración y/o como fuente de carbono (Moffett et al., 2003; Bayen, 2012). La toxicidad relativa de los diferentes metales sigue la pauta $Cd > Cu > Zn > Pb$ (Baath, 1989). En Avilés B (11 colonias diferentes) la diversidad microbiana es mayor que en Candín (9 colonias), a pesar de que la concentración de Zn es 20 veces superior. La presencia de Zn en los

suelos reduce la diversidad bacteriana (Moffett et al., 2003), pero la presencia de otros metales en Candín en concentraciones superiores a las de los otros suelos (Tabla 4), concebiblemente afecta a los microorganismos. En Avilés A, las altas concentraciones de Zn y Pb, y en menor medida de Cu, Hg y Cd, motivan la menor diversidad observada. En cualquier caso hay que precisar que únicamente nos estamos refiriendo a las bacterias cultivables, no las totales, aunque es de esperar resultados similares para el conjunto de las poblaciones.

Según algunos autores (Delgado-Baquerizo et al., 2018), a pesar de los diferentes tipos de suelos que hay en el mundo, solo unos pocos taxones filogenéticos (el 2% de los ~500 filotipos bacterianos existentes), representan casi la mitad de las comunidades bacterianas en todo el mundo, destacando entre los más comunes, de mayor a menor predominancia, las Proteobacterias, Actinobacterias, Acidobacterias, Planctomycetes, Chloroflexi, Verrucomicrobiota, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Firmicutes y Armatimonadetes. En nuestro trabajo, en Avilés A el filo con mayor predominancia es Proteobacteria (50%), seguido de Firmicutes (33%) y por último Actinobacteria (17%). En el emplazamiento de Avilés B domina el filo Firmicutes (67%), seguido de Actinobacteria (22%) y por último Bacteroidetes (11%). Y en el emplazamiento de Candín los filos predominantes son Bacteroidetes (33%) y Firmicutes (33%), seguidos de Actinobacteria (17%) y Proteobacteria (17%).

En relación a la resistencia a metales de las bacterias presentes en los suelos estudiados, hay que destacar que en todos ellos se observó una alta resistencia al As(V), creciendo la mayoría de cepas bacterianas en un medio con 400 μ M de As(V) (Tabla 6). El Hg y As(III) son más tóxicos y muy pocas bacterias fueron capaces a crecer en estos medios (aunque algunas lo hacen en concentraciones significativas de Hg, Tabla 6. En presencia de As(III) el crecimiento es muy pobre, y asociado posiblemente a la transformación del As(III) a As(V). Las bacterias de estos emplazamientos se adaptan con rapidez a la presencia de metales pesados mediante el desarrollo de mecanismos de tolerancia que pueden incluir proteínas de unión a los metales, polímeros extracelulares, compartimentación celular, formación de sulfuros metálicos insolubles, disminución de la captación, mayor exportación o expulsión de estos metales, o volatilización en el caso del Hg (Giller et al., 1998; Das et al., 2016).

Por otra parte, la presencia de bacterias degradadoras de diferentes hidrocarburos contaminantes en los ambientes estudiados aportaría un enfoque biotecnológico adicional interesante. Sin embargo, los experimentos de cultivo con diésel, hexadecano, naftaleno y fenol, no fueron concluyentes, excepto para *Chryseobacterium indoltheticum* en un medio con diesel como fuente de carbono, *Streptomyces* spp. en diesel y naftaleno, y otra especie de *Streptomyces* que crece en agregados en fenol o diésel como fuentes de carbono.

En cuanto a los trabajos de nano-remediación, las nanopartículas de goethita tuvieron un mejor efecto sobre la fijación del Pb que las nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI). Las nZVI originaron descensos de hasta el 96% de Pb en el suelo Avilés B en tan solo 3 días, manteniéndose ese valor hasta los 30 días. En Avilés A, donde la concentración de plomo era muy superior a los otros emplazamientos se obtuvo un descenso del 73% y en Candín donde la concentración de este elemento era menor se obtuvo un descenso del 40%. En conclusión, las nanopartículas de hierro son efectivas para la nano-remediación de altas concentraciones de Pb, al igual que se ha demostrado con otros contaminantes como el As o el Hg (Gil-Díaz et al., 2017).

Con el elemento Zn los descensos fueron inferiores a los del Pb y las nZVI actuaron mejor que las de goethita. Avilés B fue de nuevo el emplazamiento donde se observó un mayor descenso a los 3 días, reduciéndose el Zn en un 52%; a los 30 días ese valor fue del 40%, lo que sugiere que en ese tiempo disminuye la capacidad de retención del contaminante. En los otros dos emplazamientos las reducciones fueron mucho menores, de un 19% y un 23%, en Avilés A y Candín, respectivamente. De nuevo se observa que el efecto disminuye a los 30 días en Avilés A (3%); en Candín, por el contrario, se potencia en ese tiempo (39%), debido quizá al efecto sinérgico de la gran cantidad de materia orgánica que contiene este suelo.

Como se ha ido mencionando a lo largo de esta memoria, la aplicación de técnicas mixtas de nano/biorremediación busca la optimización y sostenibilidad de los tratamientos, y uno de los requisitos más importantes es que los productos químicos no afecten a las poblaciones microbianas presentes en el suelo, al menos desde el punto de vista de las funciones metabólicas necesarias para la descontaminación. Ya

hemos mencionado en la Introducción el posible efecto bactericida de algunos tipos de nanopartículas, incluidas las nZVI, y la influencia en la toxicidad, de factores relacionados con las características del suelo (geoquímica local, componentes orgánicos, grado de aerobiosis, presencia de múltiples contaminantes, entre otros; Cecchin et al., 2017). En este contexto, las condiciones de aplicación de nanopartículas presentan particularidades únicas, porque su uso se destina predominantemente a entornos altamente dañados, por lo que el riesgo asociado con sus posibles efectos nocivos sobre la biota es limitado (Semerád y Cajthaml, 2016).

No hay muchos datos publicados que describan el efecto de las nZVI sobre las poblaciones microbianas en situaciones reales de campo. En uno de ellos Němeček et al. (2014) llevaron a cabo trabajos de remediación *in situ* a escala piloto en la zona saturada de un sitio históricamente contaminado con Cr(VI) utilizando nZVI. La inyección de nZVI dio como resultado una disminución rápida en las concentraciones de Cr(VI) y Cr total en las aguas subterráneas y no se detectaron cambios en la toxicidad del agua subterránea después de la aplicación de nZVI, ni en las densidades de las bacterias psicrófilas cultivables y las concentraciones de fosfolípidos de ácidos grasos (PLFA); además, los análisis PLFA de muestras de suelo mostraron que la aplicación de nZVI estimuló significativamente el crecimiento de bacterias Gram-positivas. En un escenario de remediación de bifenilos policlorados en dos etapas, que comprende la dechloración de nZVI seguida de biodegradación aeróbica, la adición de nZVI recubiertas con ácido poliacrílico causó una perturbación de la composición de la comunidad bacteriana del suelo y redujo la actividad de los microorganismos mineralizadores de cloroaromáticos (Tilston et al., 2013). Otros estudios han mostrado que el efecto de nZVI en las poblaciones bacterianas del suelo depende de la naturaleza del mismo, especialmente de su contenido en materia orgánica, naturaleza arcillosa o mayor o menor contenido en arena, que acentúa los cambios de las poblaciones microbianas en presencia de nZVI (Fajardo et al., 2012; Pawlett et al., 2013; Saccà et al., 2014; Fajardo et al., 2015).

En los suelos estudiados en este trabajo las disminuciones de los metales pesados en presencia de nZVI y goethita se correlacionaron con aumentos en los recuentos bacterianos, aunque la goethita inhibió el crecimiento en los primeros tres días del

experimento, recuperándose las poblaciones a los 30 días. En el suelo de Candín esta recuperación fue mínima; un posible motivo es el bajo pH de la solución de goethita (2.5-3.5), que puede afectar al crecimiento microbiano. En relación con estos resultados, independientemente de los efectos tóxicos de las nZVI mostrados por otros autores sobre bacterias gram negativas, ya hemos mencionado la potenciación de algunas poblaciones bacterianas (metanogénicas, homoacetogénicas o sulfatorreductoras) por la aplicación de nZVI en condiciones medioambientales específicas (Cagigal et al. 2018; Lei et al., 2018). Otros efectos positivos de nZVI se refieren también al aumento de la acumulación de lípidos en algas verdes y cianobacterias (Pádrová et al., 2016), el aumento de las bacterias y actividad microbiana durante la fermentación (Luo et al., 2014), o el aumento de la producción de biogás y la inmovilización de metales pesados durante la digestión mesófila anaeróbica de lodos (Suanon et al., 2016).

Por último, la diversidad microbiana en las distintas muestras y condiciones experimentales ensayadas se estudió mediante la técnica DGGE, que complementa los datos con las bacterias cultivables y mostró cambios específicos en las bandas de ADNr 16S amplificadas y separadas en los geles desnaturalizantes. En el suelo de Avilés A aparecen tres bandas más marcadas a los 3 días y se observan bandas menos marcadas en presencia de goethita a los 30 días. Aunque estos resultados podrían correlacionarse con las diferencias morfológicas de las colonias observadas en las placas a los tres días (Figura 20), como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, las bandas observadas en DGGE no se corresponden necesariamente con las bacterias cultivables. En el suelo de Avilés B se observan diferencias en presencia de nanopartículas de goethita y nZVI en el tiempo 0, ya que aparecen unas bandas más nítidas que se van difuminando a lo largo del tratamiento y que no aparecen en el medio control. Las diferencias más significativas se observan en la parte superior e inferior del gel, donde en el tiempo 0 aparecen bandas nítidas (flechas) en los tratamientos con nanopartículas de goethita (arriba) y nZVI (abajo), que reaparecen de nuevo con goethita a los 30 días, aunque menos marcadas. También aparece alguna nueva banda en presencia de nZVI a los tres días. En el suelo de Candín los cambios en el DGGE se refieren a bandas que están presentes en el tratamiento con goethita y no

aparecen en el control, en los tiempos 0 y 30 días, y a bandas en presencia de nZVI, a los 30 días.

5. CONCLUSIONES

- Las nanopartículas de hierro son efectivas para la nano-remediación de altas concentraciones de Pb y Zn en los suelos analizados, aunque actúan más eficientemente con el Pb, especialmente la goethita. En el caso del Zn, las nanopartículas de hierro cerovalente fueron más eficientes que la goethita, y ambas fueron también eficaces en la eliminación del Cu y en menor medida del Cd.
- Aunque se observa una cierta inhibición del número de células bacterianas a los tres días en presencia de goethita y nZVI, respecto a los controles sin NPs, el número se recupera a los 30 días, especialmente con nZVI y ese aumento se corresponde con la disminución de los metales pesados. Sin embargo, la diversidad bacteriana observada en las colonias desarrolladas en las placas de cultivo parece modificarse en presencia de las NPs, lo que se corroboró mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, DGGE. No obstante, estos estudios necesitarán definirse mejor con técnicas de secuenciación masiva más resolutivas.
- De los tres suelos estudiados se aislaron bacterias altamente resistentes a As(V), y muy pocas a Hg y As(III). Dos de ellas, *Chryseobacterium indoltheticum*, resistente a As(V) y Hg, y *Streptomyces* spp, resistente a As(V), utilizan el diesel y naftaleno, respectivamente, como fuentes de carbono, por lo que presentan interés como agentes biológicos potencialmente útiles para la nanobiorremediación de suelos contaminados simultáneamente con esos metales e hidrocarburos, y para desarrollar estrategias de remediación “a la carta” más eficientes, sostenibles y adaptadas a las características biogeoquímicas particulares de los distintos emplazamientos.
- Los experimentos desarrollados en el presente trabajo se llevaron a cabo sin adición de nutrientes externos (condiciones similares a una atenuación natural), aunque los resultados obtenidos permitirán ampliarse en el futuro a otras técnicas mixtas de “Nanobiorremediación”, incluyendo bioestimulación y bioaumentación.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Achal, V., Pan, X., Zhang, D. y Fu, Q. L. (2012). Bioremediation of Pb-contaminated soil based on microbially induced calcite precipitation. *J Microbiol Biotechnol*, 22, 244-277.
2. Bayen, S. (2012). Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. *Environment International*, 48, 84-101.
3. Braunschweig, J., Bosch, J. y Meckenstock, R. (2013). Iron oxide nanoparticles in geomicrobiology: from biogeochemistry to bioremediation. *New Biotechnology*, 30, 793-802.
4. Bruce, KD., Hiorns, WD., Hobman, JL., Osborn, AM., Strike, P. y Ritchie, DA. (1992). Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol*, 58, 3413-3416
5. Byers, HK., Stackebrandt, E., Hayward, C. y Blackall LL. (1998). Molecular investigation of a microbial mat associated with the Great Artesian Basin. *FEMS Microbiol Ecol* 25, 391-403.
6. Cagigal, E., Ocejo, M., Gallego, JL., Peláez, A.I. y Rodríguez-Valdés, E. (2018). Environmental effects of the application of iron nanoparticles for site remediation *In* Iron Nanomaterials for Water and Soil Treatment. Marta I. Litter, Natalia Quici, Martin Meichtry Ed. Pan Stanford, UK.
7. Cecchin, I., Reddy, K., Thomé, A., Tessaro, E. y Schnaid, F. (2017). Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 419-428.
8. Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente del Principado de Asturias (2014). Niveles Genéricos de Referencia para metales pesados en Suelos del Principado de Asturias. Principado de Asturias, p.2.
9. Das, S., Dash, H.R. y Chakraborty, J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 2967-2984.
10. Diario Oficial de la Unión Europea C168/29. (2007). Dictamen del Comité Económico y Social Europeo sobre la «Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco para la protección del suelo y se modifica la Directiva 2004/35/CE. file:///C:/Users/Usuario/Desktop/TFM/EU.pdf
11. Diels, L., Smet, M., Hooyberghs, L. y Corbisier, P. (1999). Heavy Metals Bioremediation of Soil. *Molecular Biotechnology*, 13, 171-171.
12. Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A., Brewer, T., Benavent-González, A., Eldridge, D., Bardgett, R., Maestre, F., Singh, B. and Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359, 320-325.
13. Fajardo, C., Gil-Díaz, M., Costa, G., Alonso, J., Guerrero, A.M., Nande, M., Lobo, M.C. y Martín, M. (2015). Residual impact of aged nZVI on heavy metal-polluted soils. *Sci. Total Environ.* 535, 79-84.
14. Fajardo, C., Ortíz, L.T., Rodríguez-Membibre, M.L., Nande, M., Lobo, M.C. y Martín, M. (2012). Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: a molecular approach. *Chemosphere* 86, 802-808

15. Fu, F. y Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of environmental management*, 92, 407-418.
16. Galdames, A., Mendoza, A., Orueta, M., de Soto García, I., Sánchez, M., Virto, I. y Vilas, J. (2017). Development of new remediation technologies for contaminated soils based on the application of zero-valent iron nanoparticles and bioremediation with compost. *Resource-Efficient Technologies*, 3, 166-176.
17. Gallego, J.L., García Martínez, M., Llamas, J., Belloch, C., Peláez, A. y Sánchez, J. (2006). Biodegradation of Oil Tank Bottom Sludge using Microbial Consortia. *Biodegradation*, 18, 269-281.
18. Gallego, J.L., González-Rojas, E., Peláez, A., Sánchez, J., García-Martínez, M., Ortiz, J., Torres, T. y Llamas, J. (2006). Natural attenuation and bioremediation of Prestige fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Organic Geochemistry*, 37, 1869-1884.
19. Gallego, J.L., Rodríguez-Valdés, E., Esquinas, N., Fernández-Braña, A. and Afif, E. (2016). Insights into a 20-ha multi-contaminated brownfield megasite: An environmental forensics approach. *Science of The Total Environment*, 563-564, 683-692.
20. Gil-Díaz, M., Alonso, J., Rodríguez-Valdés, E., Gallego, J.L. y Lobo, M. (2017). Comparing different commercial zero valent iron nanoparticles to immobilize As and Hg in brownfield soil. *Science of The Total Environment*, 584-585, 1324-1332.
21. Gil-Díaz, M.; Díez-Pascual, S.; González, A.; Alonso, J.; Rodríguez-Valdés, E.; Gallego, J. y Lobo, M. (2016). A nanoremediation strategy for the recovery of an As-polluted soil. *Chemosphere*, 149, 137-145.
22. Giller, K., Witter, E. and Mcgrath, S. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1389-1414
23. González Andrés, V., Díez Ortiz, M., Delpivo, C., Janer, G., Fritzsche, A. y Vázquez Campos, S. (2017). Acute ecotoxicity of coated colloidal goethite nanoparticles on *Daphnia magna*: Evaluating the influence of exposure approaches. *Science of The Total Environment*, 609, 172-179.
24. Goyer, R. (1990). Lead Toxicity: From Overt to Subclinical to Subtle Health Effects. *Environmental Health Perspectives*, 86, 177.
25. Green SF, A Guide To Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, <http://www.falw.vu/~microb/Protocols/DGGE/DGGEhelpV1.pdf>
26. Jung, J., Philippot, L. y Park, W. (2016). Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports*, 6: 23012.
27. Kiran, G.S., Selvin, J., Manilal, A. y Sujith, S. (2011). Biosurfactants as green stabilizer for the biological synthesis of nanoparticles. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 354–364
28. Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V. D. y Dhewa, T. (2011). *Int. J. Environ. Sci.* 1079-1093
29. Kumari, B. y Singh, D. (2016). A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Ecological Engineering*, 97, 98-105.
30. Lefevre, E., Bossa, N., Wiesner, M. and Gunsch, C. (2016). A review of the environmental implications of in situ remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): behavior, transport and impacts on microbial communities. *Science of The Total Environment*, 565, 889-901.

31. Lei, C., Sun, Y., Tsang, D. y Lin, D. (2018). Environmental transformations and ecological effects of iron-based nanoparticles. *Environmental Pollution*, 232, 10-30.
32. Luo, J., Feng, L., Chen, Y., Li, X., Chen, H., Xiao, N. y Wang D (2014) Stimulating short-chain fatty acids production from waste activated sludge by nano zero-valent iron. *J Biotechnol* 187, 98–105.
33. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K.S., Buckley, D.H. y Stahl, D. A. y Clark, D. P. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*, Fourteenth Edition. Pearson Education, Inc. USA.
34. MAPA. Métodos Oficiales de Análisis, 1994. vol. III. Secretaría General Técnica Ministerio de Agricultura. Pesca y Alimentación, Madrid
35. Martínez, J., Saavedra, Á., García-Nieto, P., Piñeiro, J., Iglesias, C., Taboada, J., Sancho, J. y Pastor, J. (2014). Air quality parameters outliers detection using functional data analysis in the Langreo urban area (Northern Spain). *Applied Mathematics and Computation*, 241, 1-10.
36. Méndez-García, C., Mesa, V., Sprenger, R.R., Richter, M., Diez, M.S., Solano, J., Bargiela, R., Golyshina, O.V., Manteca, A., Ramos, J.L., Gallego, J.L., Llorente, I., Martins dos Santos, V-AP., Jensen, O.N., Peláez, A.I., Sánchez, J. y Ferrer, M. (2014). Microbial stratification in low pH oxic and suboxic macroscopic growths along an acid mine drainage. *The ISME Journal*, 8, 1259–1274.
37. Menendez-Vega, D., Gallego, J.L., Pelaez, A., Fernandez de Cordoba, G., Moreno, J., Muñoz, D. y Sanchez, J. (2007). Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*, 43, 310-321.
38. Menéndez, A.V., Osuna, L.R., Mesa, V., Gallego, J.L., Sastre, H. y Peláez, A.I. (2016). Aerobic degradation of lindane in the presence of bacteria and zero valent iron nanoparticles. *In* *Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*. A. Méndez-Vilas, Ed. Brown Walker Press, USA, pp. 7-12.
39. Micháľková, Z., Komárek, M., Šillerová, H., Della Puppa, L., Joussein, E., Bordas, F., Vaněk, A., Vaněk, O. y Ettler, V. (2014). Evaluating the potential of three Fe- and Mn-(nano)oxides for the stabilization of Cd, Cu and Pb in contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, 146, 226-234.
40. Missoun, F., Slimani, M. y Aoues, A. (2010). Toxic effect of lead on kidney function in rat Wistar. *African Journal of Biochemistry Research*, 4, 021-027
41. Moffett, B.F., Nicholson, F.A., Uwakwe, N.C., Chambers, B.J., Harris, J.A. y Hill, T.C.J. (2003). Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 13-19.
42. Mroziak, A. y Piotrowska-Seget, Z. (2010). 165, . *Microbiol. Res.* 363-375
43. Muyzer, G., Waal, E.C. y Uitterlinden, A.G. (1993) 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
44. Myers, R.M., Maniatis, T. y Lerman, L.S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Method. Enzymol*, 155, 501-527.

45. Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G. y Renella, G. (2017). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 68, 12-26.
46. Němeček, J., Lhotský, O. y Cajthaml, T. (2014) Nanoscale zero-valent iron application for in situ reduction of hexavalent chromium and its effects on indigenous microorganism populations. *Sci Total Environ* 485, 739–747.
47. Pádrová, K., Čejková A, Cajthaml T, Kolouchová I, Vítová M, Sigler K, Řezanka T (2016) Enhancing the lipid productivity of yeasts with trace concentrations of iron nanoparticles. *Folia Microbiol* 61, 329–335.
48. Pandey, S., Kumari, M., Singh, S., Bhattacharya, A., Mishra, S., Chauhan, P. y Mishra, A. (2015). Bioremediation via Nanoparticles: An innovative microbial approach. *Handbook of Research on Uncovering New Methods for Ecosystem Management through Bioremediation*, 491-515. <https://www.igi-global.com/chapter/bioremediation-via-nanoparticles/135107>
49. Park, Y., Ko, J., Yun, S., Lee, E., Kim, S., Kang, S., Lee, B. y Kim, S. (2008). Enhancement of bioremediation by *Ralstonia* sp. HM-1 in sediment polluted by Cd and Zn. *Bioresource Technology*, 99, 7458-7463.
50. Pawlett, M., Ritz, K., Dorey, R.A., Rocks, S., Ramsden, J. y Harris, J.A. (2013). The impact of zero-valent iron nanoparticles upon soil microbial communities is context dependent. *Environ. Sci. Pollut. Res Int.* 20, 1041-9.
51. Peña-Fernández, A., González-Muñoz, M. y Lobo-Bedmar, M. (2014). Establishing the importance of human health risk assessment for metals and metalloids in urban environments. *Environment International*, 72, 176-185.
52. Qu, C., Ma, Z., Yang, J., Liu, Y., Bi, J. y Huang, L. (2012). Human Exposure Pathways of Heavy Metals in a Lead-Zinc Mining Area, Jiangsu Province, China. *PLoS ONE*, 7(11), p.e46793.
53. USEPA, 1992: US Environmental Protection Agency, 1992. Method 1311: Toxicity Characteristic Leaching Procedure. <http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/1311.pdf>
54. Rizwan, M., Singh, M., Mitra, C. y Morve, R. (2014). Ecofriendly Application of Nanomaterials: Nanobioremediation. *Journal of Nanoparticles*, 2014, 1-7.
55. Saccà, M.L., Fajardo, C., Martínez-Gomariz, M., Costa, G., Nande, M., Martín, M., (2014). Molecular stress responses to nano-sized zero-valent iron (nZVI) particles in the soil bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *PLoS One* 9, e89677
56. Sánchez, J., Peláez, A. I. y Rodríguez Gallego, J.L. (2014). *Bioteología y medio ambiente*. 2nd ed. Madrid: Editorial Ephemera, pp. 71-87.
57. Satpathy, D., Reddy, M. y Dhal, S. (2014). Risk Assessment of Heavy Metals Contamination in Paddy Soil, Plants, and Grains (*Oryza sativa*L.) at the East Coast of India. *BioMed Research International*, 2014, 1-11.
58. Semerád, J. y Cajthaml, T. (2016). Ecotoxicity and environmental safety related to nano-scale zerovalent iron remediation applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 9809-9819.
59. Sierra, C., Boado, C., Saavedra, A., Ordóñez, C. y Gallego, J. (2014). Origin, patterns and anthropogenic accumulation of potentially toxic elements (PTEs) in surface sediments of the Avilés estuary (Asturias, northern Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 86(1-2), 530-538.

60. Singh, A., Kuhad, R. C. y Ward, O.P. (2009) *Advances in Applied Biorremediation*. Springer-Verlag Berlin
61. Singh, B.K., Quince, C., Macdonald, C.A., Khachane, A., Thomas, N., Abu Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., He, Z., White, D., Sinclair, A., Crooks, B., Zhou, J. y Campbell, C.D. (2014). Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. *Environ Microbiol*, 16, 2408-2420.
62. Suanon, F., Sun, Q., Mama, D., Li, J., Dimon, B. y Yu, CP. (2016) Effect of nanoscale zero-valent iron and magnetite (Fe₃O₄) on the fate of metals during anaerobic digestion of sludge. *Water Res* 88, 897–903.
63. Tilston, E.L., Collins, C.D., Mitchell, G.R., Princivalle, J. y Shaw, L.J. (2013). Nanoscale zerovalent iron alters soil bacterial community structure and inhibits chloroaromatic biodegradation potential in aroclor 1242-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 173, 38–46.
64. Tóth, G., Hermann, T., Szatmári, G. y Pásztor, L. (2016). Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. *Science of The Total Environment*, 565, 1054-1062.
65. Vidali, M. (2001) *Bioremediation. An overview*. 2001. *Pure Appl. Chem.* pp. 1163-1172
66. Walsh, C., Sandstead, H., Prasad, A., Newberne, P. y Fraker, P. (1994). Zinc: Health Effects and Research Priorities for the 1990s. *Environ Health Perspect.* 102(Suppl 2), 5–46.
67. Wasserman, G. A., Staghezza-Jaramillo, B., Shrout, P., Popovac, D. y Graziano, J. (1998). The effect of lead exposure on behavior problems in preschool children. *American Journal of Public Health*, 88, 481-486.
68. Zhang, X., Zhong, T., Liu, L. y Ouyang, X. (2015). Impact of Soil Heavy Metal Pollution on Food Safety in China. *PLOS ONE*, 10(8), p.e0135182.