



# FACTORES DE MOVILIZACIÓN Y DISMINUCIÓN DEL RIESGO EN LA BIODISPONIBILIDAD Y DEGRADACIÓN BACTERIANA DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN SISTEMAS POROSOS

Memoria que presenta

**José Carlos Castilla Alcántara**

Para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla

Programa de Doctorado en Biología Integrada

Biología Molecular y Celular, Microbiología: Fisiología, Biotecnología y Biodiversidad

Sevilla, Febrero de 2023

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



# FACTORES DE MOVILIZACIÓN y DISMINUCIÓN DEL RIESGO EN LA BIODISPONIBILIDAD Y DEGRADACIÓN BACTERIANA DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN SISTEMAS POROSOS

EL DIRECTOR



Dr. D. José Julio Ortega Calvo

Investigador Científico del CSIC

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS)

LA TUTORA



Dra. Dña. María del Rosario Espuny Gómez

Catedrática de la Universidad de Sevilla

Departamento de Microbiología

EL AUTOR



D. José Carlos Castilla Alcántara

Investigador en Formación

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular



Dr. D. José Enrique Fernández Luque DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: que la presente Memoria de Investigación titulada: **“Factores de movilización y disminución del riesgo en la biodisponibilidad y degradación bacteriana de contaminantes orgánicos en sistemas porosos”**, presentada por D. José Carlos Castilla Alcántara para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos, bajo la dirección del Dr. José Julio Ortega Calvo, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a 16 de Febrero de 2023

FERNANDEZ  
LUQUE JOSE  
ENRIQUE - DNI  
28544298X

Firmado digitalmente  
por FERNANDEZ  
LUQUE JOSE ENRIQUE  
- DNI 28544298X  
Fecha: 2023.02.16  
13:06:33 +01'00'

Fdo: José Enrique Fernández Luque

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular



El presente trabajo se ha realizado en el marco de los proyectos CGL-2016-77497-R y CGL2016-77497-R de la Agencia Estatal de Investigación bajo la ayuda (BES-2017-079905) de la AEI para contratos predoctorales para la formación de doctores.

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos y cada uno de los que han formado parte de este camino y que han hecho posible que esta Tesis doctoral sea una realidad:

En primer lugar, agradecer al Dr. José Julio Ortega-Calvo, director de esta Tesis Doctoral, el haber depositado en mí la confianza para abordar este trabajo de investigación y su disposición para ayudarme y guiarme durante estos años. Gracias por aportarme un crecimiento no solo profesional, sino también personal.

A la profesora Dra. María del Rosario Espuny Gómez por aceptar la tutoría de este trabajo y su siempre disposición para cuando lo necesité.

Al Dr. Lukas Wick por acogerme en su grupo de investigación en la UFZ (Leipzig) como uno más del equipo, por su ayuda y sus consejos durante mi estancia.

A la Dra. Carmen Fernández López, Dr. Manuel Cantos Barragán y Dr. José Luis García Fernández por su colaboración en la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis compañeras de laboratorio. A Alicia la tomareña con más nervios y positividad del IRNAS. Aunque todo vaya mal, ella siempre tiene una sonrisa que ofrecerte. Gracias por darnos ese toque de locura cuando más lo necesitábamos. Tu tesis será todo un éxito, estoy seguro. A María la gallega-andaluza más “riquiña” de todas. Eres luz, gracias por tus consejos siempre tanto en lo profesional como en lo personal. Es un lujo haberte tenido en esta etapa final. A Rosa, que ha aguantado todos mis altibajos durante estos años, mis interminables preguntas y cálculos y por siempre estar ahí cuando lo he necesitado. Tenemos tantas anécdotas que no podría enumerarlas, pero sin duda, nuestro viaje a Helsinki fue la mejor de todas. No solo me llevo compañeras, sino también amigas. Este trabajo también es vuestro.

A mis “Sissypopers”, por su apoyo incondicional y por ser mi familia sevillana en las buenas y en las malas. Nunca entendieron porque tenía que ir en fin de semana a “alimentar” a mis bacterias, pero me querían igual. Nuestras fiestas temáticas en el piso franco o los interminables días en la Alameda; tantos momentos juntos y todo lo que nos queda aún por compartir. Celia (Grisela para los amigos), Iván, mi Carlitos que, aunque en la distancia, siempre está, Julia, Pine, Adri y a todos los demás, gracias de verdad.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular



No puedo olvidarme de Rafi, mi apoyo diario durante gran parte de estos años, no sé qué hubiera hecho sin nuestros ratitos (pandemia incluida), nuestras conversaciones eternas, nuestras risas, las recetas fit y los consejitos de moda. A Tati mi marchenera, que bonito que la vida te esté sonriendo, te lo mereces todo. A Valme, la reina sanluqueña del reggaetón. Te adoro.

A mi mejor amiga Maru, mi apoyo en todo, mi pilar, mi hermana postiza. Nos conocemos hace tanto que no puedo ni contarlo. Nos aguantamos mutuamente y nos retroalimentamos con nuestros fracasos diarios, pero también con nuestros logros. En eso se basa la verdadera amistad. No me faltes. Mi mejor amigo Juanjo, la carrera nos unió y aquí seguimos tropecientos años después. Mi compañero de locuras y aventuras, no se escapará un evento sin nuestra presencia. Sin tu apoyo nada hubiera sido igual. A todos y cada uno de los que habéis y formáis parte de esto Manuel, Ángel, Paula, Cris, Nuria, gracias.

Quiero mencionar de forma especial a toda mi familia, lo son todo para mí, en especial a mis padres y a mi hermana. Os tengo tanto que agradecer que no sabría cómo comenzar. Lo habéis dado y seguís dando todo por nosotros. Gracias por inculcarme los valores del esfuerzo y la constancia y, sobre todo, los valores humanos que nos habéis transmitido a mi hermana y a mí. La persona que soy hoy día es gracias a vosotros. Mi hermana, mi "W", es lo más importante de mi vida. Siempre nos vamos a tener el uno al otro.

Gracias a todos una vez más

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular



	Pág
ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XV
RESUMEN	XVIII
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. CONTAMINANTES ORGÁNICOS: HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. PROBLEMÁTICA Y TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS	2
1.2. INTERACCIONES CONTAMINANTE-SUELO	6
1.3. PAPEL DE LA MOVILIZACIÓN DE LOS CONTAMINANTES EN LA BIODEGRADACIÓN EN MEDIOS POROSOS: ELECTROKINÉTICA	9
1.4. MOVILIZACIÓN BACTERIANA: RESPUESTA TÁCTICA	13
1.4.1. TRANSPORTE BACTERIANO EN SISTEMAS POROSOS	13
1.4.1.1. Mecanismos de movilización bacteriana	13
1.4.1.2. Factores físico-químicos que afectan a la movilización bacteriana en sistemas porosos	15
1.4.2. TAXIS BACTERIANA Y SU FUNCIÓN EN LA MOVILIDAD	19
1.5. PROCESOS MICROBIANOS RELACIONADOS CON LA BIODISPONIBILIDAD DE HAPs	23
1.6. BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	26



1.7. CONTROL DEL RIESGO POTENCIAL CAUSADO POR LOS FACTORES DE MOVILIZACIÓN DURANTE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN. EMPLEO DEL SISTEMA PLANTA-BACTERIA-BIOCARBÓN 29

**CAPÍTULO 2. OBJETIVOS 33**

**CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS 36**

3.1. REACTIVOS 37

3.2. MATERIALES POROSOS Y SOPORTES 38

3.3. ESTIRPES BACTERIANAS, MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE PREPARACIÓN DE INÓCULOS 41

3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens* LP6a 41

3.3.2. CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas putida* G7 43

3.4. DOPAJE PASIVO CON <sup>14</sup>C-NAFTALENO Y <sup>14</sup>C-PIRENO 45

3.5. ESTUDIO DE LA ADHESIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO INDUCIDO POR ELECTROKINÉTICA. TRANSPORTE BACTERIANO Y BIODEGRADACIÓN. EMPLEO DE LA ESTIRPE *Pseudomonas fluorescens* LP6a 46

3.5.1. TEST DE MOVILIDAD “SWIMMING” Y “SWARMING” 46

3.5.2. EXPERIMENTO DE BIODEGRADACIÓN EN ESTANCO 47

3.5.3. ENSAYOS DE DEPOSICIÓN BACTERIANA EN COLUMNAS ELECTROQUÍMICAS 48

3.5.4. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN 50





3.6. INFLUENCIA DEL TRANSPORTE MEDIANTE TAXIS BACTERIANA EN LA BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO Y PIRENO. EMPLEO DE LA ESTIRPE <i>P. putida</i> G7	52
3.6.1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA TÁCTICA Y CRECIMIENTO MICROBIANO	52
3.6.1.1. Ensayos capilares	52
3.6.1.2. Controles de crecimiento bacteriano con quimioefectores	55
3.6.2. EXPERIMENTO DE ADHESIÓN A PIRENO Y BIOCARBÓN	55
3.6.3. ENSAYOS DE TRANSPORTE BACTERIANO	56
3.6.3.1. Experimentos en biorreactores de membrana	56
3.6.3.1a. <i>Microscopía electrónica de barrido y microscopía láser confocal</i>	59
3.6.3.2. Ensayos de transporte en columnas de percolación	59
3.6.4. EXPERIMENTOS DE BIODEGRADACIÓN	61
3.6.4.1. Ensayos en ausencia de restricción física	61
3.6.4.2. Biorreactores	63
3.6.4.2a. <i>Ensayos de radiorespirometría</i>	63
3.6.4.2b. <i>Ensayos de cometabolismo</i>	64
3.6.4.3. Columnas	64
3.6.4.3a. <i>Análisis de la movilidad bacteriana con pireno</i>	64
3.6.4.3b. <i>Ensayos de cometabolismo</i>	65
3.7. REDUCCIÓN DEL RIESGO ASOCIADO A LA BIORREMEDIACIÓN EN SISTEMAS POROSOS	67



3.7.1. MOVILIZACIÓN DEL PIRENO Y LA ESTIRPE <i>P. putida</i> G7 EN ENSAYOS DE LABORATORIO. UTILIZACIÓN DE FILTROS POROSOS	67
3.7.2. EXPERIMENTO INVERNADERO	68
3.7.2.1. Diseño experimental	68
3.7.2.2. Recogida de muestras	71
3.7.2.3. Extracción y análisis de <sup>14</sup> C-pireno	72
3.7.2.4. Determinaciones microbianas y bioquímicas	73
3.7.2.5. Análisis de metabolitos mediante espectrometría de masas	74
3.7.3. CÁLCULO DE LOS FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN, TRANSLOCACIÓN Y RIESGO	75
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS</b>	78
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTIRPES EMPLEADAS. CRECIMIENTO DE <i>P. fluorescens</i> LP6a y <i>P. putida</i> G7	79
4.2. MOVILIZACIÓN DE CONTAMINANTES MEDIANTE ELECTROCINÉTICA. BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO POR <i>P. fluorescens</i> LP6a	81
4.2.1. TEST DE MOVILIDAD	81
4.2.2. BIODEGRADACIÓN	82
4.2.3. DEPOSICIÓN BACTERIANA A TRAVÉS DE COLUMNAS ELECTROQUÍMICAS	84
4.2.4. ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN EN COLUMNAS	86
4.2.4.1. Efecto de la concentración de naftaleno	86
4.2.4.2. Efecto de la inhibición bacteriana en la biodegradación	88



4.3. TAXIS Y MOVILIZACIÓN BACTERIANA. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TÁCTICA Y CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE QUIMIOEFECTORES	90
4.3.1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN ENSAYOS CAPILARES	90
4.3.1.1. Respuesta táctica positiva frente a componentes de exudados de raíces de girasol	90
4.3.1.2. Efecto de la hipermovilidad por glucosa	90
4.3.1.3. Respuesta de repelencia a nanopartículas de Fe (nZVIs)	92
4.3.1.4. Exudados de raíces artificiales (AREs) en la respuesta táctica	93
4.3.2. CONTROLES DE CRECIMIENTO CON DISTINTOS QUIMIOEFECTORES	94
4.4. RESPUESTA TÁCTICA Y SU IMPLICACIÓN EN EL TRANSPORTE Y BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE HAPs EN MICROPOROSIDADES. BIORREACTORES DE MEMBRANA	96
4.4.1. TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA	96
4.4.1.1. Salicilato como quimioefector modelo. Influencia del tamaño de poro en la dispersión bacteriana	96
4.4.1.1a. Paso de las células a través de la membrana por microscopía electrónica y láser confocal	101
4.4.1.2. Efecto de GABA y citrato en el transporte bacteriano a través de la membrana	104
4.4.1.3. Hipermovilidad y glucosa en el transporte a través de la membrana	110
4.4.1.4. Efecto de la repelencia a nanopartículas de Fe (nZVIs)	110
4.4.1.5. Otros quimioefectores: exudados artificiales de raíces (AREs) en el transporte en biorreactores	114



4.4.2. BIODEGRADACIÓN EN BIORREACTORES	117
4.4.2.1. Ensayos preeliminares	117
4.4.2.1a. Mineralización de naftaleno	117
4.4.2.1b. Cometabolismo de pireno	119
4.4.2.2. Efecto de la respuesta táctica a través de microporosidades en la mineralización de naftaleno	121
4.4.2.3. Efecto de la respuesta táctica a través de microporosidades en el cometabolismo de pireno	126
4.5. INFLUENCIA DE LA TAXIS BACTERIANA EN EL TRANSPORTE Y BIODEGRADACIÓN DE PIRENO EN COLUMNAS	128
4.5.1. TRANSPORTE DE LA BACTERIA <i>P. PUTIDA</i> G7 A TRAVÉS DE LA COLUMNA	128
4.5.1.1. Adhesión a arena en transporte en columnas	128
4.5.1.2. Efecto de GABA	129
4.5.1.3. Efecto de exudados artificiales en el transporte en sistemas de columnas	129
4.5.2. ESTUDIO DEL COMETABOLISMO DE PIRENO EN COLUMNAS DE ARENA	131
4.5.2.1. Experimentos en estanco	131
4.5.2.2. Evaluación del proceso cometabólico durante el transporte	135
4.5.2.3. Evaluación del patrón de movilidad bacteriana durante el transporte en columnas	137
4.6. ANÁLISIS Y DISMINUCIÓN DEL RIESGO EN LA TRANSFORMACIÓN DE PIRENO EN SISTEMAS POROSOS	141
4.6.1. CARACTERIZACIÓN DEL COMETABOLISMO DE PIRENO EN EMBUDOS POROSOS Y EFECTO DE LA TRAMPA DE BIOCARBÓN	141



4.6.1.1. Adhesión a arena y biocarbón	144
4.6.2. MOVILIZACIÓN DEL PIRENO EN PERCOLADOS Y PLANTAS	144
4.6.3. RESPUESTA DE LA PLANTA	149
4.6.4. ESTUDIO DE LAS DETERMINACIONES MICROBIANAS Y BIOQUÍMICAS	151
4.6.5. METABOLITOS PRODUCIDOS POR COMETABOLISMO	154
4.6.6. FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN, TRANSLOCACIÓN Y RIESGO	157
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN</b>	160
5.1. PAPEL DE LA ELECTROKINÉTICA EN LA BIODEGRADACIÓN	161
5.2. MOVILIDAD Y TAXIS BACTERIANA EN <i>P. putida</i> G7	163
5.2.1. ATRACCIÓN	163
5.2.2. RESPUESTA DE REPELENCIA E HIPERMOVILIDAD	165
5.3. PAPEL DE LA RESPUESTA TÁCTICA BACTERIANA EN LA ADHESIÓN	166
5.4. PAPEL DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE Y BIODEGRADACIÓN DE HAPs A TRAVÉS DE POROS MICROMÉTRICOS	167
5.4.1. EFECTO DEL TAMAÑO DE LOS POROS Y DE LOS QUIMIOEFECTORES EN EL TRANSPORTE BACTERIANO EN BIORREACTORES DE MEMBRANA	167
5.4.2. EFECTO DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs A TRAVÉS DE MICROPOROSIDADES	171
5.4.2.1. Mineralización de naftaleno en sistemas de membranas	171



5.4.2.2. Efecto del transporte en el cometabolismo de pireno en biorreactores	172
5.5. PAPEL DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE Y COMETABOLISMO DE PIRENO EN SISTEMAS POROSOS ISOCRÁTICOS	173
5.5.1. INFLUENCIA DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE	173
5.5.2. ESTUDIO DEL COMETABOLISMO DE PIRENO EN COLUMNAS DE TRANSPORTE BACTERIANO	174
5.6. REDUCCIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS A LA TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA DEL PIRENO	177
5.6.1. EMPLEO DEL SISTEMA PLANTA-BACTERIA-BIOCARBÓN EN LA REDUCCIÓN DEL RIESGO	177
5.6.2. EFECTIVIDAD DEL MÉTODO MEDIANTE ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADO A LA BIORREMEDIACIÓN	180
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES</b>	185
<b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA</b>	190
<b>CAPÍTULO 8. COMUNICACIONES CIENTÍFICAS</b>	206



## ABREVIATURAS

AH	Área de la sección transversal de las membranas
AREs	Artificial root exudates
$\beta$	Constante de la celda diafragmática
BCFs	Factores de bioconcentración
$C_{free}$	Fracción de HAPs en la fase acuosa
CC	Chemical in capillary
CI	Cámara inferior
COD	Carbono orgánico disuelto
COT	Carbono orgánico total
CP	Chemical in pond
CS	Cámara superior
D	Coeficiente de difusión
DC	Corriente continua
DH	Actividad de la deshidrogenasa
DLVO	Teoría de de Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek
DO	Densidad óptica
dpm	Desintegraciones por minuto
EK	Electrocinética
EK-BIO	Biodegradación electrocinética
EPS	Sustancias exopoliméricas
FC	Factor de corrección
FCF	Colorante fast green
FIB-SEM	Microscopía electrónica de barrido
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HQ	Factor de riesgo
HMW	High molecular weight
HPLC	High performance liquid chromatography
INT	Sal de tetrazolio cloruro de iodonitrotetrazolio
INTF	Iodonitrotetrazolio



IT	Índice táctico
K <sub>bio</sub>	Constante de degradación de primer orden
K <sub>d</sub>	Coeficiente de distribución
K <sub>m</sub>	Constante de afinidad de Michaelis-Menten
K <sub>ow</sub>	Coeficiente de reparto octanol-agua
K <sub>oc</sub>	Coeficiente de adsorción
LB	Luria-Bertani
LMW	Low molecular weight
LSCSM	Microscopía laser confocal
MM	Medio mínimo mineral
MOD	Materia orgánica disuelta
MSB	Medio basal salino
nZVIs	Nanopartículas de Fe
Pir <sub>eq</sub>	Pireno equivalente
PVP	Polivinilpirrolidona
RCDI	Tasa de cambios de dirección de la movilidad celular
rpm	Revoluciones por minuto
t <sub>d</sub>	Tiempo de duplicación
TFs	Factores de translocación
TSA	Triptona soja agar
UFC	Unidades formadoras de colonias
UHPLC	Cromatógrafo líquido de ultra-alto rendimiento
VP	Volumen de poro





## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

	Pág
<b>Figura 1.1.</b> Factores de movilización en el contexto de la biodisponibilidad y biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos	5
<b>Figura 1.2.</b> Pérdida bifásica de contaminantes orgánicos en suelos. Impacto del fenómeno de sorción en la biodisponibilidad de los contaminantes	7
<b>Figura 1.3.</b> Representación esquemática de un sistema EK-BIO para la recuperación de suelos mediante aplicación de electrocinética	13
<b>Figura 1.4.</b> Interacción energética de Gibbs y proceso de adhesión bacteriana	16
<b>Figura 1.5.</b> Comportamiento táctico y ruta de señalización celular	21
<b>Figura 1.6.</b> Mecanismos bacterianos para la mejora del flujo de carbono correspondiente a los HAPs	24

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 3.1.</b> Fotomicrografías de los filtros de membrana utilizados	39
<b>Figura 3.2.</b> Esquema de una columna electroquímica	49
<b>Figura 3.3.</b> Dispositivo empleado en el estudio de la biodegradación de naftaleno en columnas	51
<b>Figura 3.4.</b> Cámara para ensayos de taxis bacteriana	54
<b>Figura 3.5.</b> Imagen del biorreactor utilizado en los experimentos	57
<b>Figura 3.6.</b> Esquema experimental para el estudio del transporte en columnas de percolación	60



<b>Figura 3.7.</b>	Determinación del Factor de Corrección (FC) para <i>Pseudomonas putida</i> G7 en el ajuste de la fluorescencia en función de la densidad óptica.	62
<b>Figura 3.8.</b>	Esquema de ensayo de mineralización de naftaleno en biorreactores de membrana	63
<b>Figura 3.9.</b>	Esquema del diseño experimental llevado a cabo en invernadero	69

## CAPÍTULO 4

<b>Figura 4.1.</b>	Crecimiento de las estirpes empleadas	80
<b>Figura 4.2.</b>	Seguimiento de la movilidad bacteriana de <i>P. fluorescens</i> LP6a en ensayos de “swimming” y “swarming”	81
<b>Figura 4.3.</b>	Evolución de la colonización de placas con medio rico, en ensayos de movilidad de “swimming” y “swarming”	82
<b>Figura 4.4.</b>	Ensayo de biodegradación con <i>P. fluorescens</i> LP6a	83
<b>Figura 4.5.</b>	Ensayo de transporte con <i>P. fluorescens</i> LP6a en columnas electroquímicas a las diferentes concentraciones celulares en el influente: 0,1 DO <sub>600</sub> y 0,3 DO <sub>600</sub>	85
<b>Figura 4.6.</b>	Biodegradación de naftaleno por la estirpe <i>P. fluorescens</i> LP6a en columnas electroquímicas	87
<b>Figura 4.7.</b>	Aspecto al microscopio de la estirpe <i>P. fluorescens</i> LP6a en condiciones normales de experimentación y tras tratamiento térmico durante 40 min a 70 °C	88
<b>Figura 4.8.</b>	Ensayo de transporte, adhesión y biodegradación de naftaleno en columnas electroquímicas con células inactivadas térmicamente	89
<b>Figura 4.9.</b>	Ensayos capilares de <i>Pseudomonas putida</i> G7 frente a distintos quimioefectores a concentraciones de 10 mM y 0,1, 0,75 y 1 mM	91
<b>Figura 4.10.</b>	Ensayos capilares de repelencia para <i>P. putida</i> G7	92



<b>Figura 4.11.</b>	Respuesta quimiotáctica de atracción de la estirpe <i>Pseudomonas putida</i> G7 frente a diferentes concentraciones (0,1, 0,75 y 1 mM) de una mezcla artificial de exudados (AREs) compuesta por GABA, citrato y fructosa	94
<b>Figura 4.12.</b>	Influencia de salicilato en biorreactores de membrana determinados por la eficiencia de paso de <i>Pseudomonas putida</i> G7 a través de la membrana	97
<b>Figura 4.13.</b>	Ensayo de adsorción de salicilato y adhesión de la estirpe <i>P. putida</i> G7 a membrana de 5 µm de tamaño de poro empleadas en los biorreactores	99
<b>Figura 4.14.</b>	Efecto de la sonicación de células de <i>Pseudomonas putida</i> G7 en ensayos de biorreactores con membrana de 5 µm	100
<b>Figura 4.15.</b>	Imágenes tomadas por un microscopio SEM de muestras de membranas de 3 µm y 5 µm	102
<b>Figura 4.16.</b>	Imágenes microscopio confocal (LSCSM) de membranas de 3 µm y 5 µm de tamaño de poro en ensayos de biorreactores	103
<b>Figura 4.17.</b>	Influencia de los quimioefectores en <i>Pseudomonas putida</i> G7 en biorreactores según la eficiencia de paso (5 µm)	106
<b>Figura 4.18.</b>	Influencia de los quimioefectores en <i>Pseudomonas putida</i> G7 en biorreactores según la eficiencia de paso (3 µm)	107
<b>Figura 4.19.</b>	Respuesta táctica de <i>Pseudomonas putida</i> G7 a través del transporte en biorreactores de membrana con glucosa como quimioefector	111
<b>Figura 4.20.</b>	Efecto de la exposición a nanopartículas de Fe (nZVIs) en el transporte de la bacteria quimiotáctica <i>Pseudomonas putida</i> G7 en experimentos de biorreactores	112
<b>Figura 4.21.</b>	Ensayos de transporte en biorreactores con la estirpe PPG7 y exudados artificiales de raíces a distintas concentraciones: 0,1 mM y 1 mM	115



<b>Figura 4.22.</b>	Mineralización de naftaleno con la estirpe <i>Pseudomonas putida</i> G7 en ausencia de restricción física con diferentes quimioefectores (10 mM y 0,1 mM)	118
<b>Figura 4.23.</b>	Cometabolismo de pireno por la estirpe <i>P. putida</i> G7	120
<b>Figura 4.24.</b>	Control de crecimiento en biorreactores con los quimioefectores GABA y AREs a 0,1 mM	122
<b>Figura 4.25.</b>	Mineralización de naftaleno por <i>Pseudomonas putida</i> G7 en presencia de diferentes quimioefectores a una concentración 0,1 mM	123
<b>Figura 4.26.</b>	Evolución del paso de naftaleno cargado en anillas de silicona mediante el método de dopaje pasivo a fase acuosa	124
<b>Figura 4.27.</b>	Cometabolismo de pireno en biorreactores de membrana con tamaño de poro de 5 $\mu$ m	127
<b>Figura 4.28.</b>	Ensayos de transporte en columnas de percolación con la estirpe <i>P. putida</i> G7 con los quimioefectores GABA y AREs a distintas concentraciones	130
<b>Figura 4.29.</b>	Biodegradación y reparto de pireno en presencia de células de <i>Pseudomonas putida</i> G7 en matraces con anillas cargadas con pireno	132
<b>Figura 4.30.</b>	Análisis de la movilidad de <i>P. putida</i> G7 en presencia de los quimioefectores GABA y AREs a una concentración de 0,75 mM (influentes)	139
<b>Figura 4.31.</b>	Análisis de la movilidad de <i>P. putida</i> G7 en presencia de los quimioefectores GABA y AREs a una concentración de 0,75 mM (efluentes)	140
<b>Figura 4.32.</b>	Determinación de la concentración de equivalente de pireno ( $Pir_{eq}$ ) y de la movilización de <i>Pseudomonas putida</i> G7 a través de los lixiviados en los experimentos de embudos	142



<b>Figura 4.33.</b>	Evolución de la concentración de equivalentes de pireno (Pir <sub>eq</sub> ) en macetas plantadas y en macetas sin plantar	146
<b>Figura 4.34.</b>	Mineralización y reparto de <sup>14</sup> C-pireno de dos aislados del experimento invernadero	154
<b>Figura 4.35.</b>	Análisis de una muestra de lixiviado (maceta plantada sin inocular, 39 d) mediante UHPLC-MS.	156

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO 1

	Pág	
<b>Tabla 1.1.</b>	Resumen de las diferentes técnicas de recuperación de suelos contaminados con HAPs.	4

### CAPÍTULO 3

<b>Tabla 3.1.</b>	Caracterización física de las distintas membranas empleadas en los biorreactores	40
<b>Tabla 3.2.</b>	Medio mineral (MM) a pH = 6	42
<b>Tabla 3.3.</b>	Composición del medio basal salino (MSB) utilizado para el crecimiento y experimentación con <i>Pseudomonas putida</i> G7	44
<b>Tabla 3.4.</b>	Composición del medio MSB modificado	68

### CAPÍTULO 4

<b>Tabla 4.1.</b>	Experimentos de control del crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> G7 frente a diferentes quimioefectores utilizados en el estudio	95
<b>Tabla 4.2.</b>	Influencia de salicilato (10 mM) en la respuesta táctica de <i>Pseudomonas putida</i> G7 en ensayo de biorreactores	98



<b>Tabla 4.3.</b>	Influencia de citrato y GABA en la respuesta táctica de <i>Pseudomonas putida</i> G7 en los ensayos de biorreactores con 5 µm de tamaño de poro	108
<b>Tabla 4.4.</b>	Influencia de citrato y GABA en la respuesta táctica de <i>Pseudomonas putida</i> G7 en los ensayos de biorreactores con 3 µm de tamaño de poro	109
<b>Tabla 4.5.</b>	Influencia de glucosa y nanopartículas de Fe en la respuesta táctica de <i>Pseudomonas putida</i> G7 en ensayo de biorreactores	113
<b>Tabla 4.6.</b>	Influencia de exudados artificiales de raíces en la respuesta táctica de <i>Pseudomonas putida</i> G7 en ensayo de biorreactores	116
<b>Tabla 4.7.</b>	Tasas de reparto y mineralización de naftaleno en presencia o ausencia de la estirpe bacteriana <i>Pseudomonas putida</i> G7	125
<b>Tabla 4.8.</b>	Datos de concentración de pireno (Pir <sub>eq</sub> ) obtenidos mediante colector de fracciones de HPLC en ensayo de biodegradación en estanco con <i>Pseudomonas putida</i> G7	134
<b>Tabla 4.9.</b>	Valores de concentración de pireno equivalente (Pir <sub>eq</sub> ) en ensayos de columna en presencia o ausencia de bacterias	136
<b>Tabla 4.10.</b>	Análisis cuantitativo de la movilidad celular en los influentes y efluentes de las columnas con pireno en función del tiempo experimental [(Volumen de poro: VP)].	138
<b>Tabla 4.11.</b>	Concentración de Pir <sub>eq</sub> (mg kg <sup>-1</sup> ) en las diferentes partes de los experimentos del embudo	143
<b>Tabla 4.12.</b>	Determinación del carbono orgánico mediante medidas de carbono orgánico total (COT) en las muestras de lixiviados de los diferentes tratamientos empleados en el ensayo de invernadero	147
<b>Tabla 4.13.</b>	Comparación entre Pir <sub>eq</sub> y la concentración de pireno en muestras de lixiviado seleccionadas	147



<b>Tabla 4.14.</b>	Concentración de equivalentes de pireno en muestras de planta ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) en condiciones experimentales de invernadero	148
<b>Tabla 4.15.</b>	Valores de peso fresco de las plantas completas y los diferentes órganos por tratamiento. N es el número de muestras para cada tratamiento	150
<b>Tabla 4.16.</b>	Actividad de la deshidrogenasa (en $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , media $\pm$ desviación estándar) en muestras de arena del experimento de macetas a 3 profundidades diferentes (81 d)	152
<b>Tabla 4.17.</b>	Factores de bioconcentración (BCF, $\text{L kg}^{-1}$ ) y translocación (TF) en muestras de plantas (raíz, tallo, hojas y frutos)	158
<b>Tabla 4.18.</b>	Evaluación del riesgo (HQ) de los lixiviados para los distintos tratamientos empleados en el ensayo invernadero	159



## RESUMEN

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo una investigación básica sobre el proceso de biorremediación enfocado a sistemas porosos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Se han estudiado diferentes factores de movilización implicados en el proceso, así como de los riesgos asociados a dicha movilización, dentro del contexto de su aplicación como innovaciones en la biorremediación.

La hipótesis general de partida de esta tesis doctoral ha sido que la movilización de estos contaminantes hidrófobos y de las bacterias capaces de degradarlos puede tener efectos positivos sobre las tasas de biodegradación, a través de un aumento de la biodisponibilidad y de la bioaccesibilidad a los focos de contaminación. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas también puede tener consecuencias negativas, derivadas de la movilización, tanto de los contaminantes como de los microorganismos que pueden generar problemas a medio y largo plazo.

De esta forma, se ha determinado, por una parte, que la aplicación de técnicas electrocinéticas puede tener un efecto sobre la movilización de los HAPs, aumentando su disponibilidad para la biodegradación. Por otra parte, se ha investigado cómo los diferentes patrones de movilidad bacteriana, originados como respuestas tácticas, pueden modularse para tener efectos positivos sobre el transporte de los microorganismos hacia los contaminantes de difícil acceso, es decir, aquellos que se encuentran adsorbidos en los microporos del suelo. Por último, se ha realizado una prueba de concepto sobre el control del riesgo generado por estos factores de movilización mediante el empleo de plantas en asociación con las bacterias y de biocarbón.

En los estudios sobre electrocinética, se comprobó que la aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad en un sistema poroso contaminado con naftaleno permitía una mayor interacción de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* LP6a con el contaminante, provocando un aumento en las tasas de biodegradación del naftaleno. Estos experimentos se llevaron a cabo en un nuevo sistema de columnas electrocinéticas en las que el contaminante se introdujo en un reservorio al inicio del influente, controlando la exposición de bacterias depositadas en las columnas.





El estudio de la movilización celular se realizó mediante ensayos capilares para determinar la capacidad quimiotáctica de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 frente a diferentes compuestos. Mientras que salicilato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), citrato y exudados de raíces artificiales (AREs) causaron una respuesta de atracción celular, las nanopartículas de Fe (nZVIs) y glucosa indujeron una respuesta de repelencia e hipermovilidad, respectivamente. El estudio de la capacidad de movilización de la estirpe se realizó como paso previo a los experimentos para testar la capacidad de transporte bacteriano a través de microporosidades mediante el empleo de un novedoso sistema de biorreactores de membrana. La utilización de GABA y en especial de AREs, provocó una movilización bacteriana muy significativa a tamaños de poro considerados restrictivos (5  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$ ), mientras que, para el resto de sustancias empleadas, la respuesta celular fue moderada.

La hipótesis de que un aumento del transporte puede provocar un aumento de la biodegradación de los contaminantes por una mayor accesibilidad, se realizó mediante técnicas de radiorespirometría para naftaleno y de fluorimetría para pireno en biorreactores. En ambos casos, GABA y AREs provocaron aumentos en las tasas de degradación a tamaños de poro de 5  $\mu\text{m}$ . También se comprobó un aumento de la biodegradación de pireno en sistemas porosos saturados mediante el empleo de columnas de percolación.

Los posibles riesgos asociados a estos mecanismos de recuperación de suelos se analizaron en un experimento de invernadero modelo con arena contaminada con pireno, donde el empleo de girasoles en conjunto con *P. putida* G7 y una capa de biocarbón provocaron una menor detección del compuesto en los lixiviados y una mayor translocación en plantas con la consiguiente disminución del riesgo asociado a la biorremediación.



## ABSTRACT

A basic research has been carried out in this doctoral thesis on bioremediation process focused on contaminated porous systems with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Different mobilization factors involved in this process have been studied, as well as the risk associated with such mobilization, within the context of their application as innovations in bioremediation.

The general starting hypothesis of this doctoral thesis was that mobilization of these hydrophobic pollutants and the bacteria capable of degrading them can have positive effects on biodegradation rates, through an increase in bioavailability and bioaccessibility to the contamination sources. However, the application of these techniques can also have negative consequences, resulting from the mobilization of pollutants and microorganisms, which can cause problems at medium and long term.

Thus, it has been determined, on the one hand, that application of electrokinetic techniques can have an effect on PAHs mobilisation, increasing their availability for biodegradation. On the other hand, it has been investigated how different bacterial motility patterns, originated as tactical responses, can be modulated to have positive effects on the transport of microorganisms towards difficult access pollutants, i.e. those adsorbed in soil micropores. Finally, a proof of concept has been carried out on the control of the risk generated by these mobilization factors by using plants in association with bacteria and biochar.

In the electrokinetic studies, it was found that the application of a low-intensity electric current in a porous system contaminated with naphthalene allowed an increased interaction of the bacteria *Pseudomonas fluorescens* LP6a with the pollutant, resulting in an increase in the naphthalene biodegradation rates. These experiments were carried out in a new electrokinetic column system where the contaminant was introduced into a reservoir at the beginning on the influent, controlling the exposure of bacteria deposited in the columns.

Cell mobilization was studied using a capillary assay to determinate the chemotactic capacity of *Pseudomonas putida* G7 strain to the different compounds. While salicylate,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), citrate or artificial root exudates (AREs) exhibited a cellular attraction response, Fe nanoparticles (nZVIs) and glucose induced a repellent and

XX

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular



GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

hypermobility response, respectively. The mobilization capacity of the strain was performed as a preliminary phase before testing the bacterial transport capacity through microporosities using a novel bioreactor system. The use of GABA, and especially AREs, resulted in a very significant bacterial mobilisation at membrane pores sizes considered restrictive (5  $\mu\text{m}$  and 3  $\mu\text{m}$ ), while for the other substances used, the cellular response was moderate.

The hypothesis that increased transport can lead to enhanced biodegradation of pollutants due to a higher accessibility was tested using radiorespirometry methods for naphthalene and fluorimetry for pyrene in bioreactors. In both cases, GABA and AREs resulted in a higher degradation rates at 5  $\mu\text{m}$  pore size. Increased pyrene biodegradation in saturated porous system was also demonstrated using percolation columns.

The potential risks associated with these soil remediation mechanisms were analysed in a model greenhouse experiment with pyrene-contaminated sand, where the use of sunflower in combination with *P. putida* G7 and a biochar layer resulted in reduced detection of the compound in the leachate and increased translocation in plants, thereby reducing the risk associated with bioremediation.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



## 1.1. CONTAMINANTES ORGÁNICOS: HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. PROBLEMÁTICA Y TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de contaminantes orgánicos considerados, en su mayoría, de elevada toxicidad y con potencial carcinogénico y mutagénico para los seres humanos, de ahí su interés científico (Tsibart y Gennadiev, 2013). La principal fuente de contaminación ambiental por HAPs es la actividad antropogénica por la combustión incompleta de los combustibles fósiles y sus derivados en la industria y la automoción, así como en la agricultura, por la quema de residuos vegetales para su utilización como fertilizante (Mojiri y col., 2019; Patel y col., 2020). El aporte de estos compuestos al medio ambiente también pueden tener una procedencia natural, por erupciones volcánicas o incendios forestales, aunque en una menor proporción que en los casos anteriores (Manzetti, 2013; Mallah y col., 2022). Los HAPs son sustancias altamente persistentes, con estructuras diversas y se clasifican químicamente según el número de anillos bencénicos que contienen en la molécula. Si presentan 2 o 3 anillos de benceno, son considerados HAPs de bajo peso molecular (LMW, de “light molecular weight”) como el caso del naftaleno, antraceno o fenantreno, mientras que los HAPs con más de 3 anillos son de elevado peso molecular o HMW (de “high molecular weight”), entre los que se encuentran el pireno, criseno, bezo(a)pireno y coroneno, entre otros. Los HAPs son contaminantes hidrofóbicos, presentan una baja solubilidad en agua y tienen tendencia a absorberse a la materia orgánica presente en el suelo. Además, son relativamente estables y recalcitrantes en los suelos, siendo difíciles de degradar en comparación con otros contaminantes orgánicos (Sakshi y col., 2019).



Las distintas estrategias empleadas para la recuperación de suelos contaminados por HAPs (tabla 1.1) permiten la eliminación o transformación de los contaminantes orgánicos mediante diferentes métodos. Tradicionalmente las tecnologías físicas y químicas han formado parte de los procesos de remediación pero, por sí solas, están asociadas a elevados costes y contaminaciones secundarias. El empleo de organismos como las plantas o las bacterias también puede reducir la concentración de estas sustancias en el suelo, aprovechando su capacidad para transformar o mineralizar los hidrocarburos en sustancias menos nocivas. Este enfoque destaca por ser una alternativa eficiente, rentable y respetuosa con el medio ambiente, utilizándose ampliamente en los últimos años (Roy y col., 2018; Siles y García-Sánchez, 2018). Los tratamientos combinados también se han posicionado como una herramienta muy útil en la remediación de suelos contaminados. Estudios recientes han empleado la acción combinada de bacterias del género *Mycobacterium* y tensioactivos naturales como los rhamnolípidos, para aumentar la solubilidad de los PAHs en el suelo, y por tanto, la biodisponibilidad, alcanzándose altas tasas de biodegradación de los contaminantes (Posada-Baquero y col., 2019). Otros estudios sobre el empleo de la biorremediación combinada con otras técnicas como la electrocinética (Liu y col., 2020), también han resultado ser eficaces en la eliminación de estos contaminantes.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular

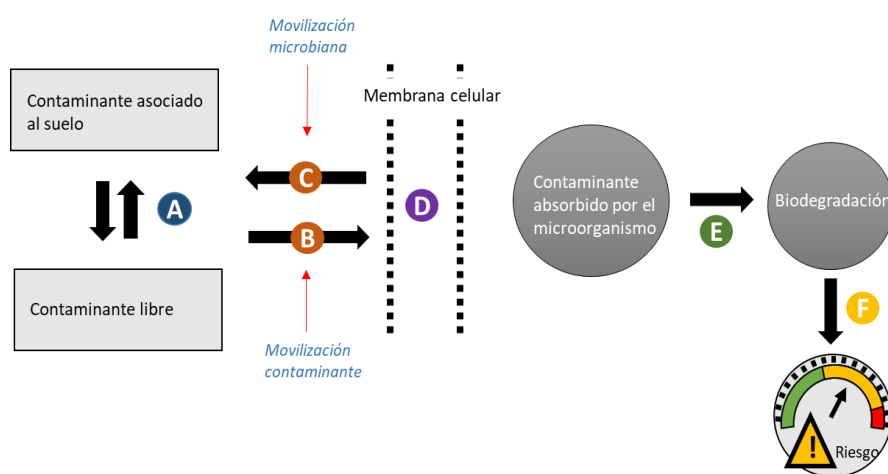


**Tabla 1.1.** Resumen de las diferentes técnicas de recuperación de suelos contaminados con HAPs.

<b>Inmovilización</b>	<u>"Capping" o sellado</u>	Colocación de una capa de sedimento o material sorbente sobre un suelo contaminado (Maletić y col., 2019)
	<u>Estabilización/solidificación</u>	Procesos por los cuales mediante diferentes reacciones químicas se modifican las propiedades del material contaminante para evitar su movilización (Barnett y col., 2009)
<b>Movilización</b>	<u>Desorción térmica</u>	Tecnología basada en la aplicación de una fuente de calor a un suelo contaminado para eliminar los compuestos orgánicos mediante volatilización (Song y col., 2019)
	<u>"Washing" o lavado</u>	Técnica de separación de los HAPs presentes en un suelo contaminado mediante el empleo de un disolvente orgánico o acuoso (Lau y col., 2014)
	<u>Empleo de tensioactivos</u>	Utilización de compuestos con capacidad para reducir la tensión superficial, aumentando su disponibilidad y movilización (Dell'Anno y col., 2018)
	<u>Electrocínética</u>	Método basado en la aplicación de una corriente eléctrica mediante electrodos que se colocan en un suelo contaminado para su recuperación (Chu y col., 2022)
<b>Degradación</b>	<u>Química</u>	Aplicación de diferentes sustancias químicas para la transformación de los HAPs presentes en el suelo en compuestos menos tóxicos (Rivas, 2006)
	<u>Biorremediación</u>	Uso de organismos vivos como plantas ( <i>fitorremediación</i> ), bacterias u hongos o la asociación de algunos de ellos ( <i>rizorremediación</i> , planta-microorganismos) entre otros, para eliminar los HAPs presentes en un suelo (Patel y col., 2020)
	<u>Compostaje</u>	Tipo especial de técnica de biorremediación basada en la aplicación de materia orgánica a un suelo contaminado para favorecer la actividad de los organismos presentes en él (Sayara y Sánchez, 2020)
<b>Tecnologías híbridas</b>	<u>Físico-químicas</u> <u>Químico-biológicas</u> <u>Físico-biológicas</u> <u>Físico-químico-biológicas</u>	Combinación de varias de las técnicas anteriormente mencionadas para la mejora de la eficiencia de los procesos recuperación de suelos contaminados con HAPs. Por ejemplo el empleo de tecnologías físico-químico- biológicas como el lavado + oxidación química + biorremediación (Kuppusamy y col., 2017)



En este contexto, la tesis doctoral se centra en el estudio de los mecanismos de movilización tanto de los contaminantes como de los microorganismos degradadores, para favorecer la biodisponibilidad y biodegradación de los contaminantes orgánicos, así como la disminución del riesgo asociado a estos procesos. Por tanto, un aumento de la movilización provocaría un aumento teórico de la biodisponibilidad y, por tanto, de la biodegradación de los contaminantes orgánicos. En la figura 1.1 se representa un esquema donde se incluyen todos estos procesos, que se van a describir a continuación como marco conceptual de esta tesis doctoral.



**Figura 1.1.** Factores de movilización en el contexto de la biodisponibilidad y biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos. Las interacciones contaminante-suelo se representan en el proceso A. Los procesos principales de transporte tanto del contaminante (B) como de movilización bacteriana (C), permiten una mayor biodisponibilidad de los xenobióticos y su absorción directa por parte de las células microbianas (proceso D), permitiendo una biodegradación de los contaminantes por mineralización o cometabolismo (E). Los posibles riesgos asociados a la degradación bacteriana aparecen representados en el proceso F. Adaptado de Ortega-Calvo y col., 2015.





## 1.2. INTERACCIONES CONTAMINANTE-SUELO

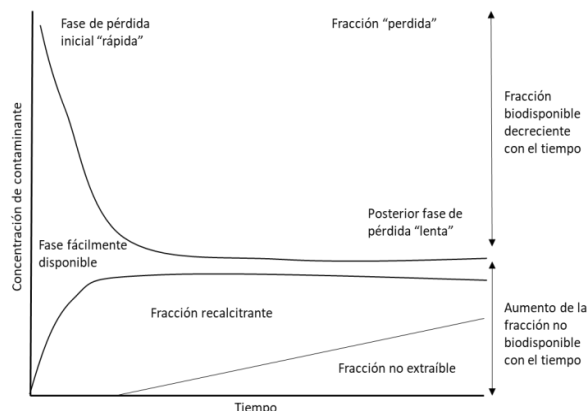
Desde el momento que los HAPs son depositados en el suelo, pueden comenzar a moverse (proceso A en la figura 1.1.) y su destino estar determinado por procesos tales como biodegradación, transformación química, fotólisis, volatilización, lixiviación y transferencia a plantas y otros organismos (Jones y de Voogt, 1999; Maliszewska-Kordybach, 2005). Mientras que la fotodegradación no va a tener una influencia muy significativa en la eliminación de los HAPs ya que se limita a la capa más superficial de los sistemas porosos (aprox. 0,1 mm), otros mecanismos como la volatilización pueden contribuir a la desaparición de los HAPs-LMW. La lixiviación tampoco parece tener una gran influencia en las interacciones de los HAPs con el medio debido a la fuerte sorción de estos compuestos al suelo (Trapido, 1999). De esta forma, los HAPs de bajo peso molecular pueden moverse a través del sistema poroso más fácilmente que los de alto peso molecular, y en general todos ellos mediante su asociación a las partículas coloidales del suelo. Algunos estudios han desvelado que más de dos tercios de los HAPs están asociados a la fracción coloidal, por lo que su destino va a depender de los procesos en los que intervienen estas partículas (Zhang y col., 2008).

Los procesos de biodegradación o transferencia van a determinar, en gran medida, la persistencia de los HAPs en los suelos, aunque van a depender de diversos factores relacionados con las propiedades de los sistemas porosos o las características físico-químicas de los contaminantes (Chung y Alexander, 2002; Maliszewska-Kordybach, 2005). Las distintas propiedades del suelo como contenido de materia orgánica, textura, tamaño de partícula, pH, temperatura, porosidad o permeabilidad entre otros, ejercen influencia sobre la movilización y biodisponibilidad de los HAPs. Probablemente, los procesos sorción y desorción son uno de los factores más limitantes en la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos (Bosma y col., 1997; Riding y col., 2013).

La fracción total de contaminantes orgánicos puede dividirse en varias fracciones según las interacciones con el suelo (figura 1.2). Las fracciones de contaminantes fuertemente adsorbidas se encuentran asociadas a partículas de tamaño nanométrico y materia orgánica como la humina, y son las menos biodisponibles



y las que presentan más problemas en cuanto a la aplicación de técnicas de biorremediación (Kästner y col., 2014). De forma similar, las fracciones correspondientes a la desorción lenta, pueden describirse como potencialmente biodisponibles (es decir, bioaccesibles), ya que los compuestos liberados pueden ser adsorbidos por la biota si se les da el tiempo suficiente (Rhodes y col., 2010).



**Figura 1.2.** Pérdida bifásica de contaminantes orgánicos en suelos. Impacto del fenómeno de sorción en la biodisponibilidad de los contaminantes. Adaptado de (Riding y col., 2013).

Los minerales presentes y el contenido de materia orgánica disuelta (MOD) también pueden interactuar con los contaminantes orgánicos y determinar su biodisponibilidad. De forma general un mayor contenido de arcillas y MOD, producirán una mayor sorción de los contaminantes, disminuyendo su biodisponibilidad y biorremediación (Pignatello y Nason, 2020). El tamaño de las partículas y la conductividad del agua de los poros son otros de los factores que afectan de forma significativa a la movilidad de los HAPs en medios porosos. Si estos contaminantes se encuentran absorbidos a las partículas, el movimiento estará limitado por su tamaño (Saedi y col., 2018). En lo que respecta al pH, los HAPs se unen de forma preferente a los sistemas porosos con una mayor acidez, dando lugar a una mayor persistencia en el medio y una menor biodisponibilidad. Por su parte, pH básicos provocan una frecuente disociación de las partículas evitando su unión con los HAPs y aumentando su biodisponibilidad (Saba y col., 2011). Una mayor temperatura parece también disminuir los valores del



coeficiente de distribución ( $K_d$ ) de los HAPs en el sustrato sólido, aumentado la biodisponibilidad de los mismos (Olu-Owolabi y col., 2015).

Por lo que respecta a las características físico-químicas de los contaminantes implicadas en los procesos de interacción con el suelo, el peso molecular, la solubilidad, el punto de fusión y ebullición y la presión de vapor son las que van a ejercer una mayor influencia en la biodisponibilidad y biodegradación de los mismos. Algunas de estas propiedades como la solubilidad hacen que los HAPs con un mayor peso molecular tiendan a estar menos presentes en el agua que los de menor peso molecular. Esto provoca una movilización más gradual en los sustratos sólidos y por tanto, una menor susceptibilidad a la degradación. De igual forma sucede con la persistencia en el medio o la hidrofobicidad, aumentando a mayor número de anillos bencénicos. De forma contraria la volatilidad de los HAPs disminuye con el aumento del peso molecular (Ghosal y col., 2016). La afinidad de los HAPs por las superficies presentes en un material poroso, suele derivarse del coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) (Seth y col., 1999). Un valor alto de  $K_{ow}$ , implica una mayor hidrofobicidad de los HAPs y por tanto, una mayor tendencia a la adsorción a una determinada superficie (Schwarzenbach y col., 2005; Jonker y van der Heijden, 2007). El coeficiente de adsorción normalizado en base al contenido de materia orgánica ( $K_{oc}$ ) también se utiliza con el mismo propósito en suelos, de tal forma que valores altos de  $K_{oc}$  de los contaminantes se traducen en una fuerte retención en el suelo y, por tanto, una menor movilización (Zhang y col., 2009).

El tiempo de residencia de los HAPs en los sistemas porosos, también llamado “envejecimiento”, puede suponer un factor importante en el proceso de difusión y transporte de estos compuestos. Este mecanismo comienza con una fase de sorción inicial rápida y reversible, seguido de un periodo de difusión lenta que puede producirse a lo largo de semanas, meses o años tras su liberación al medio ambiente (Alexander, 2000). La extractabilidad de los HAPs, por tanto, disminuye a medida que aumenta su “envejecimiento” provocando su estabilización en gran parte de los microporos del suelo, reduciendo considerablemente su movilidad y por tanto, la biodisponibilidad (Kumar y col., 2021). De esta forma, una mejor



comprensión del proceso de difusión de los contaminantes orgánicos va a permitir desarrollar estrategias eficaces para la recuperación de suelos contaminados.

### 1.3. PAPEL DE LA MOVILIZACIÓN DE LOS CONTAMINANTES EN LA BIODEGRADACIÓN EN MEDIOS POROSOS: ELECTROKINÉTICA

En este contexto, una vez que los contaminantes han sido depositados en el suelo y debido su carácter persistente, como comentamos con anterioridad, el empleo de técnicas como la electrocinética para facilitar la movilización de los HAP puede emplearse como mecanismo para el aumento de la accesibilidad de los organismos en los focos de contaminación (proceso B en figura 1.1). La electrocinética (EK) comprende un conjunto de técnicas empleadas en la recuperación de suelos, en las que se aplica una corriente continua (DC) a un sistema poroso para inducir fenómenos de transporte específicos (Gill y col., 2014). La electrocinética es una tecnología ecológica que puede aplicarse *in situ*, y es de gran eficacia en sustratos porosos de grano fino y baja conductividad hidráulica, como los suelos arcillosos donde existe una disponibilidad de HAPs muy limitada debido a su elevada superficie de sorción (Lahlou y Ortega-Calvo, 1999; Li y col., 2020). La aplicación de la EK en biorremediación puede favorecer la biodisponibilidad de los contaminantes y la bioaccesibilidad de los nutrientes en contacto con los microorganismos, aumentando por tanto la velocidad de biodegradación de los contaminantes (Richard y Krishna, 2005; Niqui-Arroyo y col., 2006). La aplicación de un campo eléctrico puede ayudar a alcanzar aquellos contaminantes que se encuentran incrustados en las capas más profundas de suelos contaminados, es decir, menos biodisponibles, donde otras tecnologías no pueden acceder. Aunque la electrorremediación puede presentar algunos problemas asociados a cambios en las propiedades de las partículas (variaciones de pH o cambios en la composición iónica), esta técnica no solo puede ayudar a transformar los contaminantes en productos menos tóxicos, sino también facilitar la movilidad de los contaminantes y hacer que se depositen en un lugar determinado (Moghadam y col., 2016). Como consecuencia, los HAPs son transportados gracias a la generación del campo eléctrico desde el ánodo al



cátodo. Normalmente, se utiliza el agua intersticial presente en el sistema poroso o un fluido introducido desde el exterior como medio conductor (Fernández-Sanromán y col., 2021).

La aplicación de una corriente eléctrica induce varios fenómenos de transporte, incluyendo la electromigración y la electroforesis. Los procesos de electromigración suponen aquellos fenómenos en los que la carga de las distintas moléculas y partículas determinan el transporte de las mismas hacia un electrodo de carga opuesta. Por su parte, la electroósmosis hace referencia a aquellos procesos de transporte de moléculas sin carga debidos al movimiento catiónico del agua por aplicación de una corriente eléctrica en un medio poroso, normalmente desde el ánodo al cátodo (Wick y col., 2004; Upadhyay y Chakma, 2022). Por tanto, los compuestos orgánicos se van a transportar a través del sistema poroso por electromigración cuando están cargados eléctricamente y por electroósmosis si no tienen carga. Con los HAPs, este transporte se produce principalmente por electroósmosis, y no suele ser efectivo a menos que los contaminantes sean solubles en el fluido de los poros mediante agentes tensioactivos o co-solventes, o se conviertan en metabolitos más solubles en agua. Sin embargo, el uso de surfactantes tiende a disminuir el flujo electroosmótico debido a su viscosidad y a la interacción con las partículas del sistema poroso por lo que se debe hacer una revisión específica del surfactante a utilizar en cada caso (Cameselle y Reddy, 2012). Los tensioactivos Tween 80 o Brij 35 son los más utilizados en electrocinética para facilitar la solubilización de HAPs como el fenantreno y el antraceno y, por tanto, aumentar su movilización (Boulakradeche y col., 2015; Saberi y col., 2018). En el caso de los co-solventes como el etanol, n-propanol o heptano entre otros, también existen problemas derivados de su utilización en electrocinética relacionados con la disminución de la solubilización de sales o la conductividad eléctrica, dando como resultado una disminución del flujo electroosmótico.



Entre los factores que pueden afectar al proceso electroosmótico podemos encontrar:

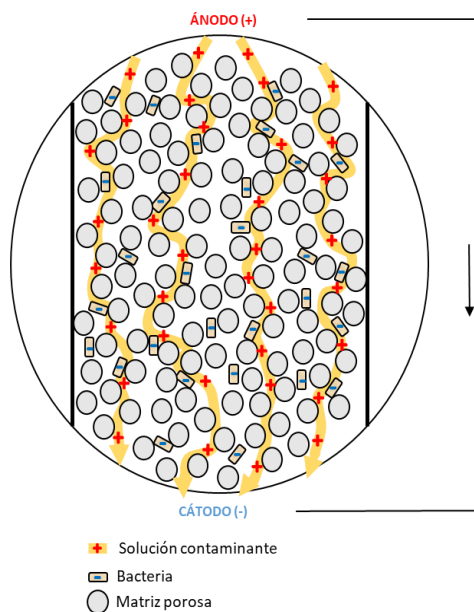
- *Heterogeneidad del tamaño de poros y grado de saturación.* Las tasas de transporte de contaminantes y la eficiencia del proceso dependen en gran medida del tipo de superficie porosa y la composición mineral. Una saturación del contenido de agua y una baja fuerza iónica son las condiciones más favorables para la electroósmosis y la migración de contaminantes (López-Vizcaíno y col., 2016; Pham y Sillanpää, 2020).
- *pH.* Algunos estudios han observado que el control del pH a 7 en la cámara del ánodo y el aumento de la carga eléctrica podrían acelerar el flujo electroosmótico, lo que llevaría a una mayor movilización hacia el extremo del cátodo y eliminación de los contaminantes de baja polaridad como los HAPs (Alcántara y col., 2010; Lima y col., 2011).
- *Nivel de voltaje y corriente.* En la mayoría de estudios en laboratorio las intensidades de las corrientes eléctricas utilizadas son del orden de 1-3 V/cm (Qin y col., 2015; Shan y col., 2020). Las corrientes eléctricas de alto voltaje pueden aumentar la concentración iónica total por generación de ácidos, disminuyendo el flujo electro-osmótico global y generando una importante fuente de calor (efecto Joule) (Tang y col., 2020). La elección de un voltaje adecuado depende de las propiedades electroquímicas, especialmente de la conductividad eléctrica. Los materiales porosos con conductividades eléctricas más altas requieren una mayor carga y viceversa.
- *Materiales y disposición de los electrodos.* Los materiales de los electrodos empleados en el proceso de remediación se seleccionan en función de su rendimiento en términos de estabilidad química, densidad de corriente y resistencia a la corrosión. En estudios sobre los efectos de la disposición de los electrodos, se observó que los electrodos en contacto directo con el suelo presentaban menos resistencia eléctrica y más poder de descontaminación que los electrodos separados del suelo por barreras físicas (Méndez y col., 2012).



Cabe destacar que los fenómenos de electroósmosis y electroforesis han resultado ser también herramientas muy poderosas para controlar movimiento de bacterias y partículas coloidales (Pennathur y Santiago, 2005). En este sentido, algunos estudios también han demostrado las enormes ventajas que supone la aplicación de corrientes eléctricas en la recuperación de los suelos contaminados debido al aumento de la biodisponibilidad de los HAPs y, por tanto, con mejoras en la biodegradación (Niqui-Arroyo y Ortega-Calvo, 2007). Los flujos electroosmóticos y electroforéticos sobre la migración y deposición bacteriana dependen fundamentalmente de la intensidad del campo eléctrico, a través del potencial zeta, y las características de las bacterias, encontrándose fuertemente restringidos por las fuerzas de adhesión de estos microorganismos y la baja conductividad hidráulica existente en los microporos del suelo (Shan y col., 2018; Yustres y col., 2018)

En resumen, el uso de campos eléctricos aplicados a sistemas porosos contaminados puede facilitar la movilización de los contaminantes más difícilmente accesibles, es decir, aquellos que se encuentran asociados a microporosidades. Si el uso de esta técnica se combina además con la aplicación de enmiendas biológicas, puede favorecer la transferencia de masa entre los contaminantes orgánicos y las bacterias degradadoras del suelo pudiendo mejorar, por tanto, la eficacia en los procesos de biodegradación. En este caso, hablaríamos de biodegradación electrocinética (EK-BIO), la cual se ha constituido en los últimos años como una de las tecnologías más prometedoras para la recuperación de suelos contaminados. La figura 1.3 muestra una representación a escala laboratorio de un sistema EK-BIO empleado en esta tesis doctoral, en el que las bacterias son inmovilizadas de forma controlada en un sistema poroso y una solución contaminante se hace circular a través de los poros desde el ánodo hasta el cátodo mediante electroósmosis. De esta forma, debido a sus numerosas ventajas incluyendo la alta eficiencia, la ausencia de contaminación y el ahorro de energía puede convertirse en una alternativa sólida en la eliminación de HAPs en suelos (Ramadan y col., 2018; Chen y col., 2021).





**Figura 1.3.** Representación esquemática de un sistema EK-BIO para la recuperación de suelos mediante aplicación de electrocinética.

## 1.4. MOVILIZACIÓN BACTERIANA: RESPUESTA TÁCTICA

En esta tesis doctoral además de abordar los procesos de movilización de los HAPs, también se han llevado a cabo estudios sobre los mecanismos implicados en la movilización de los microorganismos a través del suelo como parte fundamental de los factores que intervienen en los procesos de movilización (proceso C, figura 1.1).

### 1.4.1. TRANSPORTE BACTERIANO EN SISTEMAS POROSOS

#### 1.4.1.1. Mecanismos de movilización bacteriana

El transporte de los microorganismos a través de un sistema poroso viene determinado por factores como el contenido de agua o la textura a través de la red de poros. Puede clasificarse según el movimiento sea producido por la propia bacteria (movimiento activo) o por factores externos (movimiento pasivo), incluyendo la mediación de otros organismos (Yang y van Elsas, 2018).

La presencia de agua aumenta la conectividad de los microporos permitiendo el movimiento activo de las bacterias. Este comportamiento bacteriano puede producir una movilidad celular diferente dependiendo de la disponibilidad de





nutrientes en el medio y de la presión sobre la predación existente (Banitz y col., 2012; Otto y col., 2017). En condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, las bacterias tienden a dispersarse y pueden movilizarse de forma individual, mediante la existencia de flagelos (“swimming”), y/o de forma coordinada, mediante la rápida translocación de las poblaciones bacterianas (“swarming”). Normalmente este tipo de movimiento celular se da por fenómenos de taxis bacteriana, aunque también puede producirse incluso por la propia actividad flagelar espontánea de la estirpe. Un estudio reciente demostró la capacidad de la estirpe *Bradyrhizobium japonicum* de alejarse aleatoriamente hasta 7 mm de su lugar de inoculación en un suelo saturado con agua en ausencia de un estímulo químico (Covelli y col., 2013). Algunas bacterias son capaces de formar estructuras multicelulares en cadena favoreciendo también su migración a través de los poros. Estirpes como *Bacillus cereus* (cepa ATCC14597) son capaces de abarcar distancias de decenas de micrómetros mediante estas estructuras (Vilain y col., 2006). También existe otro tipo de movilidad activa en bacterias conocida como movilidad de contracción impulsada o “twitching motility”, determinada por la presencia de estructuras similares a los flagelos, los pili, siendo las de tipo cuatro las relacionadas con este movimiento. Además, se ha descubierto que niveles bajos de predación promueven la translocación bacteriana en los sistemas porosos, aunque aún se desconoce hasta qué punto y en que condiciones funciona este proceso (Otto y col., 2017).

El movimiento pasivo a través de la estructura porosa puede producirse debido a un flujo de agua o a vectores orgánicos como la materia orgánica disuelta. La percolación del agua mediante precipitación natural o riego a través del sistema poroso puede facilitar la traslocación bacteriana a una escala de centímetros, describiéndose en varios estudios una relación entre la disminución de la densidad celular y el aumento de la profundidad en el material poroso (Breitenbeck y col., 1988; Hekman y col., 1995). Además de las propiedades físicas del sustrato, el movimiento celular también viene determinado por el flujo de agua y el número de lavados que recibe el sistema poroso (Kristian-Stevik y col., 2004).

El movimiento bacteriano a través del medio poroso dependerá de las posibilidades que tengan las células de cruzar los espacios existentes entre los



poros, pudiendo ser facilitado por la mediación de otros organismos que pueden actuar como “soporte” (lombrices, nematodos o protozoos) o como “redes biológicas” (hongos o raíces de plantas) facilitando el transporte bacteriano hacia zonas de menor accesibilidad (Yang y van Elsas, 2018).

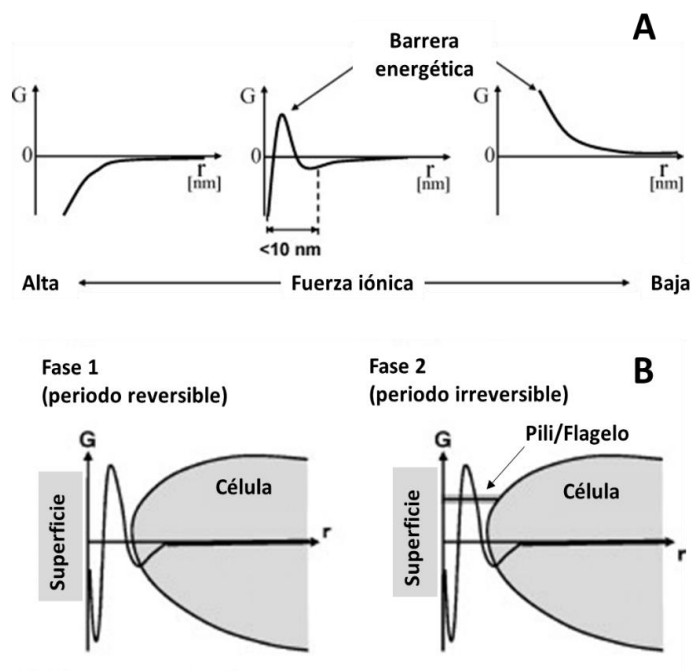
#### **1.4.1.2. Factores físico-químicos que afectan a la movilización bacteriana en sistemas porosos**

El transporte y la retención de las bacterias en medios porosos viene determinado por factores físico-químicos que afectan a la movilidad celular y, por tanto, al acceso de los organismos a las fuentes de contaminación. El transporte a través de la red de poros se encuentra muy determinado por las características físicas del sustrato y las células. El tamaño de grano, la estructura de los poros o la saturación por el agua son algunos de estos factores (Gargiulo y col., 2007; Sepehrnia y col., 2014). En los sistemas porosos, las bacterias experimentan un transporte convectivo similar a las partículas que se desplazan con el agua a través de los poros y cuya velocidad se rige por el gradiente de presión hidráulica, la porosidad y la distribución de la permeabilidad (Jiang y col., 2007). Por tanto, el transporte bacteriano puede describirse de forma macroescalar mediante modelos que incorporan toda esta variedad de procesos físicos.

Tradicionalmente, la teoría de Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (DLVO) se ha aplicado para estudiar la adhesión celular a las partículas durante el transporte bacteriano (Smets y col., 1999; Poortinga y col., 2002). Esta teoría establece que las interacciones entre un coloide y la superficie del colector pueden expresarse como la suma de las interacciones de atracción de Van der Waals y de las de doble capa electrostática, que pueden ser atractivas o repulsivas (Torkzaban y col., 2008). El fundamento teórico establece que en presencia de una partícula con carga en solución acuosa, los iones con carga superficial inversa son atraídos por la partícula, formando una doble capa eléctrica. Como las bacterias y las superficies de adhesión suelen tener una carga superficial negativa en solución acuosa, las fuerzas de repulsión se produce por el solapamiento de la doble capa electrostática de las células y el sustrato soporte. A una fuerza iónica baja, cuando una célula bacteriana se acerca a una superficie, existe una barrera energética que



las células no pueden superar nadando o mediante movimiento browniano, entendido como el movimiento aleatorio de una célula como resultado de las colisiones con moléculas circundantes en el fluido (figura 1.4, A)(Mitchell y Kogure, 2006). En el primer paso de la adhesión celular, una célula bacteriana llega a una determinada posición por su movilidad o movimiento browniano y se adhiere a una superficie de forma reversible. Tras ello, la célula utiliza su estructura móvil, pili o flagelos, o produce sustancias exopoliméricas (EPS) para tender un “puente” con la superficie de adhesión. Sin embargo, cuando la barrera energética aumenta a menor fuerza iónica resulta difícil para las estructuras móviles y las EPS alcanzar el sustrato, y las células bacterianas se ven incapaces de adherirse. Por el contrario, a fuerzas iónicas elevadas, la barrera energética desaparece y las células se adhieren fácilmente a las superficies de una forma irreversible (figura 1.4, B). Por tanto existe una relación entre la disminución de la adhesión bacteriana y la disminución de la fuerza iónica del medio lo cual puede ser explicado mediante la teoría DLVO (Hori y Matsumoto, 2010).



**Figura 1.4.** A, Interacción energética de Gibbs entre la superficie de una célula bacteriana y la superficie de una partícula dependiendo de la fuerza iónica. B, Proceso de adhesión bacteriana a una superficie. Esquema modificado de Hori y Matsumoto, 2010.



Dado que la teoría DLVO tradicional solo tenía en cuenta las fuerzas de largo alcance, se ha introducido un componente de fuerza adicional, la interacción ácido-base de Lewis de corto alcance, para completar el balance de fuerzas. La inclusión de las fuerzas de Lewis es esencial para describir las interacciones entre los materiales polares y, dado que las interacciones bacterianas incluyen fuerzas de corto y largo alcance, la distancia de separación entre las bacterias y la red de poros existente es muy importante cuando se evalúan estas fuerzas. En estos estudios se ha podido comprobar que las bacterias tácticas poseen tiempos de retención más largos en regiones de baja permeabilidad (Wang y col., 2016). Sin embargo, lo que sucede en el entorno físico-químico a escala de poros, donde los microorganismos interactúan con el fluido circundante, es mucho más complejo. Este entorno se caracteriza por un fuerte desorden del flujo espacial, velocidades lagrangianas intermitentes (entendida como la velocidad del fluido obtenida al derivar la función de posición con respecto al tiempo) y grandes gradientes a microescala, lo que provoca que su comprensión siga siendo objeto de estudio en el transporte bacteriano a escala micrométrica (de Anna y col., 2014; Holzner y col., 2015). Recientemente, algunos autores han propuesto un nuevo esquema sobre el funcionamiento de la movilidad bacteriana en sistemas porosos basados en micromodelos que contienen obstáculos al azar simulando la red de poros existente en los suelos. Este modelo confirma como la distribución de las estirpes móviles a través del modelo se caracterizan tanto por una movilización rápida como por una retención significativa debida a las perturbaciones del medio, a diferencia de las estirpes no móviles que tienden a agregarse y compactarse. De esta forma, en las cepas móviles las trayectorias celulares a lo largo del sistema de poros se caracterizan por dos procesos significativos: el aumento de la dispersión debido al intercambio existente entre los canales de flujo rápido y lento en las proximidades de los obstáculos y la aparición de un proceso de retención activo desencadenado por la movilidad. Así, este nuevo enfoque tiene en cuenta un movimiento celular aleatorio a través de velocidades de flujo variables a escala de poros y cuantifica el resultado de la dispersión hidrodinámica que se origina por el efecto combinado de la variabilidad de flujo a escala de poros y la movilidad



bacteriana, creando un modelo más realista sobre el transporte celular a través de la red de poros (Dentz y col., 2022).

Otros factores como el pH, la fuerza iónica y la valencia de los compuestos, también han resultado ser factores químicos influyentes en el transporte bacteriano (Zhang y col., 2015). En cuanto a los factores biológicos, numerosos estudios han demostrado que las propiedades superficiales de las células bacterianas como el tamaño y forma celular (Weiss y col., 1995), la hidrofobicidad, el potencial zeta y la motilidad (Jacobs y col., 2007), desempeñan un papel importante en la interacción entre las células y la superficie sólida. Esto afecta en gran medida, al transporte y deposición bacteriana en los medios porosos. Bajos potenciales zeta dan lugar a repulsiones electrostáticas que impiden la adhesión bacteriana y que, por tanto, favorecen el transporte celular. Algunos estudios sobre morfología celular y transporte han demostrado que las células esféricas poseen ventajas en la movilización a través de los poros con respecto a las células más alargadas (Weiss y col., 1995), o que las cepas hidrofóbicas quedan retenidas en un mayor porcentaje en los poros que las cepas hidrofílicas (Pereni y col., 2006). De igual forma, la movilidad celular tiende a aumentar las tasas de adsorción y a disminuir las tasas de desorción en el sistema poroso (Becker y col., 2004).

Existen varias características que van a determinar los procesos de adhesión bacteriana como la hidrofobicidad y la carga superficial tanto de las bacterias como del sistema poroso. En este sentido, algunos estudios han demostrado como las fuerzas de cizallamiento electroosmóticas y las fuerzas de adhesión explicadas a través de la teoría de DLVO (influidas por las propiedades del suelo y las bacterias) son las que van a determinar si las bacterias pueden migrar y depositarse en los sistemas porosos bajo la acción de un campo eléctrico (Cheng y col., 2021). La electroósmosis es muy eficiente a pocos nanómetros por encima de la superficie del material poroso, es decir, donde tiene lugar las interacciones bacteria-superficie, afectando a la deposición celular (Qin y col., 2015). Así, la eficiencia de transporte disminuye con el tiempo debido al debilitamiento de la distancia de acción efectiva del flujo electroosmótico y al aumento de las fuerzas de adhesión entre el material poroso y las bacterias (Cheng y col., 2021). Por su parte, la deposición bacteriana se verá favorecida por un aumento de la carga



superficial del material poroso y una reducción de la relación entre el potencial zeta de la superficie porosa y el potencial zeta de las bacterias (Shan y col., 2018). De esta forma, el ajuste de los parámetros anteriormente mencionados va a permitir controlar los mecanismos relacionados con el transporte y deposición celular, favoreciendo un mayor acceso de las bacterias a los contaminantes adsorbidos en los microporos y mejorando la eficiencia en los procesos de biorremediación.

#### 1.4.2. TAXIS BACTERIANA Y SU FUNCIÓN EN LA MOVILIDAD

Los sistemas porosos presentan una compleja distribución espacial, que supone que muchas de las técnicas convencionales empleadas en procesos de biorremediación se vean enormemente limitadas, sobre todo en aquellas zonas donde existe una baja permeabilidad y una contaminación asociada a microporosidad (Sun y col., 2022). El empleo de bacterias móviles puede aumentar la dispersión bacteriana en estas regiones, favoreciendo la transformación de los contaminantes (Lee y col., 2021; Dentz y col., 2022). Sin embargo, no todas las bacterias presentan una movilidad activa debido al elevado coste energético y metabólico que supone este proceso, además de la presencia o no de estructuras como los flagelos, que facilitan esta movilización (Neidhardt y Curtiss, 1996; Ottemann y Miller, 1997). A pesar de ello, los sistemas porosos como el suelo presentan una distribución heterogénea del contenido de agua y nutrientes debido a su compleja estructura, que hacen que la movilidad y la respuesta táctica sean estrategias comunes entre las bacterias, generando un gran interés como mecanismos en la recuperación de suelos contaminados.

La importancia del fenómeno táctico en los procesos de biorremediación se ha estudiado ampliamente (Singh y Olson, 2008; Pande y col., 2020), y se entiende como la capacidad de las bacterias para detectar y dirigir su movimiento ante la concentración de diferentes estímulos del medio (incluyendo sustancias químicas, fenómeno conocido como quimiotaxis bacteriana). Este movimiento celular puede producirse hacia concentraciones de sustrato que son óptimas para su crecimiento y supervivencia (atracción) o alejarse de ellas debido a su toxicidad (repelencia) (Bi y Sourjik, 2018; Karmakar, 2021). La movilidad de las bacterias

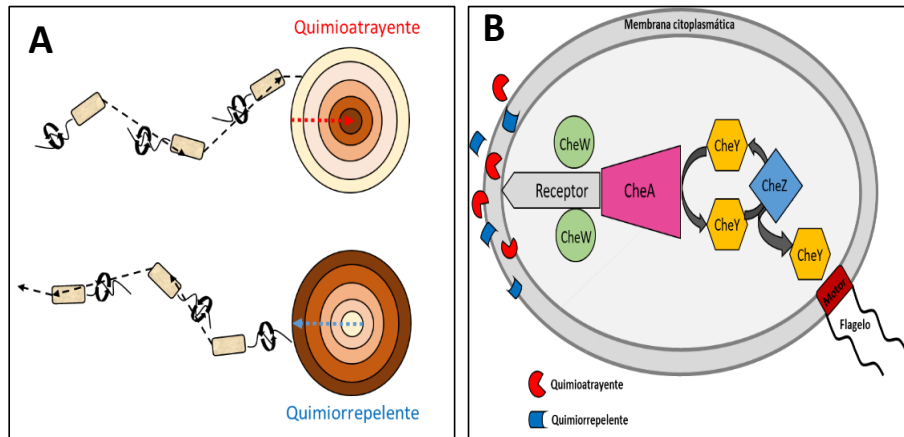


flageladas ante la presencia de un gradiente químico suele reflejarse en trayectorias más o menos rectilíneas, siendo interrumpidas por pequeñas reorientaciones que les permiten una difusión eficaz en su entorno (Colin y col., 2021) (figura 1.5, A). Sin embargo, no debe confundirse con el término taxis energética referida al movimiento que experimentan las bacterias en busca de unas condiciones metabólicas óptimas para su supervivencia en un hábitat concreto (Schweinitzer y Josenhans, 2010).

El movimiento de las células bacterianas ante la presencia de gradientes ambientales, se ha estudiado ampliamente en la bacteria móvil *E.coli*. La estructura y función de los complejos de señalización en la respuesta táctica viene determinada por un sistema de dos módulos: uno de transducción rápida de señales, y otro de adaptación más lenta (figura 1.5, B). El de transducción de las señales suele estar muy conservado en todas las vías de señalización de las distintas bacterias, y se compone de quimiorreceptores transmembrana que cambian de conformación ante las perturbaciones ambientales existentes y que, junto a la proteína CheW, modulan la actividad de la histidina quinasa CheA (Parkinson y col., 2015). La quinasa CheA fosforila el regulador de respuesta CheY, que se une al motor flagelar para inducir su rotación en el sentido de las agujas del reloj. En el caso de que un repelente esté presente en el entorno, la tasa de autofosforilización de CheA aumenta, lo que incrementa la frecuencia de giro (Karmakar, 2021).

Muchos de estos sistemas también poseen una fosfatasa específica CheZ que desfosforila rápidamente a CheY, dando una respuesta rápida de la actividad de la quinasa (Alexander y col., 2010).





**Figura 1.5.** Comportamiento táctico y ruta de señalización celular. A, Dos tipos destacados de respuesta microbiana frente a gradientes químicos: atracción y repelencia. Se observa movimiento rectilíneo y rotación flagelar. B, Representación esquemática de la vía de señalización por respuesta táctica de *E. coli*, donde se reconocen distintos estímulos químicos (positivos, quimioatrayentes o negativos, quimiorrepelentes) a través de receptores que desencadenan una respuesta de rotación del flagelo.

Así, las bacterias podrían utilizar la respuesta táctica para mejorar la adquisición de nutrientes o para acceder a ellos utilizando los gradientes ambientales generados por otras sustancias, como el caso de *Bacillus subtilis*. Esta especie parece utilizar gradientes de etanol para localizar fuentes de nutrientes como raíces de plantas (Tohidifar y col., 2020). En consecuencia, las bacterias móviles que han adquirido la capacidad de metabolizar contaminantes, también parecen haber desarrollado taxis positiva hacia muchas de estas sustancias.

Sin embargo, la respuesta táctica a estos gradientes supone un fenómeno muy complejo, donde las bacterias deben localizarse cerca de las concentraciones máximas del atrayente y reaccionar a su evolución temporal para maximizar su eficacia en el comportamiento táctico (Brumley y col., 2019). En el caso de los fenómenos de repulsión no existen muchos estudios sobre su relación con la movilidad bacteriana, pero puede considerarse como un prelude de la toxicidad que muchas de estas sustancias como las nanopartículas de Fe (analizadas en esta tesis doctoral) y Ag (Ortega-Calvo y col., 2011), así como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pandey y Jain, 2002) y NiSO<sub>4</sub> (Park y col., 2014) provocan en las células bacterianas. Normalmente la





respuesta celular inducida por los repelentes suele producirse a concentraciones subletales, lo que sugiere que el fenómeno de repelencia puede formar parte de las estrategias de supervivencia destinadas a minimizar los efectos nocivos de los contaminantes (Krell y col., 2013), pudiendo también aumentar la dispersión de los organismos en medios porosos.

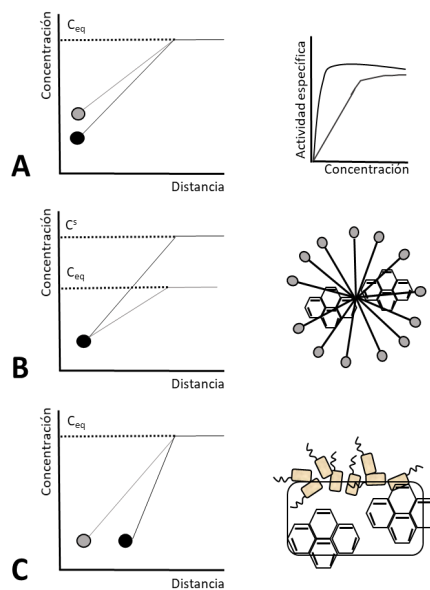
Las elevadas tasas de deposición y adhesión de los contaminantes orgánicos hacen que, en muchos casos, sean inaccesibles para la mayoría de los microorganismos. Así, la capacidad de los organismos móviles para acceder a los contaminantes a través de un gradiente químico, ha demostrado ser un proceso eficiente en el incremento de la biodisponibilidad de los HAPs (Krell y col., 2013; Jimenez-Sanchez y col., 2015; Jimenez-Sanchez y col., 2018). Los estudios basados en el comportamiento táctico bacteriano han revelado el potencial de los microorganismos para acceder a los contaminantes distantes (desde la escala submilimétrica a decimétrica) en comparación con las bacterias no móviles (Ortega-Calvo y col., 2013; Ahmad y col., 2020). Sin embargo, a pesar de estos avances, hasta donde sabemos, no se ha comprobado experimentalmente si las respuestas tácticas bacterianas podrían contribuir a la dispersión de bacterias degradadoras de contaminantes en poros micrométricos, es decir, en la misma escala espacial que las dimensiones de una sola célula bacteriana. De esta forma, la utilización de organismos flagelados y el manejo de su comportamiento táctico en microporosidades pueden llegar a incrementar las tasas de biodisponibilidad de los HAPs más inaccesibles (Ortega-Calvo y col., 2020) y con ello, de los procesos de recuperación de los suelos contaminados.



## 1.5. PROCESOS MICROBIANOS RELACIONADOS CON LA BIODISPONIBILIDAD DE HAPs

En el contexto de esta tesis doctoral podríamos describir el término biodisponibilidad como aquella fracción de los contaminantes que se encuentra susceptible para la biodegradación por parte de un microorganismo en un momento dado, una vez interaccionan con su membrana (proceso D, figura 1.1). La importancia de la biodisponibilidad en el proceso de biorremediación radica en la baja bioaccesibilidad de los organismos a estos contaminantes, entendida como aquella fracción que se encuentra disponible para el organismo si tuviera acceso a él (Semple y col., 2004; Ortega-Calvo y col., 2015). La incorporación de una dimensión temporal de la biodisponibilidad permite poder aclarar el conflicto que existe habitualmente entre los procesos de biodisponibilidad y biodegradación. Sin embargo, se sabe que la biodisponibilidad difiere entre organismos y lo que puede estar disponible para microorganismos como las bacterias, puede no estarlo para otros organismos y viceversa. Por ejemplo, algunos autores sugirieron la ventaja que presentaban las lombrices (*Eisenia fetida*) en los procesos de desorción de contaminantes del suelo debidos a sus procesos digestivos, mientras que los microorganismos sólo pueden acceder a los contaminantes presentes en la fase acuosa (Bosma y col., 1997). En el contexto de la microporosidad, por ejemplo, las bacterias tienen una mayor biodisponibilidad a los contaminantes debido a la mayor bioaccesibilidad por su tamaño microscópico que las lombrices, por lo que la biodisponibilidad es un proceso complejo y dependiente del contexto ambiental en el que se encuentren los contaminantes (Sijm y col., 2000). En este sentido debido a la compleja distribución de los contaminantes en los suelos, las bacterias son capaces de adoptar distintas estrategias que permiten aumentar la biodisponibilidad de los HAPs para facilitar su acceso a estos compuestos (figura 1.6).





**Figura 1.6.** Mecanismos bacterianos para la mejora del flujo de carbono correspondiente a los HAPs. Un aumento del flujo de contaminantes hacia las células, representado mediante un aumento de la pendiente de la concentración, puede obtenerse a través de la disminución en distancia de difusión mediante ajuste de la afinidad específica por el sustrato (A), un aumento de la solubilidad ( $C^s$ ) por producción de biosurfactantes (B) y un aumento de la adhesión al contaminante (C).  $C_{eq}$  hace referencia a la concentración de equilibrio en la fase acuosa. Figura modificada de Wick y col., 2001.

Entre ellas, la actividad química de los HAPs pueden jugar un papel importante como un buen indicador de la biodisponibilidad de estos compuestos, entendida como la fracción de HAPs disuelta en la fase acuosa y que puede medirse en términos de concentración ( $C_{free}$ ) en una muestra ambiental (Reichenberg y Mayer, 2006). Así, la actividad química de un HAPs puede ser determinante para la difusión y movilización de los microorganismos en el suelo y por tanto, determinante para los procesos de biodegradación. La actividad química de los HAPs también puede afectar a la concentración de equilibrio de los contaminantes en las membranas lipídicas suponiendo un indicador importante de toxicidad. Bioaccesibilidad y actividad química deben ser entendidas como aspectos complementarios para entender los procesos de biodisponibilidad y por tanto de biodegradación (Ortega-Calvo y col., 2013).



Así, los microorganismos pueden producir cambios en la distribución de los contaminantes en los sistemas porosos mediante la producción de sustancias que aumenten la bioaccesibilidad del compuesto (figura 1.6,B) (Maletić y col., 2019). Entre ellas, los biosurfactantes se consideran como una de las vías más importantes, disminuyendo la tensión superficial de los fluidos, promoviendo la solubilización y movilización de los contaminantes y causando un aumento de la biodisponibilidad y biodegradación (Zhang, Zhu, y col., 2013). Además de los biosurfactantes también existen otras sustancias orgánicas producidas por microorganismos o plantas que pueden aumentar la biodisponibilidad de los HAPs, como las ciclodextrinas (Garon y col., 2004) o los ácidos grasos insaturados (Yi y Crowley, 2007) utilizados en remediación de suelos contaminados.

Los mecanismos de adhesión bacteriana a las superficies de los contaminantes, ya sea fase sólida o líquida, también pueden producir aumentos en la biodisponibilidad de los HAPs (figura 1.6,C). La reducción en la distancia existente entre los contaminantes y las células capaces de degradarlos provocarían una mejora considerable en la transferencia de masa al aumentar los gradientes de difusión contaminante-bacteria (Wick y col., 2001). Sin embargo, la adhesión bacteriana puede producirse sin que ello suponga una utilización necesaria del contaminante como sustrato, lo cual ocurre con la estirpe *Staphylococcus aureus* y *Serratia marcescens* incapaces de crecer en presencia de hidrocarburos y en las que se observa la capacidad de adherirse a estos compuestos (Rosenberg y col., 1980). También se puede favorecer la biodisponibilidad de los contaminantes por un aumento de la dispersión celular, dando mayor acceso a la fuente de contaminación mediante procesos de taxis bacteriana (véase punto 1.4.2).

De esta forma, las fuerzas existentes entre una célula y la superficie del contaminante pueden verse influidas por diversos factores como la carga superficial o hidrofobicidad de la célula o el HAP y la fuerza iónica del medio (de Carvalho y col., 2009). El exterior de la célula suele presentar componentes bioorgánicos como los lípidos, proteínas y oligosacáridos que influyen en la hidrofobicidad y adhesión al contaminante (Norman y col., 2002). Estas sustancias pueden reducir la velocidad de difusión del HAP desde la interfase hacia la fase



acuosa, donde se encuentra la bacteria, mediante el control, por parte de estas moléculas superficiales, de la distancia entre la pared celular y la interfase (Harms y col., 2010). Es importante tener en cuenta que las superficies celulares de los microorganismos están en constante cambio en respuesta al crecimiento y envejecimiento celular o a cambios en las condiciones del medio, incluida la presencia de HAPs (Zheng y col., 2021). Estas modificaciones en la superficie celular pueden aumentar o disminuir la adherencia a los contaminantes y por tanto, desencadenar cambios en la biodisponibilidad (Chakraborty y col., 2010) lo que supone en muchas ocasiones, la dificultad en la determinación de este parámetro a nivel biológico.

## 1.6. BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Una vez que el contaminante se difunde a través de la fase acuosa, normalmente hasta penetrar en la pared celular y más tarde, en la membrana celular, comienza el proceso de biodegradación (proceso E, figura 1.1). De esta forma, los microorganismos son capaces de catalizar los contaminantes orgánicos a través de diferentes rutas metabólicas (Haritash y Kaushik, 2009; Crawford, 2011). En la mayoría de los microorganismos que degradan hidrocarburos, las enzimas catabólicas implicadas son intracelulares (Abbasnezhad y col., 2011). Estos microorganismos pueden mineralizar los HAPs (es decir, transformarlos completamente en moléculas inorgánicas simples como agua o CO<sub>2</sub>, y utilizarlos como fuente de energía y carbono) o cometabolizarlos (biodegradando parcialmente las moléculas orgánicas sin utilizarlas como sustrato) (Nzila, 2013). También pueden producirse como parte de un proceso de detoxificación intracelular cuyo propósito es hacer que los HAPs sean más hidrosolubles. Este mecanismo parecer ser un paso previo para la rotura del anillo bencénico y la asimilación del carbono mediante la oxidación intracelular y la hidroxilación de los HAPs (Johnsen y col., 2005). Así podríamos describir la biodegradación como un



proceso consistente en 2 fases principales: (a) la hidroxilación del HAP; y (b) la utilización por parte de la célula de los productos derivados de la hidroxilación. En términos de cinética, la efectividad del proceso de biodegradación, entendida como la disminución de la concentración de los contaminantes en un determinado ambiente a lo largo del tiempo, va a depender de diversos factores como el tipo de transformación que se produzca (mineralización o cometabolismo), la concentración inicial de HAPs que se encuentre disponible para las bacterias, y el tamaño de la población de microorganismos activos para el proceso (Niqui-Arroyo y col., 2011). En una situación hipotética, a una concentración baja de HAPs y una biomasa bacteriana importante, por ejemplo, las tasas de biodegradación se caracterizan por una disminución rápida de las concentraciones del contaminante, seguidas, mucho después de su vida media, de una desaparición más lenta del mismo (Alexander, 1999). Este proceso se describe a través de las curvas cinéticas de primer orden donde la velocidad de la reacción metabólica es dependiente de la concentración del HAPs, dándose a concentraciones por debajo de la constante de Michaelis-Menten ( $k_m$ ), que refleja la elevada afinidad enzimática por el contaminante orgánico. En condiciones reales de un suelo contaminado, las tasas de crecimiento bacteriano y, por tanto, de biodegradación se pueden ralentizar con el tiempo debido a un agotamiento del sustrato o de nutrientes necesarios para la transformación como consecuencia de la utilización del contaminante para el mantenimiento de las poblaciones bacterianas. Esto quiere decir que a pesar de existir una elevada concentración del contaminante, las bacterias entran en fase estacionaria debido a que todo el sustrato que se consume, se utiliza para el mantenimiento celular dando lugar a una estabilización de la biodegradación (Baboshin y Golovleva, 2012).

En estudios de biodegradación de HAPs en el laboratorio, las bacterias crecen en cultivos bajo condiciones nutritivas controladas donde tienen acceso total al hidrocarburo como única fuente de carbono y energía. Estos compuestos normalmente se añaden en concentraciones superiores a la solubilidad acuosa, por lo que las bacterias tienen un acceso ilimitado al HAP empleado. Sin embargo, en los sistemas porosos como el suelo, nos encontramos con un escenario totalmente distinto en el que las bacterias normalmente no utilizan una única



fuente de carbono, sino mas bien co-utilizan los distintos compuestos de carbono que tengan disponibles. Esto puede suponer un problema para la expresión de las enzimas que catalizan la degradación de los HAPs que pueden verse reprimidas ante la presencia de otros sustratos con mayor preferencia para la bacteria. Sin embargo, algunos estudios han observado como el nivel de expresión de fondo suele ser suficiente para el consumo inmediato del contaminante por parte de las bacterias si este se encuentra disponible (Egli, 2002). En consecuencia, aunque estos microorganismos consuman varias fuentes de carbono al mismo tiempo, no habrá necesariamente una concentración umbral de HAPs por debajo de la cual se detenga la biodegradación, siempre que el coste energético por mantener la actividad enzimática de degradación sea beneficioso a largo plazo. Numerosos estudios han demostrado el potencial de biodegradación de HAPs (Zhu y col., 2016; Ike y col., 2019; Smułek y col., 2020). Las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de utilizar como sustrato para su crecimiento una amplia variedad de HAPs como fluoreno, fenantreno o pireno (Doong y Lei, 2003; Zhang y col., 2011) al igual que otras bacterias del género *Mycobacterium* (Johnsen y col., 2005), *Bacillus* (Zhao y Wong, 2010) o *Achromobacter* (Tauler y col., 2016).

Sin embargo, la biodegradación de los HAPs de alto peso molecular es algo más compleja y sigue siendo un gran reto en biorremediación. Esto se debe a que gran parte de estos contaminantes no pueden ser utilizados de forma eficiente como sustratos al ser muy recalcitrantes, lo que da lugar a unas tasas demasiado bajas de transferencia de masa de los HAPs a las células bacterianas para satisfacer las necesidades metabólicas de las mismas. A pesar de ello, algunos organismos son capaces de transformar estas moléculas complejas a través de procesos cometabólicos, permitiendo estimular la biodegradación de los contaminantes hasta concentraciones que alcanzan valores traza. La mayoría de estos contaminantes orgánicos complejos presentan estructuras similares a los compuestos que son utilizados como fuentes de carbono y energía. Una mayor similitud química entre el sustrato de crecimiento y el HAP indica una mayor probabilidad de cometabolismo por parte de los microorganismos (Nzila, 2013).

Muchos de los productos derivados de la biodegradación por cometabolismo pueden ser utilizados por otras especies como sustrato de crecimiento,



eliminando la persistencia en el medio de los contaminantes orginales y los productos derivados de su biodegradación (Alexander, 1999; Nzila, 2013). Se han identificado una amplia variedad de microorganismos capaces de biodegradar moléculas como el benzo[a]pireno y otros HAPs a través de cometabolismo, incluyendo *Sphingomonas* sp, *Pseudomonas* sp o *Mycobacterium* sp (Zhong y col., 2007; Zeng y col., 2010; Fernández-López y col., 2021). También se ha asociado al cometabolismo la biodegradación de otros HAPs de menor peso molecular mediante la utilización de otros contaminantes orgánicos como sustrato de crecimiento como el pireno y el fluoranteno para favorecer el cometabolismo de fenantreno en *Sphingomonas* sp (Zhong y col., 2010).

### **1.7. CONTROL DEL RIESGO POTENCIAL CAUSADO POR LOS FACTORES DE MOVILIZACIÓN DURANTE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN. EMPLEO DEL SISTEMA PLANTA-BACTERIA-BIOCARBÓN**

A pesar de que las técnicas de biorremediación de suelos contaminados por HAPs supone una alternativa sostenible y de bajo coste en comparación con otras técnicas, a menudo su aplicación no tiene en cuenta los posibles riesgos causados por la transformación biológica de estos compuestos (proceso F, figura 1.1). Algunas de las sustancias químicas producidas durante la transformación de los HAPs por las bacterias pueden ser más tóxicas y móviles que los contaminantes parentales de los que proceden (Megharaj y col., 2014). Por ello, la evaluación de los riesgos asociados a las técnicas de biorremediación debe ser parte fundamental de su aplicación, ya que el transporte de estas sustancias en el medio puede producir un impacto adverso sobre la salud humana y el medio ambiente. Este aumento de peligrosidad también podría estar asociado a una mayor movilización de bacterias aplicadas de forma exógena, que puedan desplazar a las comunidades bacterianas autóctonas existentes. Las técnicas de biorremediación por tanto, no están exentas de limitaciones proponiéndose en esa tesis algunos mecanismos que permitan poder atenuar los problemas anteriormente mencionados.





En este contexto, el empleo de organismos vegetales puede no solo ayudar en el proceso de descontaminación de suelos, mediante la técnica conocida como rizorremediación, sino también disminuir los riesgos asociados a la biodegradación bacteriana, ya que las plantas favorecen la estabilización del sustrato y acotan la biodegradación a las zonas cercanas a las raíces controlando de forma más exhaustiva la aplicación de técnicas de biorremediación. Este proceso engloba aquellas técnicas que implican las interacciones entre los microorganismos y las plantas para degradar los contaminantes orgánicos en suelos (Miao y col., 2020). Además, la combinación de plantas e inoculación con cepas microbianas conocidas con capacidad de degradación (bioaumentación) se ha sugerido como una estrategia a considerar en los últimos años. Sin embargo, el éxito del proceso es muy variable y depende de diversos factores abióticos y bióticos como la temperatura, humedad, contenido en nutrientes o la competencia microbiana, haciendo que en algunos casos el proceso de bioaumentación sea muy inespecífico (Chen y col., 2016). Varios estudios han confirmado que la presencia de plantas en las estrategias de remediación de suelos, puede aumentar la biodisponibilidad de los HAPs y estimular el crecimiento y la actividad microbiana, acelerando la biodegradación de los contaminantes orgánicos (Kotoky y col., 2018; Li y col., 2019). Aunque se han utilizado multitud de especies vegetales en ensayos de biorremediación de HAPs, entre ellos la alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Afeqbua y Batty, 2018), la ballica inglesa (*Lolium perenne* L.) (Li, Możdżeń, y col., 2021) o el maíz (*Zea mays* L.) (Košnář y col., 2018); la tolerancia mostrada por el girasol (*Helianthus annuus* L.) ante la presencia de contaminantes orgánicos y su eficiencia en ensayos de fitorremediación la hace una de las opciones más adecuadas en este tipo de tratamientos (Ortega-Calvo y col., 2013; Ortega-Calvo y col., 2017; Fernández-López y col., 2021). Además, su rápida germinación y extenso sistema radicular permiten aumentar la superficie de colonización bacteriana y por tanto, el aumento de la bioaccesibilidad de los contaminantes (Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2000). Algunas características microbianas como la respuesta táctica también pueden mejorar la accesibilidad bacteriana a los focos de contaminación y, en asociación con las raíces de las plantas, pueden favorecer la dispersión microbiana (Dupuy y Silk, 2016). Con la inoculación con bacterias móviles como



*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas hydrophila*, la colonización de la raíz de tomate fue mayor que el control en el que se utilizó una cepa no móvil (Kamilova y col., 2005). Una serie de investigaciones han revelado la importancia de la taxis bacteriana y sus interacciones con los exudados de raíces de plantas en la mejora de la eficiencia de la degradación de los contaminantes (Neal y col., 2012; Sun y col., 2012; Zhang, Wang, y col., 2013). Estos compuestos contienen principalmente aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares y algunos de ellos, como los ácidos orgánicos, podrían cambiar las propiedades físico-químicas del suelo y aumentar la atracción de las bacterias tácticas hacia los contaminantes (Hartmann y col., 2009).

Además del uso combinado de plantas y bacterias, el biocarbón se ha establecido como otra de las estrategias a tener en cuenta en la recuperación de suelos contaminados con HAPs y la disminución de los riesgos asociados al proceso (Kong y col., 2018; Bianco y col., 2021). Debido a su bajo impacto ambiental y su bajo coste en comparación con las técnicas físicas y químicas, el uso del biocarbón puede emplearse como un valor añadido al proceso de biorremediación. Puede darse un efecto combinado del biocarbón y las raíces de plantas en el aumento de la actividad degradadora de los microorganismos como consecuencia de la mayor biodisponibilidad del carbono y los nutrientes del suelo (Li y col., 2020). Además, su alta capacidad de adsorción puede tener efectos positivos en el secuestro de los metabolitos derivados de los procesos de biodegradación (muchos de ellos persistentes en el medio), lo que llevaría a una reducción significativa de la toxicidad en el suelo (Kumar y col., 2022). La adsorción de los contaminantes orgánicos por el material es principalmente superficial y depende de factores como la hidrofobicidad y polaridad de los contaminantes (Pignatello y col., 2017; Zhang y col., 2017). Sin embargo, una vez que el biocarbón se añade al suelo como enmienda, las propiedades del mismo podrían verse modificadas por una serie de factores biológicos y/o químicos, que afectarían además a la interacción entre el material y los diferentes adsorbentes ambientales, la estabilidad del biocarbón o el destino de los productos secundarios secuestrados. Por tanto, se debe llevar a cabo una evaluación del riesgo ambiental cuando se utiliza el biocarbón para la



remediación de suelos. Estos valores de riesgo de los contaminantes son entendidos como la probabilidad de exceder un coeficiente específico o un determinado valor, por encima de unos estándares considerados de referencia para la seguridad ambiental y humana (Bengtsson y Törneman, 2009), por ejemplo el factor de bioconcentración (González-García y col., 2019) o translocación en plantas (Fernández-López y col., 2021). Así, el estudio de diferentes parámetros de riesgo tanto ambiental como humano, supone un valor añadido a los procesos de biorremediación que, habitualmente, no se tienen en cuenta en la planificación de las enmiendas para la restauración de suelos contaminados.

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



## 2. OBJETIVOS

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



El estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral, se ha centrado en distintos mecanismos de movilización disponibles para facilitar la biodegradación de compuestos xenobióticos de difícil acceso en materiales porosos. De esta forma, mediante transporte, bien de los contaminantes hacia la fuente de biodegradación o de los microorganismos hacia el foco contaminante, la hipótesis de partida se centró en que la mayor interacción microbiana con estos compuestos, produciría una mayor biodegradación, disminuyendo en muchos casos los riesgos asociados a este proceso mediante el empleo de plantas o la adición de materiales adsorbentes. Los objetivos específicos encuadrados dentro de este estudio son:

1. Aumentar la biodegradación de naftaleno mediante electrorremediación. El empleo de una corriente eléctrica favorecería, por electroósmosis, la movilización del contaminante hacia los organismos degradadores, aumentando la biodegradación. Para ello, se emplearon columnas electroquímicas sobre las que se indujo la deposición bacteriana, y se estudió la biodegradación en presencia o ausencia de pulsos eléctricos.
2. Estudiar del comportamiento táctico bacteriano frente a sustancias quimioefectoras y su impacto en el transporte. Se llevó a cabo un análisis de la respuesta táctica bacteriana, tanto positiva como negativa, frente a diferentes compuestos, y se evaluó la mayor capacidad de movilización celular debida a la respuesta táctica en sistemas de membrana y columnas de percolación.
3. Influencia del comportamiento táctico bacteriano en la biodegradación de naftaleno y cometabolismo de pireno. Consecuencia del mayor transporte celular en sistemas porosos, se estudió el efecto sobre la biodegradación de diferentes contaminantes en los sistemas de estudio mencionados anteriormente.



4. Evaluación del impacto sobre el riesgo y movilización de los contaminantes y las bacterias en el proceso de biodegradación. El objetivo fue disminuir los riesgos asociados a las técnicas de descontaminación por cometabolismo de pireno con la estirpe móvil *Pseudomonas putida* G7, mediante el empleo de un sistema modelo planta-bacteria-biocarbón.

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



### 3.1. REACTIVOS

Los reactivos químicos utilizados como quimioefectores fueron adquiridos mayormente a dos casas comerciales: ácido  $\gamma$ -Aminobutírico (GABA), L-aspartato sódico, malonato sódico, sucrosa y fructosa a Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EE.UU.). L-glutamato sódico, citrato sódico, fumarato sódico, glucosa y salicilato sódico se obtuvo de Panreac Química S.A. (Barcelona, España). El medio de cultivo Triptona Soja Agar (TSA) y Luria-Bertani (LB) también fueron adquiridos a la casa comercial Panreac Química S.A. El colorante sintético fast green FCF, empleado en la tinción de las membranas para su observación al microscopio, se obtuvo de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EE.UU.). Las nanopartículas de Fe (NANOFER STAR, nZVIs) para los ensayos de repelencia se obtuvieron de la empresa Nano Iron s.r.o. (Židlochovice, República Checa). Este producto comercial se presenta como un polvo seco de nanopartículas estable en el aire, gracias a una fina capa de  $Fe_3O_4$  que impide su oxidación inmediata en contacto directo con el oxígeno atmosférico. Las nanopartículas tienen forma de racimos y aglomerados, con tamaños de partículas aproximados de  $59,8 \pm 1,3$  nm. Su contenido en Fe se sitúa entre el 65-80%. El 35-20% restante del producto corresponde a la capa de óxido. Los HAPs naftaleno y pireno se emplearon en dos formas fundamentales. Los compuestos no marcados radioactivamente se adquirieron a Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) con purzas  $\geq 99$  % y  $\geq 98$ % respectivamente.  $[1,4,5,8-^{14}C]$ -naftaleno ( $58$  mCi  $mmol^{-1}$ , pureza radioquímica 99%) y  $[4,5,9,10-^{14}C]$ -pireno ( $58.8$  mCi  $mmol^{-1}$ , pureza radioquímica 98%) se obtuvieron de la casa comercial Campro Scientific GmbH (Berlin, Alemania). Los disolventes orgánicos acetona, etanol, metanol, diclorometano y acetonitrilo fueron suministrados en grado analítico por Fisher Chemical (Madrid, España).





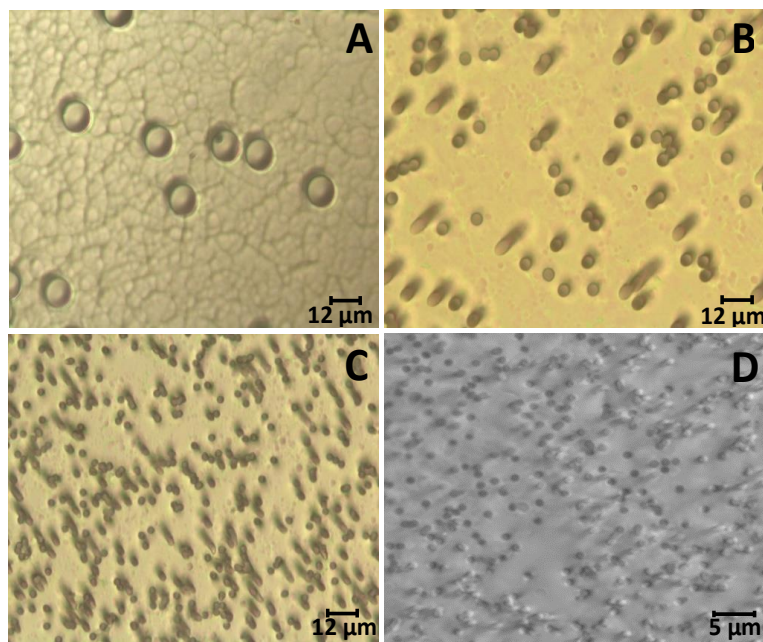
### 3.2. MATERIALES POROSOS Y SOPORTES

La arena de mar obtenida de Scharlab S.A. (Barcelona, España) se utilizó tanto en los ensayos en columnas de percolación como en el ensayo de invernadero. Sus principales características son: pH 5,8, tamaño de grano aproximado entre 300-350  $\mu\text{m}$  y densidad específica de 2,66  $\text{g cm}^{-3}$ . Para los ensayos en columnas, la arena se hizo pasar por un tamiz (CISA, Barcelona, España), recogiendo la fracción comprendida entre 250-400  $\mu\text{m}$  y lavándola ente 4 y 5 veces en agua destilada.

El adsorbente utilizado en el experimento de invernadero se obtuvo de la empresa comercial alemana EGoS GmbH (Bottrop, Alemania). Se trata de un producto comercial elaborado a través de pirolisis de restos de madera de abedul, haya o roble. Este material contenía un porcentaje de carbón superior al 90% y un área de superficie interna de 500  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ . El contenido total de HAPs se estimó en 0,2  $\text{mg kg}^{-1}$ . El carbón vegetal poseía una humedad de 48,3 % y un pH de 10.

Las membranas porosas Nucleopore track-etched (GE Healthcare Bio-Science, Canada) se utilizaron en el estudio del transporte bacteriano en biorreactores. Estas membranas estaban fabricadas de policarbonato y recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP). Se utilizaron con diferentes tamaños de poro: 12  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$ . Se determinó, para cada tipo de membrana, la densidad de poros mediante un microscopio óptico Carl Zeiss Axioskop 2 de contraste de fases (Jena, Alemania). Las imágenes (40 x) (Figura 3.1) se capturaron con una cámara RS Photometrics Coolsnap y se procesaron en el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EEUU). Dado que la resolución de este método no permitía determinar la densidad de poros ni el área total de la membrana con poros de 1  $\mu\text{m}$ , estos valores se obtuvieron con un microscopio confocal de barrido láser (LSCSM, Zeiss LSM 7 DUO, Jena, Alemania).





**Figura 3.1.** Fotomicrografías de los filtros de membrana utilizados. Se representan los filtros con 12 µm (A), 5 µm (B), 3 µm (C) y 1 µm (D) de tamaño de poro. En el caso del filtro de 1 µm, la imagen se captó con un microscopio confocal debido a la sensibilidad del microscopio óptico utilizado en A-C para el resto de tamaños de poro.

La caracterización física de las membranas viene recogida en la tabla 3.1. El área de la membrana que entró en contacto con la suspensión bacteriana en los biorreactores fue de 2,54 cm<sup>2</sup> en todos los casos. El grosor de las membranas era de aproximadamente 9 µm, mientras que el ángulo de contacto de las membranas del agua con el aire como medio circundante era de 50,1 ± 4,3° (Akbari y Ghoshal, 2015).



**Tabla 3.1.** Caracterización física de las distintas membranas empleadas en los biorreactores.

Membrana (μm)	Densidad de poros (poros cm <sup>-2</sup> )	Sección total en la membrana (%) <sup>a</sup>	Área total de poros (cm <sup>2</sup> )	Fracción disponible (%) <sup>b</sup>	Tamaño nominal (μm) <sup>c</sup>
12	1,1 x 10 <sup>5</sup>	11,8	0,3	83	11 ± 1
5	7,5 x 10 <sup>5</sup>	14,6	0,37	86	4,6 ± 0,4
3	2,5 x 10 <sup>6</sup>	18	0,46	80	2,7 ± 0,3
1	3 x 10 <sup>7</sup>	20,1	0,53	88	0,9 ± 0,1

<sup>a</sup> La sección total en la membrana se estableció como el porcentaje total de la membrana ocupado por los poros. <sup>b</sup> Se entiende como aquella fracción disponible que es ocupada por los poros de forma individual, es decir, no superpuestos. <sup>c</sup> El tamaño nominal de poros se proporciona por el fabricante.

Las bolas de vidrio (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) se emplearon en los experimentos de electrocinética como material de adhesión bacteriana para su estudio en la biodegradación de naftaleno. Este material (0,1- 0,25 mm de diámetro; densidad de 2,5 g cm<sup>-3</sup>; punto de fusión 1475 °C) se lavó varias veces con agua destilada y se introdujo en una mufla a 200 °C durante 2 h. Se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C) en condiciones de esterilidad hasta su utilización. Las anillas de silicona suministradas por la empresa Altec Products Ltd. (Cornwall, Reino Unido) se utilizaron en los ensayos de mineralización y cometabolismo de naftaleno y pireno respectivamente. Estas anillas tenían un diámetro interno de 2,57 mm y una sección transversal de 1,78 mm.



### 3.3. ESTIRPES BACTERIANAS, MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE PREPARACIÓN DE INÓCULOS

#### 3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens* LP6a

La estirpe *P. fluorescens* LP6a ha formado parte de numerosos estudios del laboratorio de investigación del Dr. Lukas Wick en el Helmholtz Center for Environmental Research (UFZ, Leipzig, Alemania) como parte de las investigaciones en electro-biorremediación (Qin y col., 2015; Shan y col., 2018; Shan y col., 2020). Esta cepa se encuentra de forma natural en reservas de carbón bituminoso localizadas en Alberta (Canada) (Penner y col., 2010) y es capaz de degradar un gran número de hidrocarburos aromáticos como fenantreno, naftaleno o antraceno (Hazrin-Chong y col., 2014), de ahí su importancia en el estudio de este tipo de contaminantes. Se trata de una bacteria gram-negativa de forma celular redondeada y con unas dimensiones de 2  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$  (Qin y col., 2015). Se seleccionó para la realización de los estudios de electrocinética en la UFZ porque no presenta movilidad mediante flagelos. Para ello, la bacteria fue cultivada en un medio mínimo mineral (MM) sólido, cuya composición se detalla en la tabla 3.2, con cristales de naftaleno en la superficie de las placas de Petri durante 48 h a temperatura ambiente (25 °C). Las placas eran renovadas una vez en semana para su mantenimiento. Para los experimentos de biodegradación se recogió una fracción de biomasa bacteriana y se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio mineral (MM) suplementado con 1,5 g L<sup>-1</sup> de naftaleno estéril. Los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital a 25 °C durante 72 h a 120 rpm.



**Tabla 3.2.** Medio mineral (MM) a pH = 6. Para la preparación del medio, se mezclaron 100 mL de la solución 1, 25 mL de la solución 2 y 5 mL de la solución 3. Todas las soluciones se prepararon con agua milli-Q. Se añadieron 16 g L<sup>-1</sup> de agar para la preparación del medio sólido.

Solución 1	Composición (g L <sup>-1</sup> )
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1
(CaNO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,5

Solución 2	Composición (g L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	55,83
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20

Solución 3	Composición (g L <sup>-1</sup> )
Na-EDTA	800
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	300
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4
MnCl <sub>2</sub> ·1H <sub>2</sub> O	10
CuSO <sub>4</sub>	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3
ZnCl <sub>2</sub>	2
LiCl <sub>2</sub>	0,5
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
KBr	2
KI	2
BaCl <sub>2</sub>	0,5



Los cultivos fueron incubados hasta alcanzar la fase estacionaria temprana (1,6 – 1,7 DO 600<sub>nm</sub> o  $2,1 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>), recogiendo las células mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. Las células se lavaron con una solución de tampón fosfato (100 mM, 10,62 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 5,31 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 1 L de agua milli-Q, pH= 7) para eliminar los restos de naftaleno, y fueron resuspendidas en el mismo medio para la realización de los experimentos.

### 3.3.2. CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas putida* G7

La estirpe bacteriana *Pseudomonas putida* G7 utilizada en esta tesis doctoral fue obtenida de la colección permanente del grupo de investigación de Biorremediación y Biodisponibilidad, en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (España) y mantenida a –80 °C (Jimenez-Sanchez y col., 2012). Las principales características de esta bacteria son su movilidad mediante flagelos polares y la capacidad de utilizar naftaleno como fuente de carbono y energía (Marx y Aitken, 2000; Filonov y col., 2004), además de cometabolizar pireno (Rolando y col., 2020).

El procedimiento de cultivo de la bacteria consistió, en primer lugar, en la reactivación a partir del stock a – 80 °C en un medio sólido rico Triptona Soja Agar (TSA), preparado con 40 g de producto en 1 L de agua destilada. Tras la incubación durante 24 a 48 h a 30 °C, una pequeña porción de biomasa bacteriana se transfirió a medio basal salino sólido (MSB) (tabla 3.3) suplementado con cristales de naftaleno esterilizados con acetona (0,1 g), como fuente de carbono e incubado durante 3 días a 30 °C. Posteriormente, estos cultivos se utilizaron para inocular 100 mL de MSB suplementado con 5 mM de salicilato sódico en matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales fueron incubados en un agitador orbital a 150 rpm durante 30 h.



**Tabla 3.3.** Composición del medio basal salino (MSB) utilizado para el crecimiento y experimentación con *Pseudomonas putida* G7.

Compuesto	Composición (mg L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340
CaCl <sub>2</sub>	14
NH <sub>4</sub> Cl	500
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	112
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2,5
FeCl <sub>3</sub>	0,22

Tras alcanzar la fase estacionaria temprana (0,6 – 0,7 DO<sub>600nm</sub> o  $6 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>) medida mediante un espectrofotómetro UV/VIS (T80+, PG Instruments, Reino Unido), donde la estirpe presentaba la movilidad más estable (Jimenez-Sanchez, 2013), se recogieron las células por centrifugación a 2570 rpm durante 10 min. Esta velocidad de centrifugación evitaba la pérdida de los flagelos y, por consiguiente, de la movilidad (Velasco-Casal, 2007). Es importante tener en cuenta la sensibilidad del método de determinación de la correcta movilidad de la estirpe, ya que la DO<sub>600nm</sub> siempre debe estar entre los valores mencionados anteriormente. Además, debe visualizarse siempre al microscopio óptico añadiendo un volumen de 15 a 20 µL en un portaobjetos más cubreobjetos. Tras 5 a 10 min debe comprobarse que la movilidad celular en la muestra anterior sigue siendo estable. Antes de su uso, las células fueron lavadas una vez y resuspendidas en medio MSB para eliminar posibles restos de salicilato. Para el mantenimiento de la estirpe, los cultivos sólidos con naftaleno fueron renovados dos veces por semana para asegurar su capacidad degradadora del contaminante. El tamaño celular de la estirpe (1 µm x 3 µm) se determinó con un microscopio óptico (Axio Scope 2 Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado con un cámara RS Photometrics CoolSnap (Arizona, USA) y el software informático asociado (Axio Vision Program, Carl Zeiss Microscopy).



### 3.4. DOPAJE PASIVO CON <sup>14</sup>C-NAFTALENO Y <sup>14</sup>C-PIRENO

El empleo de anillas de silicona se basa en la técnica de dopaje pasivo (Smith y col., 2012). Este método permite una liberación constante y continuada del contaminante, posibilitando un mayor control del sistema de estudio.

La técnica consiste en colocar entre 8 y 10 anillas en el fondo de un recipiente de vidrio de 20 mL con una solución de acetona con la concentración requerida de <sup>14</sup>C- naftaleno y pireno (100000-200000 dpm por anilla). En el caso del pireno, la solución de carga contenía también, en algunos experimentos, el compuesto no marcado a una concentración de 50 µg mL<sup>-1</sup> o el compuesto solo sin marcar a la concentración indicada anteriormente. Los frascos se mantuvieron durante toda la noche para facilitar la evaporación de la acetona. Se realizaron sucesivos lavados con pequeñas gotas de agua mili-Q en incrementos constantes de 25 a 200 µL, para favorecer la incorporación del naftaleno a la silicona por difusión. A las 24 h, se realizó la segunda serie de lavados de 1 mL cada hora durante 3 h. Para determinar la concentración real en las anillas, se sacrificaron dos de ellas y se pusieron en contacto con 1 mL metanol en agitación (100-120 rpm) durante 92 h. La solución de metanol se mezcló con 5 mL de un cóctel de centelleo líquido (Ultima Gold, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EEUU) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo modelo Beckman LS6500 (Beckman Instruments, Fullerton, California, USA).





### 3.5. ESTUDIO DE LA ADHESIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO INDUCIDO POR ELECTROCINÉTICA. TRANSPORTE BACTERIANO Y BIODEGRADACIÓN. EMPLEO DE LA ESTIRPE *Pseudomonas fluorescens* LP6a.

#### 3.5.1. TEST DE MOVILIDAD “SWIMMING” Y “SWARMING”

Se llevaron a cabo dos ensayos básicos de caracterización del movimiento bacteriano sobre superficies semisólidas, denominadas “swimming” y “swarming”(Worrich y col., 2016). Estos ensayos se realizaron en placas de LB con distintas concentraciones de agar (3 g L<sup>-1</sup> para los ensayos de swimming y 5 g L<sup>-1</sup> para swarming), que luego fueron inoculadas con una suspensión bacteriana en su superficie. Para la preparación de las placas, se añadieron 30 mL de medio en cada una de ellas con la ayuda de una probeta esterilizada, y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 17-24 h (swimming) o 1,5-2 h (swarming). La bacteria se cultivó en medio rico en agitación a 120 rpm durante 16 h y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El pellet se lavó una vez y se resuspendió en un tampón fosfato (10 mM, pH = 7,2). La suspensión bacteriana (2 µL, 10<sup>7</sup> CFU) se inoculó por triplicado en el centro de las placas con la ayuda de una jeringa estéril, y se incubaron las placas a 25 °C. La movilidad bacteriana se evaluó mediante la medida del radio de migración en la placa a lo largo el tiempo. Se calculó el área de la elipse formada por la suspensión ( $\pi r^2$ ) para cada tiempo muestreado en la placa.



### 3.5.2. EXPERIMENTO DE BIODEGRADACIÓN EN ESTANCO

Se realizó un experimento de biodegradación de naftaleno con la estirpe *P. fluorescens* LP6a para determinar la constante cinética de degradación del contaminante, en las condiciones empleadas posteriormente en los ensayos de columnas electroquímicas.

Las células bacterianas se recogieron en fase estacionaria temprana tras su cultivo en medio líquido MM con naftaleno, y se resuspendió con tampón fosfato (100 mM, ver sección 3.3.1). Las células bacterianas se inocularon a una  $DO_{600nm}$  de 0,1 o  $10^8$  células  $mL^{-1}$  en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de una solución de naftaleno completamente disuelto en tampón fosfato ( $12\text{ mg L}^{-1}$ ). Para ello, se añadió 1 g de naftaleno estéril a 1 L de una solución fosfato y se mantuvo en agitación constante durante 7 días para favorecer la disolución del contaminante (solubilidad del naftaleno:  $31\text{ mg L}^{-1}$ ) (Bojes y Pope, 2007). Posteriormente, se filtró el medio de cultivo con un filtro de placa porosa (6,5 cm de diámetro, 40-90  $\mu m$  poro, 140 mL capacidad, Álamo S.L., Madrid, España) para eliminar los cristales de naftaleno. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 80 rpm a  $25\text{ }^{\circ}C$  y se tomaron muestras (1 mL) a lo largo del tiempo.

Se realizó un control negativo en el que no se añadió bacteria. Las muestras se centrifugaron y se analizaron mediante un equipo HPLC Waters (detector de fluorescencia Water 245 Multi  $\lambda$  y detector de matriz de fotodiodos Water 996, columna Water PAH C de 8,5  $\mu m$  de tamaño de partícula, 4,6  $\times$  250 mm y 1  $mL\text{ min}^{-1}$  de flujo). La concentración de naftaleno en la fase acuosa se midió por inyección directa en el HPLC, mientras que en el pellet se midió tras la resuspensión en 1 mL de metanol y filtrado con filtro de nailon de 0,45  $\mu m$  (Rephile Bioscience Ltd., Boston, EEUU).



Los ensayos se realizaron por triplicado. Se estableció una medida control de la concentración de naftaleno en solución antes y después del centrifugado, para controlar las inevitables pérdidas del compuesto por su volatilidad. Para el cálculo de la cinética de biodegradación de naftaleno por *P. fluorescens* LP6a, se utilizó el modelo de degradación de primer orden (Shahriari-Moghadam y col., 2014; Lee y Kwon, 2020):

$$C/C_0 = e^{-kt}$$

Donde  $C/C_0$ , es la relación entre la concentración de naftaleno en condiciones iniciales ( $C_0$ ) y la concentración del contaminante resultante de la biodegradación ( $C$ ) a cada tiempo;  $k$  es la constante de degradación de primer orden y  $t$  el tiempo de muestreo. La transformación lineal de primer orden se calculó como:

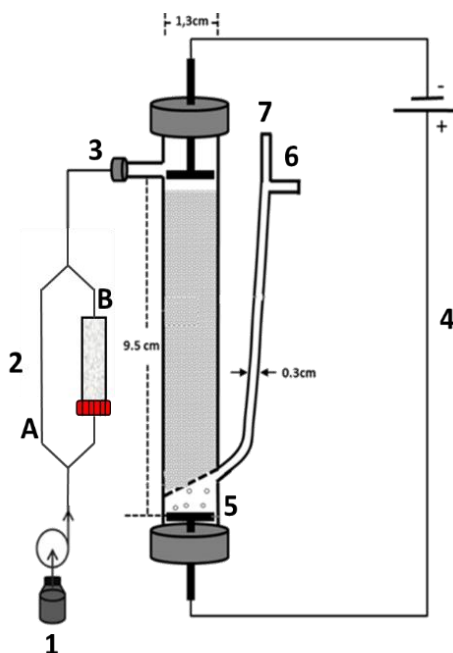
$$\ln C/C_0 = -kt$$

Que nos permitió determinar la constante de biodegradación del contaminante por parte de la estirpe de estudio.

### 3.5.3. ENSAYOS DE DEPOSICIÓN BACTERIANA EN COLUMNAS ELECTROQUÍMICAS

El efecto de una corriente continua (DC) sobre la adhesión y biodegradación bacteriana se estudió a través de columnas de percolación electroquímicas (Qin y col., 2015) (figura 3.2.). Estas columnas de borosilicato de 10 cm de largo y 1,3 cm de diámetro interno se rellenaron con bolas de vidrio de 0,1–0,25 mm de diámetro (véase punto 3.2). Las columnas estaban equipadas con un electrodo de Ti/Ir (De Nora Deutschland GmbH, Rodenbach, Alemania) en cada uno de sus extremos (cátodo y ánodo), conectados a una fuente de alimentación (P333, Szczecin, Polonia) que suministraba un DC constante de 1 V cm<sup>-1</sup>. En el caso de las columnas control, no se aplicó DC.





**Figura 3.2.** Esquema de una columna electroquímica. La suspensión de bacterias y la solución de tampón fosfato (1) es introducida a través de dos canales diferenciados (2, 2A: solución tampón y/o suspensión bacteriana; 2B: solución enriquecida con naftaleno) por un orificio de entrada en la parte superior de la columna (3). La corriente continua (DC) se aplica mediante dos electrodos: cátodo (+) y ánodo (-) situados en ambos extremos del sistema (4). La existencia de una placa porosa (tamaño de poro: 160–250  $\mu\text{m}$ ) en la parte inferior (5), evita el paso de las burbujas formadas electrolíticamente al interior del sistema. Las muestras son recogidas en el efluente (6) a través de un brazo adosado a la columna, mientras que las burbujas de oxígeno son eliminadas mediante una abertura de derivación en el brazo de vidrio (7). En los ensayos de transporte solo se utilizó el canal A, mientras que el canal B se empleó también en los ensayos de biodegradación. Esquema modificado de Quin y col. (2015)

Las muestras eran recogidas a través del efluente por medio de un brazo externo acoplado a las columnas. Previamente a los ensayos de transporte, se bombeó una solución tampón 100 mM durante 30 min para equilibrar el sistema. Los valores del volumen de poro (VP) y la porosidad (estimada gravimétricamente), eran de 3,97 mL y 0,42, respectivamente.

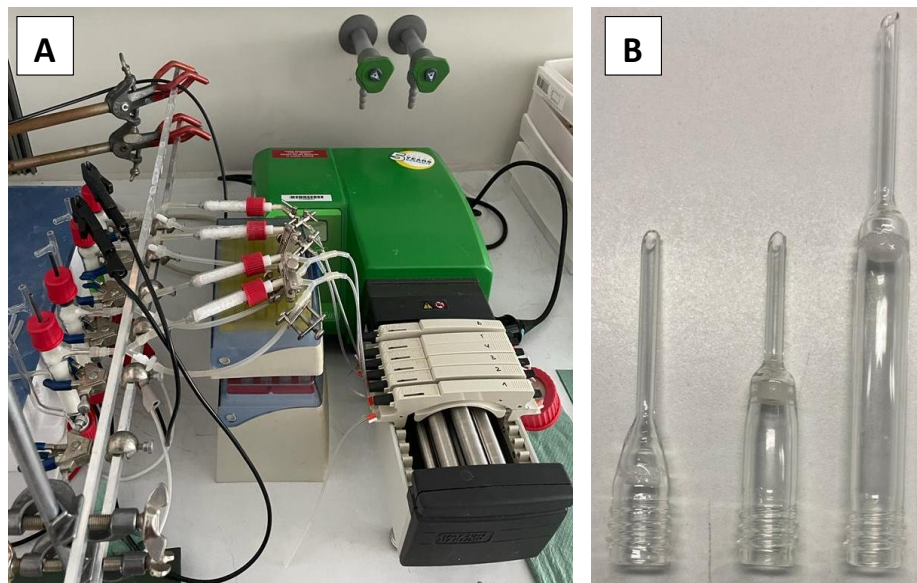


Los ensayos de transporte consistieron en el bombeo de una solución bacteriana a distintas concentraciones celulares ( $DO_{600nm}$  0,1 o  $1,32 \times 10^8$  células  $mL^{-1}$  y  $DO_{600nm}$  0,3 o  $3,98 \times 10^8$  células  $mL^{-1}$ ) a través de una bomba peristáltica (Serie 200, Watson Marlow, Cornellà de Llobregat, Barcelona, España) a un flujo constante de  $19,3 mL h^{-1}$  durante 3 VP. Para la preparación de la bacteria, se siguió el método de cultivo descrito en el apartado 3.3.1. Tras ello, se hizo pasar la solución tampón 100 mM por las columnas para eliminar el exceso de células que no habían quedado adheridas al material poroso, hasta alcanzar 6 volúmenes de poro (VP), a partir de lo cual, se aplicó el campo eléctrico a baja intensidad para favorecer la deposición bacteriana (hasta 18 VP). En las muestras recogidas se midió la  $DO_{600nm}$  por espectrofotometría mediante espectrofotómetro UV/vis (Evolution 160, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). La deposición celular se determinó comparando la  $DO_{600}$  del influente ( $C_0$ ) y el efluente ( $C$ )

#### 3.5.4. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN

Siguiendo el método descrito anteriormente, se realizaron ensayos de biodegradación de naftaleno en las columnas electroquímicas con algunas modificaciones (figura 3.3.A). Debido a la elevada adsorción del contaminante al material plástico de los tubos de la bomba peristáltica, se ideó un nuevo sistema con la introducción de un reservorio con cristales de naftaleno. Este elemento permitió el enriquecimiento del contaminante en solución, previo a la entrada en el sistema de la columna. La existencia de una placa porosa a la salida del reservorio evitó la presencia de cristales en el influente. Se emplearon varios tamaños de reservorio con diferentes cantidades de naftaleno (1,5 g, 0,7 g y 0,15 g), que se tradujeron en diferentes concentraciones del contaminante disuelto en el influente, lo que permitió evaluar el efecto de la concentración del contaminante en la biodegradación (figura 3.3.B).





**Figura 3.3.** A, Dispositivo empleado en el estudio de la biodegradación de naftaleno en columnas. Puede observarse la inclusión en el sistema, de un reservorio para el enriquecimiento de la solución tampón en naftaleno. B, distintos tamaños de reservorio empleados en el experimento de biodegradación.

Este nuevo esquema contaba con dos canales diferenciados: el primero, por donde se hacía pasar la solución tampón con o sin inóculo bacteriano (canal A), y el segundo, por donde pasaba la solución enriquecida con naftaleno (canal B) (véase figura 3.2.). De esta forma, cuando las células bacterianas o la solución sin inóculo pasaban por el canal A, el canal B permanecía cerrado y viceversa. Así, el planteamiento experimental seguiría la misma dinámica que los experimentos de transporte, pero en este caso, a los 8 VP, se abriría el canal B para bombear la solución enriquecida con el contaminante a las columnas hasta el final de experimento (18 VP). Se recogieron muestras del efluente de las columnas a lo largo del tiempo, y se midieron las concentraciones de naftaleno en un HPLC Shimadzu (detector de fotodiodos SPD-20A, Nexera SIL-30AC automuestra con rack de carga II, 1,5 mL min<sup>-1</sup> de flujo). Se añadió una pequeña gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a las muestras para asegurar que cualquier célula que pudiera salir por el efluente no interfiriera en la biodegradación del contaminante. Se comprobó que el ácido no interfería en la medición del naftaleno en el HPLC.



Para la determinación de la concentración de naftaleno en el efluente de las columnas, se realizaron distintos controles abióticos siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para evitar posibles interferencias en la biodegradación no debidas a la actividad bacteriana, se realizó un ensayo con células inactivadas por tratamiento térmico (Rabiei y col., 2019). Este procedimiento consistió en mantener los inóculos bacterianos resuspendidos en tampón fosfato en un baño a 70 °C durante 40 min, lo que permitiría la inactivación de las células sin producir una degradación de su integridad celular. Esto se comprobó mediante observación al microscopio óptico (Microscopio Nikon Multizoom AZ100, cámara asociada DS-U3 DS Control Unit, Nikon, Tokio, Japón). Las células inactivadas fueron bombeadas a través de las columnas con el mismo procedimiento anterior, utilizando el reservorio con 0,7 g de naftaleno y midiendo las concentraciones resultantes por HPLC.

### 3.6 INFLUENCIA DEL TRANSPORTE MEDIANTE TAXIS BACTERIANA EN LA BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO Y PIRENO. EMPLEO DE LA ESTIRPE *P. putida* G7

#### 3.6.1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA TÁCTICA Y CRECIMIENTO MICROBIANO

##### 3.6.1.1. Ensayos capilares

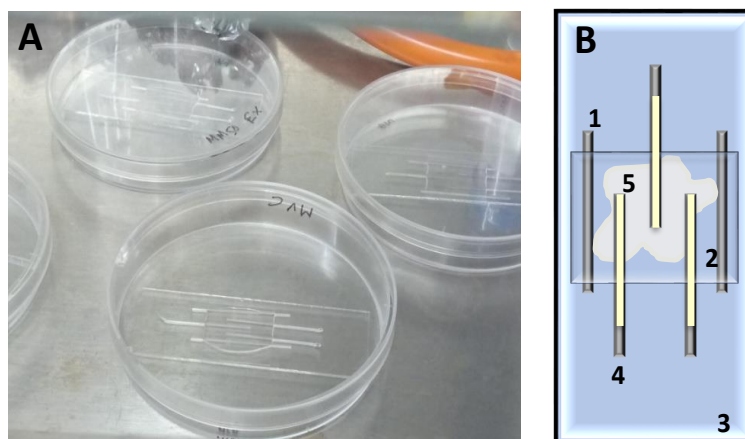
Para caracterizar la respuesta táctica de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 se utilizaron los métodos “chemical-in-capillary (CC)” y “chemical-in-pond (CP)”. Estos métodos (Jimenez-Sanchez y col., 2012) están basados en la cuantificación de las células viables que entran en un capilar, como resultado de la respuesta táctica hacia un gradiente químico formado dentro del capilar (Figura 3.4.A). El método CC es más sensible con los ensayos de taxis positiva mientras que el método CP es utilizado en los ensayos de repelencia. La diferencia fundamental entre estos dos tipos de técnicas se basa en la posición del quimioefector dentro del sistema: mientras que en los ensayos de atracción (CC) la sustancia química es introducida dentro del capilar, en los ensayos de repelencia (CP) el efector aparece en solución junto con la suspensión bacteriana.



En los ensayos de atracción se introdujeron 0,2 mL de suspensión celular (0,02  $DO_{600nm}$  o  $10^6$  células  $mL^{-1}$ ) en una pequeña cámara donde se colocaron dos tubos capilares (1  $\mu L$  cada uno, diámetros interiores de 200  $\mu m$ , Microcaps; Drummond, Broomall, PA, USA) en paralelo sobre un portaobjetos de microscopio cubierto por un cubreobjetos de vidrio (Figura 3.4.B). Otro tubo capilar (1  $\mu L$ ) se selló con llama en un extremo, y se sumergió en una solución quimioatrayente (en MSB) durante 15 minutos a varias concentraciones de efectores químicos [0,1, 0,75, 1 o 10 mM]. Estas sustancias eran los compuestos más abundantes encontrados es los exudados de raíces de girasol (*Helinthus annuus*)(Bowsher y col., 2015): aminoácidos (ácido aspártico, GABA y ácido glutámico); ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido fumárico y ácido málico) y azúcares (fructosa, glucosa y sucrosa), además del salicilato sódico como sustancia efectora modelo. En el caso del control, los tubos capilares se introdujeron en un vial de cristal con MSB sin efector táctico, y se pusieron en contacto con la solución bacteriana siguiendo el mismo procedimiento que en los experimentos anteriores. Los capilares se lavaron, y el extremo abierto se sumergió en la suspensión celular. Las cámaras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El número de células bacterianas que se acumularon en cada tubo capilar se cuantificó determinando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que se desarrollaron en placas de agar TSA (Velasco-Casal y col., 2008), incubadas a 30 °C durante 48 h. El número de capilares utilizados para cada condición experimental fue entre 3 y 5.







**Figura 3.4.** Cámara para ensayos de taxis bacteriana (A). En el esquema (B) se representa el modelo de capilaridad donde se sitúan dos capilares a modo de sujeción (1) entre el portaobjetos (2) y el cubreobjetos (3). Los capilares con las soluciones tácticas (atracción) o medio de cultivo (4), se ponen en contacto con una suspensión bacteriana (5) que puede estar en presencia (repelencia) o no de sustancias repelentes.

En los experimentos de repelencia, se utilizó glucosa (10 mM) y nZVI a diferentes concentraciones [1, 5, 10 o 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ]. En este método, una suspensión bacteriana con una densidad óptica de 0,6  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  o  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  se mezcló con glucosa antes de colocarla en la cámara con capilares que contenía la solución MSB. En el caso de nZVI se utilizó una solución tampón fosfato en lugar de MSB para mantener la estabilidad coloidal de las nanopartículas de nZVI (Auffan y col., 2008; Ortega-Calvo y col., 2016). La mezcla de repulsión se sonicó durante 1 h a 50-60 Hz con un sonicador ultrasónico (Branson 3510, Danbury, Connecticut, EE.UU). El objetivo fue evitar la agregación de nanopartículas antes de mezclarla con la suspensión bacteriana a una densidad celular final de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,3). La reacción de repelencia se cuantificó a partir del conteo de UFC en los capilares. El análisis estadístico para comparar los ensayos de control con los diferentes tratamientos se realizó mediante la prueba t-student ( $P \leq 0,05$ ). El índice táctico (IT) para los ensayos CC y CP se calculó como la relación entre el número de células que entraban en los capilares como resultado de los taxis y el número de células en el control.



### 3.6.1.2. Controles de crecimiento bacteriano con quimioefectores

Con el fin de controlar el posible crecimiento de la estirpe con los distintos efectores químicos, ya que pueden ser utilizados por la bacteria como fuente de C, se realizaron una serie de ensayos control para cada uno de ellos. Un inóculo con la misma densidad celular de los experimentos de biorreactores y columnas ( $DO_{600nm}$  0,1 o  $10^8$  células  $mL^{-1}$ ), se inoculó en 50 mL de medio MSB en matraces Erlenmeyer de 100 mL con distintas concentraciones de las sustancias químicas de estudio [0,1, 0,75, 1 y 10 mM]. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estáticas a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo de experimentación, normalmente cada hora durante 8 h, y se midió la densidad óptica.

Mediante las curvas de crecimiento pudo determinarse la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ , h) para cada una de las concentraciones empleadas, a través de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

### 3.6.2. EXPERIMENTO DE ADHESIÓN A PIRENO Y BIOCARBÓN

La capacidad de adhesión de la bacteria a la arena empleada en los experimentos de columnas se determinó a partir de un ensayo de turbidez mediante medida de la densidad óptica por espectrofotometría (Jimenez-Sanchez, 2013). Para ello, 1,5 g de arena se introdujeron en un vial de cristal de 20 mL de capacidad, y se inocularon con 2,5 mL de suspensión bacteriana en MSB a una concentración celular de 0,1  $DO_{600nm}$  o  $10^8$  células  $mL^{-1}$  como condición control. Los quimioefectores AREs y GABA se añadieron a una concentración de 0,75 mM para determinar la influencia de estas sustancias en la eficacia de adhesión al material poroso. Se realizaron 3 réplicas de cada situación experimental y se mantuvieron en agitación a 80 rpm durante 30 min a 25°C en un agitador orbital.

Tras varios minutos, se dejó que decantara la arena en el fondo del vial y se calculó la eficiencia (en %) como la diferencia de densidad óptica antes y después del ensayo.



Para el ensayo invernadero se realizó el mismo experimento descrito anteriormente con algunas modificaciones. Debido a la turbidez del biocarbón, 1 mg de ambos materiales por separado se mezclaron con 5 mL de una suspensión bacteriana ( $0,1 \text{ DO}_{600\text{nm}}$  o  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), con la ausencia o presencia de exudados artificiales a una concentración de 1,25 mM. Al igual que en el caso anterior, se realizaron 3 réplicas para cada situación de estudio, midiendo la DO antes y después del periodo de agitación por espectrofotometría.

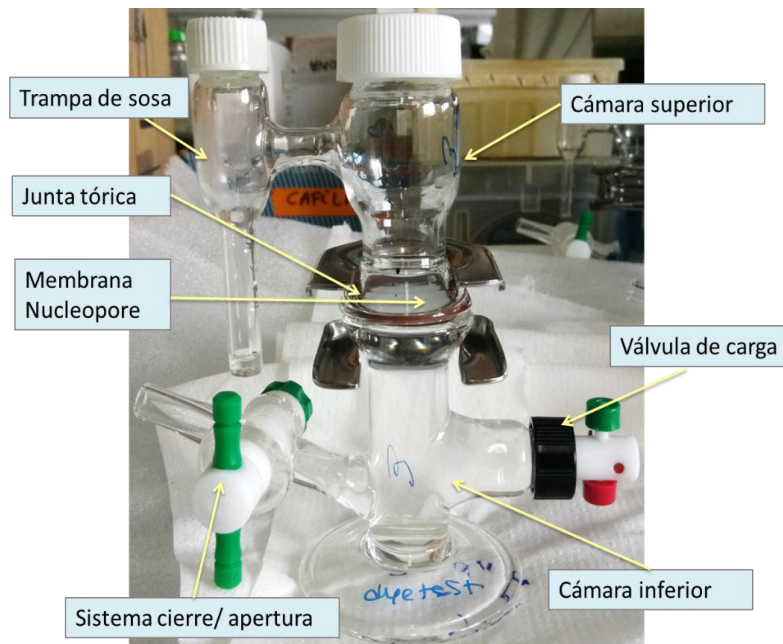
### 3.6.3. ENSAYOS DE TRANSPORTE BACTERIANO

#### 3.6.3.1. Experimentos en biorreactores de membrana

El transporte bacteriano a través de la respuesta táctica se estudió en unos sistemas de biorreactores de membrana con diferentes tamaños de poro (Akbari y col., 2016), diseñados y desarrollados por el grupo de investigación del Dr. Subhasis Ghosal de la Universidad de McGill (Montreal, Canada), con la que se llevó una estrecha colaboración a lo largo de esta tesis doctoral. El anclaje del sistema experimental consistió en la colocación de las membranas porosas siguiendo la descripción de la Figura 3.5. En primer lugar, 1 mL de suspensión bacteriana se introdujo a través de una jeringa en la cámara inferior (CI) del reactor mediante una válvula de carga a una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,1 ( $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Inmediatamente después, se colocaron los quimioefectores de estudio en la cámara superior (CS) del biorreactor con la ayuda de una pipeta a las concentraciones requeridas [0,1, 1 o 10 mM] en soluciones de MSB. En los ensayos de transporte por repelencia, los efectores químicos se introdujeron en la CI conjuntamente con las células bacterianas. En los ensayos con nanopartículas, la suspensión bacteriana se mezcló con nZVIs en tampón fosfato y la mezcla se introdujo inmediatamente en la CI, mientras que la CS solo contenía la solución tampón.

Los volúmenes de ambas cámaras eran de 3 mL para la cámara superior y 15 mL para la inferior. Para asegurar la correcta estabilidad de la movilidad de la bacteria, se realizaron observaciones con muestras de la cámara superior al microscopio óptico a lo largo del tiempo de experimentación.





**Figura 3.5.** Imagen del biorreactor utilizado en los experimentos. El biorreactor (12×10 cm de extremo a extremo) consta de dos cámaras separadas por una membrana porosa. La cámara superior (CS), con un volumen de 3 mL, estaba separada de la cámara inferior (CI), con un volumen de 15 mL, por una membrana colocada entre ellas. La membrana (con diferentes tamaños de poro) se colocó sobre la CI añadiendo unas pequeñas gotas de agua destilada para facilitar la adhesión a la CI. El uso de una junta tórica de silicona permitió la adhesión a la CI que, mediante una pinza, mantuvo todo el sistema cerrado. El medio de cultivo se introdujo a través de un sistema de cierre y apertura con la ayuda de una jeringa. A continuación, se inyectó 1 mL de inóculo bacteriano en la CI. Por último, se añadió el quimioefector a la CS (atracción) mediante una pipeta a la concentración requerida o a la CI (repelencia) junto con las bacterias. Obsérvese el brazo lateral de la CS utilizado como trampa de sosa para los experimentos de mineralización.

La eficiencia de paso a un determinado tiempo experimental se expresó como la concentración de células en la CS (C) dividida por la concentración total de células en el biorreactor (Co). Los valores de Co se calcularon a partir del número total de células inicialmente presentes en la CI, considerando el volumen total de líquido en la CS y la CI. El flujo celular (células  $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) se calculó a partir de la regresión lineal de los valores medios de concentración celular en la CS durante las dos primeras horas de experimentación, en función del área total de poros ( $\text{cm}^2$ )



disponible para cada membrana de estudio. El coeficiente de difusión ( $D$ ) se calculó usando la ecuación para una celda química diafragmática como se detalla a continuación (Cussler, 2009):

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln\left(\frac{C_{1, inferior}^o - C_{1, superior}^o}{C_{1, inferior}^o - C_{1, superior}^o}\right)$$

Donde  $\beta$  ( $\text{cm}^2$ ) es la constante de la celda diafragmática,  $t$  es el tiempo, y  $C_{1, i}$  es la concentración de bacteria en una determinada cámara. El valor para  $\beta$  se calculó como:

$$\beta = \frac{AH}{l} \left( \frac{1}{V_{inferior}} + \frac{1}{V_{superior}} \right)$$

Donde  $AH$  es el área de la sección transversal de los poros ( $\text{cm}^2$ ),  $l$  es el espesor efectivo de la membrana, y  $V_{inferior}$  y  $V_{superior}$  son los volúmenes de las dos cámaras, respectivamente.

La formación de un gradiente de quimioefectores a través de la membrana se verificó en ausencia de bacterias mediante un experimento control con membranas de  $5 \mu\text{m}$ , en el que se determinó espectrofotométricamente la evolución de la concentración de salicilato sódico en la CS ( $\text{DO}_{270\text{nm}}$ ) durante un periodo de 10 h. La concentración inicial de salicilato en la CS fue de 10 mM. Para evitar el crecimiento de microorganismos, se añadieron  $5,7 \mu\text{L mL}^{-1}$  de una solución de formaldehído al 40% en la cámara superior. Las muestras se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento descrito para los ensayos de transporte bacteriano. Para verificar que el paso de la bacteria a través de la membrana se debía a fenómenos tácticos, se realizó un nuevo ensayo control donde las bacterias fueron sonicadas durante 10 min en un sonicador para romper los flagelos. Este control se realizó en biorreactores con membranas de  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de poro por duplicado.



### 3.6.3.1a. Microscopía electrónica de barrido y microscopía láser confocal

Tras los experimentos con biorreactores, las membranas se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (FIB-SEM) con microscopio electrónico de doble haz Zeiss LSM 7 DUO (FIBSEM, Jena, Alemania) y por microscopía láser confocal (LSCSM). Para FIB-SEM se secó una sección de membrana según protocolo estándar de deshidratación por punto crítico adaptado a muestras biológicas. Para LSCSM se fijó otra porción de la membrana con glutaraldehído al 1,6 % en tampón de cacodilato (0,1 M, pH 7,4). A continuación, se añadieron unas gotas de colorante fast green (FCF) al 1 % a las muestras. El material de las membranas se tiñó de azul brillante en las imágenes de LSCSM mientras que las células bacterianas se tiñieron de verde/amarillo/rojo.

### 3.6.3.2. Ensayos de transporte en columnas de percolación

Los ensayos de transporte bacteriano se realizaron en columnas de vidrio empaquetadas con arena siguiendo trabajos previos del grupo de investigación (Jimenez-Sanchez y col., 2015; Rolando y col., 2020) (figura 3.6.). A diferencia de los ensayos en biorreactores, en estos experimentos existía un aporte constante de flujo a través de una bomba peristáltica funcionando a 32,5 rpm. Aproximadamente 10 g de arena fueron humedecidos y empaquetados en las columnas de percolación (10 cm de largo y 0,9 cm de diámetro interno) con la ayuda de una pipeta. Previamente a la introducción de la suspensión celular, las columnas se bombearon con medio MSB durante 30 min, correspondiente a 1 volumen de poro (VP), para homogeneizar el sistema y evitar cualquier turbidez en las muestras de percolados debidas al material poroso. Se introdujo la suspensión bacteriana ( $DO_{600nm} = 0,1$  or  $10^8$  cell mL<sup>-1</sup>) mediante la bomba peristáltica en presencia o ausencia de quimioefectores (GABA y AREs) a una concentración de 0,75 mM y a un flujo constante de  $0,186 \pm 0,003$  mL min<sup>-1</sup>. Se realizó un ensayo de transporte previo en las mismas condiciones descritas anteriormente a diferentes concentraciones de GABA [0,1, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mM] para la determinación de la concentración adecuada de efectores químicos.





**Figura 3.6.** Esquema experimental para el estudio del transporte en columnas de percolación.

Los efluentes de las columnas fueron recogidos cada 15 min en tubos de vidrio de 20 mL para la determinación de la densidad óptica mediante un espectrofotómetro a los diferentes intervalos de tiempo. La eficiencia de paso a través de la columna se expresó como la concentración de células en la salida (C) a un determinado tiempo, dividida por la concentración total de células en la entrada (Co). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Se calcularon las distintas características y propiedades hidrodinámicas del material poroso: volumen de poro (VP), flujo hidráulico y porosidad. El volumen de poro ( $2,73 \pm 0,29$  mL) se define como la capacidad volumétrica de la columna en ausencia de la arena. Su cálculo se basó en la diferencia de peso de la columna antes y después de ser empaquetada tras ser secada en estufa ( $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 h. Para el flujo hidráulico ( $0,69 \pm 0,07\text{ cm min}^{-1}$ ) el producto de la velocidad de flujo y la longitud de la columna se dividió entre el volumen de poro de la misma. La porosidad ( $0,42 \pm 0,04$ ) se calculó como el resultado de la relación entre el VP y el volumen de líquido que puede albergar la columna en vacío.



### 3.6.4. EXPERIMENTOS DE BIODEGRADACIÓN

#### 3.6.4.1. Ensayos en ausencia de restricción física

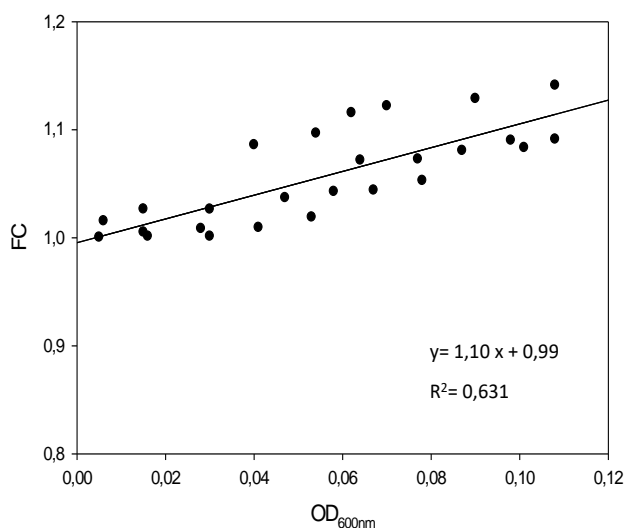
Se realizaron ensayos de biodegradación de HAPs en condiciones estáticas en ausencia de membrana en matraces (mineralización) o botellas de cristal (cometabolismo). Se utilizó para estos experimentos en fase acuosa, la técnica de *dopaje pasivo* con anillas cargadas con los contaminantes marcados con  $^{14}\text{C}$ . Los ensayos de mineralización se llevaron a cabo a temperatura ambiente en matraces Erlenmyer de 50 mL con 25 mL de MSB y un inóculo bacteriano a una concentración celular de  $10^8$  cell mL $^{-1}$  o 0,1 DO $_{600\text{nm}}$ . Se aplicaron los quimioefectores GABA, citrato o AREs a distintas concentraciones [0,1, 10 mM], mientras que en los matraces control solo se añadió la bacteria. En todas las situaciones experimentales se introdujo una anilla cargada radioactivamente con  $^{14}\text{C}$ -naftaleno (con 100.000 a 200.000 dpm) en los matraces.

Se recogieron muestras a distintos tiempos (120 h) de una trampa de sosa situada en la parte superior de los matraces con 1 mL de una solución de NaOH (0,5 mM) que era remplazada periódicamente y la radioactividad se midió en un contador de centelleo (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.; modelo LS 6500 TD). Las muestras se mantuvieron en oscuridad toda la noche antes de medir la radioactividad para disipar la quimioluminiscencia. Las tasas de mineralización (ng mL $^{-1}$  h $^{-1}$ ) se calcularon mediante regresión lineal de la cantidad de  $^{14}\text{C}$ -naftaleno mineralizado (ng) (como CO $_2$  recogido en la trampa de sosa) durante las primeras 56 h de experimentación y el volumen total introducido en los matraces (25 mL). En los ensayos de cometabolismo de pireno se añadieron 25 mL de MSB a botellas de vidrio de 50 mL y una suspensión bacteriana a la misma concentración celular que en el experimento anterior. Se introdujeron los quimioefectores GABA y AREs a una concentración de 0,1 mM. Se añadieron anillas cargadas con pireno no marcado (50  $\mu\text{g}$ ) al sistema. Para detectar la concentración de pireno en las botellas, se utilizó un espectrómetro de fluorescencia sincrónico (F-2500, Hitachi, Tokio, Japón)(Ortega-Calvo y Gschwend, 2010), en el que se recogieron los espectros de emisión para el pireno en el rango comprendido entre 220 nm y 400 nm y se emplearon rendijas de excitación y emisión de 5 nm y 2,5 nm, respectivamente. Para la medida de la fluorimetría se tomaron muestras de 2 mL





y se devolvieron de nuevo a las botellas. Debido a la turbidez de la suspensión celular se estimó un factor de corrección de filtro interno multiplicando la fluorescencia observada a OD<sub>600nm</sub> a distintas concentraciones de suspensiones de *P. putida* G7, frente a la relación entre la intensidad de la fluorescencia detectada y la teórica en ausencia de células (figura 3.7). La siguiente ecuación representa el cálculo del factor de corrección (FC), tomándose como valor 1 y entendiéndose despreciable en la influencia de la señal del pireno:  $FC = 1,10 \times OD_{600nm} + 0,99$



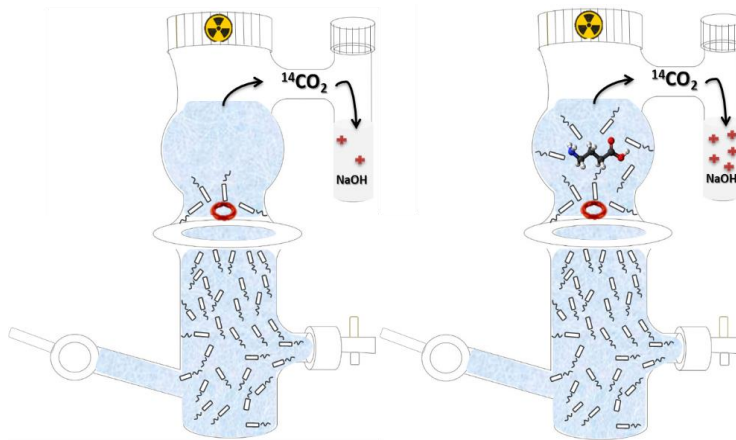
**Figura 3.7.** Determinación del Factor de Corrección (FC) para *Pseudomonas putida* G7 en el ajuste de la fluorescencia en función de la densidad óptica.



### 3.6.4.2. Biorreactores

#### 3.6.4.2a. Ensayos de radiorespirometría

Siguiendo el mismo procedimiento que en los ensayos de transporte en biorreactores, se realizaron ensayos de mineralización de  $^{14}\text{C}$ -naftaleno. Se introdujo la bacteria *P. putida* G7 en la cámara inferior del reactor, mientras que los quimioefectores, a una concentración 0,1 mM, y las anillas cargadas radioactivamente se situaron en la cámara superior. La producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -naftaleno se determinó en la trampa de sosa acoplada a la cámara superior, que contenía 1 mL de NaOH 0,5 mM (figura 3.8.). Igual que en el caso anterior, la solución se reemplazó en cada medida y las muestras fueron mezcladas con líquido de centelleo (Ultima Gold, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y la radioactividad se midió con un contador de centelleo líquido. Las tasas de mineralización fueron también calculadas para estos experimentos, siendo el volumen utilizado para los cálculos 3 mL y considerándose, por tanto, que la mineralización tiene lugar en la cámara superior del reactor.



**Figura 3.8.** Esquema de ensayo de mineralización de naftaleno en biorreactores de membrana. A, control sin quimioefector; B, se añadió quimioefector a una concentración de 0,1 mM.



### 3.6.4.2b. Ensayos de cometabolismo

Debido a la imposibilidad de la bacteria de mineralizar pireno, el método descrito anteriormente tuvo que ser modificado para adaptarlo a un nuevo sistema de muestreo basado en medidas por fluorimetría de este compuesto. En este caso, tanto la bacteria como los efectores químicos se introdujeron en el sistema a las mismas concentraciones que en el caso del naftaleno. Una anilla cargada con pireno no marcado se colocó en la cámara superior del reactor, y se tomaron 2 mL de la misma a lo largo del tiempo de experimentación. Tras el análisis, las muestras fueron devueltas de nuevo a los biorreactores. Para todos los casos, los biorreactores se taparon con papel de aluminio para evitar la fotodegradación del pireno. Se realizó un ensayo control en condiciones abióticas para determinar el paso del contaminante a la fase acuosa.

### 3.6.4.3. Columnas

#### 3.6.4.3a. Análisis de la movilidad bacteriana con pireno

Se determinó la movilidad y comportamiento de las células bacterianas en el influente y el efluente de los experimentos de columna. Se analizaron varios tiempos de muestreo (0, 2, 4 y 5,5 VP), tomando una muestra de 15  $\mu\text{L}$  y colocándola sobre un portaobjetos, realizándose la observación con una Axiocam 305 color Carl Zeiss (Jena, Alemania). En el caso del influente se puso en contacto una suspensión de bacterias ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,1 o  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) con los quimioefectores a una concentración de 0,75 mM, y se analizó directamente la movilidad a los diferentes tiempos experimentales. Se dopó una anilla de silicona con pireno no marcado a la misma concentración empleada en los ensayos de cometabolismo (50  $\mu\text{g}$ ) para estudiar la influencia de la presencia del contaminante en la motilidad bacteriana de la estirpe. La anilla se colocó en el extremo de salida de la columna simulando una fuente de contaminación. El análisis de la movilidad se realizó con el programa LabTrack (versión 4, BIORAS ApS, Ebeltoft, Dinamarca) a través de la grabación de videos de aproximadamente 5 s con el software informático (interfaz, Zen software blue edition).



El estudio consistió en analizar la velocidad lineal ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) y la tasa de cambio de dirección o RCDI ( $\text{deg s}^{-1}$ ). Estos dos parámetros de movilidad se calcularon a lo largo de toda la longitud de las trayectorias de células individuales. Las células con velocidades inferiores a  $17 \mu\text{m s}^{-1}$  se eliminaron para evitar trayectorias debidas al movimiento intrínseco de las células. Los cambios de aceleración se establecieron cuando la velocidad lineal cambió a un valor superior de  $50 \mu\text{m s}^{-1}$ , mientras que la frecuencia de cambios de dirección (RCDI) se determinó para valores superiores a  $1000 \text{ deg/s}$ . Todas las observaciones de cambios de aceleración y giro se realizaron para un total de 10 trayectorias representativas.

### 3.6.4.3b. Ensayos de cometabolismo

Los ensayos de cometabolismo de pireno también se realizaron en columnas de percolación siguiendo el método descrito anteriormente para los experimentos de transporte (Rolando y col., 2020) con algunas modificaciones. Se introdujo una anilla de silicona dopada siguiendo el método de *dopaje pasivo* con  $^{14}\text{C}$ -pireno (100.000 a 200.000 dpm) y pireno no marcado ( $50 \mu\text{g}$ ), a 2 cm de la salida de la columna simulando una fuente de contaminación distante. Se empaquetó la columna con arena y se bombeó una solución bacteriana con quimioefectores bajo las mismas condiciones de concentración que en los ensayos de transporte. El efluente se recogió cada 15 min en tubos de vidrio de 20 mL, y se midió la OD por espectrofotometría. Submuestras de 2 mL se centrifugaron en tubos de centrifuga de cristal de 20 mL a 10.000 rpm durante 5 min. El pellet se resuspendió en 1 mL de metanol y se filtró mediante filtros de jeringa de nailon de  $0,45 \mu\text{m}$  (Phenomenex, California, USA).

Se realizó un ensayo previo en estanco en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de MSB y una anilla de silicona marcada bajo las mismas condiciones que el ensayo previo de cometabolismo en columnas. Se estudiaron diferentes situaciones: un control que solo contenía el medio MSB, la adición de diferentes quimioefectores (GABA y AREs) a una concentración de  $0,75 \text{ mM}$  en ausencia o presencia de bacteria ( $\text{DO}_{600}$  de  $0,1$  o  $10^8 \text{ células mL}^{-1}$ ) y matraces donde solo se añadió bacteria. Todos los matraces se mantuvieron en agitación a  $80 \text{ rpm}$  y a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Cada situación experimental se realizó por



duplicado. Se recogieron muestras (1 mL) de la fase acuosa a lo largo del tiempo (96 h) y se midió la radioactividad mediante contador de centelleo líquido. En ambos experimentos se procesaron muestras de diferentes tiempos de muestreo en un colector de fracciones acoplado a un HPLC, para separar las posibles fracciones de los metabolitos generados por el cometabolismo de pireno por *P. putida* G7. Tanto en el ensayo de columnas (2, 4 y 5,5 VP) como el experimento en estanco en fase acuosa (96 h), se analizaron por separado el pellet y el sobrenadante. En el ensayo en estanco solo se consideró un tiempo de muestreo para evitar posibles cambios de concentración en la fase acuosa, debidas a la pérdida de volumen en el sistema por la toma de muestras. Submuestras de 1 mL de cada una de las muestras se introdujeron en un vial de HPLC (ND9, viales de cristal ámbar, 1,5 mL de capacidad, Geyer GmbH & Co., Renningen, Alemania) y se analizaron mediante el colector de fracciones, obteniendo 4 fracciones diferentes según tiempo de retención del compuesto. Las diferentes fracciones se recogieron en viales de centelleo de 20 mL y se mezclaron con 10 mL de cóctel de centelleo líquido. Posteriormente, se midieron en contador de centelleo durante 10 min. Los análisis de HPLC se realizaron con un sistema HPLC Waters (detector de fluorescencia Water 245 Multi  $\lambda$ , detector de matriz de fotodiodos Water 996 y colector de fracciones Water III, columna Water PAH C de 8,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 4,6  $\times$  250 mm y 1 mL  $\text{min}^{-1}$  de flujo). La fase móvil utilizada fue un gradiente de acetonitrilo/agua milli-Q. La columna se mantuvo a una temperatura de 30 °C.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular



### 3.7. REDUCCIÓN DEL RIESGO ASOCIADO A LA BIORREMEDIACIÓN EN SISTEMAS POROSOS

#### 3.7.1. MOVILIZACIÓN DEL PIRENO Y LA ESTIRPE *P. putida* G7 EN ENSAYOS DE LABORATORIO. UTILIZACIÓN DE FILTROS POROSOS

El diseño experimental consistió en embudos con filtro de placa porosa de vidrio (6,5 cm de diámetro, filtro de vidrio de 40-90  $\mu\text{m}$  de poro, 140 mL de capacidad, Álamo S.L., Madrid, España) con capas de arena y biocarbón, simulando el diseño de las macetas que serían empleadas posteriormente en el experimento de invernadero. Los embudos contenían 335 g de arena que, una vez empaquetada, formaba una capa de 7 cm sobre la placa porosa. Se realizaron 2 grupos diferentes de ensayos: con y sin biocarbón. Para ello, se introdujeron aproximadamente 140 g de arena (3,5 cm) en el fondo del filtro. En el caso de los embudos a los que se les añadió biocarbón, se colocó una fina capa a 6,5 cm de la parte superior del embudo.

En todos los casos, se añadió una capa de arena (a 3,5 cm de la capa superficial de arena) con  $^{12}\text{C}$ - (8,6 mg  $\text{Kg}^{-1}$ ) y  $^{14}\text{C}$ - (40000 dpm) de pireno. *Pseudomonas putida* G7 se añadió al sistema a una concentración final de  $1,65 \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  ( $2,75 \times 10^9$  células  $\text{kg}^{-1}$  de suelo) siguiendo el procedimiento descrito para todos los ensayos a lo largo de la tesis. Se realizó una segunda inoculación al cabo de 14 días de experimentación con la misma concentración bacteriana. Se utilizó igualmente, una mezcla de GABA, citrato y fructosa (1,25 mM cada uno) como exudados artificiales de raíces de girasol (AREs), que se introdujeron en los embudos en 30 mL de medio MSB modificado (tabla 3.3.) para alcanzar la capacidad de campo de la arena. El medio de cultivo fue modificado para mantener los requerimientos nutricionales de N y el correcto desarrollo por parte de la planta de girasol.



**Tabla 3.4.** Composición del medio MSB modificado. En rojo, aparecen señaladas las modificaciones incluidas en el nuevo método para cumplir con los requerimientos de N de la planta.

Compuesto	Composición (mg/L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340
CaCl <sub>2</sub>	80
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	112
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2,5
FeCl <sub>3</sub>	0,22

Se tomaron periódicamente muestras de los lixiviados de los embudos por duplicado, y se utilizaron submuestras para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que se desarrollaron en placas de agar TSA. También se midieron las concentraciones de <sup>14</sup>C-pireno en las submuestras mediante contador de centelleo.

### 3.7.2. EXPERIMENTO INVERNADERO

#### 3.7.2.1. Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en un invernadero a 23 ± 1 °C utilizando un total de 26 macetas. Las macetas tenían una altura de 18,5 cm y un diámetro máximo y mínimo de 21,5 y 15 cm, respectivamente. La existencia de un orificio en el fondo de cada maceta permitió la recogida de los lixiviados durante el experimento. Cada una de ellas contenía 4,8 kg de arena hasta una altura de 11 cm, y se clasificaron en dos grupos diferentes: las que contenían biocarbón y las que no. En la figura



3.9 se muestra un esquema de la disposición y composición de cada una de las macetas del experimento. Dentro de cada grupo existía un subgrupo formado por macetas con arena cargada con <sup>12</sup>C y <sup>14</sup>C-pireno (un total de 14 macetas etiquetadas con los números de 1-8 y de 15-20) y otro subgrupo, con solo <sup>12</sup>C-pireno (un total de 12 macetas con números de 9-14 y de 21-26). Este último subgrupo se utilizó para las estimaciones que no requerían de pireno marcado radioactivamente (actividad de la deshidrogenasa del suelo -DH- y las mediciones de TOC, carbono orgánico total). En cada subgrupo, a su vez, había 3 tratamientos diferentes, cada uno de ellos realizado por duplicado: macetas inoculadas y planta de girasol (macetas 1-4; 9-10; 15-16; 21-22), macetas no inoculadas y planta de girasol (macetas 5-6; 11-12; 17-18; 23-24) y macetas no inoculadas sin planta (7-8; 13-14; 19-20; 25-26).



**Figura 3.9.** Esquema del diseño experimental llevado a cabo en invernadero. En rojo, aparecen etiquetadas las macetas en las que se añadió <sup>14</sup>C-pireno además del <sup>12</sup>C-pireno. Dentro del cuadro azul, las macetas en las que no se ha añadido ninguna capa de biocarbón.





Antes del empaquetado de la arena en las macetas, se dopó una capa de arena de 500 g con  $^{14}\text{C}$ -pireno que posteriormente se introdujo como capa de arena contaminada en cada maceta individual. Para esta preparación, se añadió 1,5 mL de una solución de acetona que contenía 360.000 dpm de  $^{14}\text{C}$ -pireno y 88 mg  $\text{kg}^{-1}$  de  $^{12}\text{C}$ -pireno en una submuestra de arena de 10 g. Cuando el disolvente se evaporó por completo, esta submuestra se mezcló con 40 g de arena en un vial de cristal. A continuación, esta porción se homogeneizó con el resto de la arena (450 g), agitando manualmente durante 10 min para asegurar la homogenización. En el caso de las macetas sin dopar, la solución de acetona solo contenía  $^{12}\text{C}$ -pireno. La arena contaminada se introdujo como una capa en las macetas a una altura de 7 cm de la superficie superior de la misma. Al principio del experimento, el contenido de agua en cada maceta se ajustó al 100 % de la capacidad de campo de la arena con 1,2 L de agua milli-Q.

La inoculación con *P. putida* G7 se realizó tras 14 días de la introducción de las semillas de girasol en las macetas, una vez hubo un desarrollo considerable de las raíces. Para la preparación de los inóculos, se siguió el método desarrollado para el cultivo de *P. putida* G7 (véase sección 3.3.2) con algunas modificaciones. Los cultivos se desarrollaron en 3 fases distintas para obtener un volumen total de 7 L. Tres cultivos de 100 mL en fase estacionaria temprana se transfirieron a 3 matraces Erlenmeyer (1 L) con 400 mL de medio MSB con salicilato sódico (5 mM), y se incubaron en agitador durante 24h. Los cultivos se dividieron en 7 alícuotas de 200 mL cada una y posteriormente se inocularon en matraces individuales de 2 L con 800 mL de medio, manteniéndose en agitación de nuevo otras 24h hasta alcanzar el inicio de la fase estacionaria. Los cultivos se centrifugaron a 2.570 rpm durante 10 min y el pellet se resuspendió en 100 mL de MSB modificado para dar una concentración de  $5,58 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Se comprobó la estabilidad de la movilidad celular en el medio modificado por microscopía. Cada porción de 100 mL de la suspensión celular en MSB modificado se añadió a 18 de las 26 macetas resultando en una concentración de  $1,43 \times 10^9$  células  $\text{kg}^{-1}$ .



Para mantener la capacidad de retención de agua fueron necesarios 3 riegos por semana: 2 veces por semana con medio MSB modificado para la nutrición de la planta y el mantenimiento de la bacteria (para coincidir con la recogida de lixiviados) y una vez por semana, con agua milli-Q para mantener la humedad del sistema. Se realizó también una segunda inoculación con la estirpe a los 28 días siguiendo la misma metodología de la primera inoculación.

Por su parte, las semillas de girasol se sumergieron en agua del grifo y se agitaron durante 30 min. Para eliminar la protección contra microorganismos, se retiraron inmediatamente las cubiertas vegetales para favorecer la germinación. Se utilizaron 8 semillas desnudas por maceta plantada. Una vez finalizado el periodo de germinación, se mantuvieron 5 plantas por maceta para homogenizar el ensayo. A lo largo del ciclo de desarrollo del girasol, se evaluaron por separado, para cada tratamiento, el porcentaje de germinación de las semillas y la evolución de la floración y longitud del tallo de las plantas.

### 3.7.2.2. Recogida de muestras

Se realizó un muestreo de lixiviados a lo largo del tiempo para determinar la actividad de <sup>14</sup>C-pireno: a tiempo inicial del experimento, después de 2 días, y luego 2 días a la semana hasta el final del ensayo. Los percolados se recogieron por gravedad inmediatamente después de regar a cada tiempo descrito. Las muestras de arena, y en su defecto de planta, se recogieron a tiempo final de experimento (81 días para las macetas con planta y 133 días para las macetas sin planta). Se obtuvieron 5 muestras de arena con una barrena de mano, y se dividieron en 3 submuestras que se homogeneizaron: la superior, correspondiente a los primeros 2,5 cm de profundidad; la intermedia que representaba los siguientes 1,5 cm y la inferior hasta llegar a los 11 cm. En el caso de las macetas con biocarbón, la tercera de las submuestras estaba compuesta por una mezcla de arena con el material adsorbente situado en el fondo de las macetas. En las macetas sin plantar, en las que el experimento continuó durante un periodo de tiempo más largo, los agujeros producidos por el muestreo, se volvieron a rellenar con arena limpia y se localizaron para evitar estos puntos en el muestreo final de



estas macetas. Tanto las muestras de arena como los lixiviados se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis para evitar degradación de las muestras por la actividad microbiana.

Se cosecharon dos plantas completas por macetas marcadas radioactivamente de cada tratamiento, separando cuidadosamente raíz, tallo, hojas, flor y fruto para el procesado por oxidación y peso fresco de cada tejido. También se cosecharon al azar al final del experimento, otras dos plantas por maceta en el caso de los tratamientos sin dopar. Las hojas, tallos, raíces y frutos se lavaron con agua destilada y se calculó el peso fresco de cada una de ellas. Las plantas restantes se procesaron de la misma manera y se almacenaron por separado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. Aunque cada tratamiento estudiado en el experimento de invernadero se realizó por duplicado, los resultados se expresan por separado para cada réplica.

### 3.7.2.3. Extracción y análisis de $^{14}\text{C}$ -pireno

Para determinar la concentración de equivalentes de  $^{14}\text{C}$ -pireno en los lixiviados, se mezcló una alícuota (10 mL) con 10 mL de líquido de centelleo, y se midió la radioactividad con un contador de centelleo. En la medida del pireno radioactivo en las muestras de arena y de plantas de girasol, una submuestra de 1 g en el caso de la arena, o de 0,2 g en el caso de las muestras con planta, se quemaron en un oxidizador (307 Sample Oxidizer, Perkin Elmer, combustión durante 5 minutos con  $\text{O}_2$ ), midiéndose las muestras tras la combustión por centelleo líquido en un contador QUANTULUS 1220 (PerkinElmer) utilizando un líquido de centelleo Permafluor E+ (PerkinElmer). La eficacia de la metodología empleada para medir el  $^{14}\text{C}$  en las muestras de plantas de girasol se midió previamente utilizando plantas de girasol dopadas con  $^{14}\text{C}$ -pireno, obteniéndose una recuperación del 100%.

También se midió la concentración residual de  $^{12}\text{C}$ -pireno en muestras seleccionadas mediante la extracción exhaustiva sólido-líquido utilizando una submuestra de 5 g y una mezcla de 100 mL de acetona/diclorometano (1:1 v/v) con un extractor Soxtherm (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Alemania). Una vez obtenido el extracto, el disolvente orgánico se evaporó con  $\text{N}_2$  y se volvió a disolver en acetonitrilo. A continuación, antes del análisis por HPLC (Posada-



Baquero y col., 2022) , las muestras se filtraron a través de filtros de nailon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

La capacidad máxima para el pireno en los lixiviados, asumiendo el equilibrio instantáneo para alcanzar la solubilidad del pireno en el agua y la adsorción a los componentes de la materia orgánica disuelta (MOD), se calculó siguiendo ensayos previos del grupo (Rolando y col., 2020).

La fracción teórica del pireno disuelto libre en la fase acuosa de las suspensiones bacterianas en el equilibrio ( $f_w$ ) se calculó como:

$$f_w = \frac{1}{1 + [COD] \cdot K_{oc}}$$

Donde  $[COD]$  es la concentración (en  $\text{kg L}^{-1}$ ) de carbono orgánico disuelto (COD) determinada experimentalmente en los lixiviados con un TOC-VC SH auto sampler de Shimadzu Corporation (Tokyo, Japan) después de la filtración a través de papel de filtro Whatman 1 de 11  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Sigma Aldrich, Madrid, España).  $K_{oc}$  es el coeficiente de partición sólido-agua en  $\text{L Kg}^{-1}$ . El valor de  $\log K_{oc}$  del pireno utilizado para esta ecuación fue de 4,7. La capacidad para el pireno en los lixiviados se calculó como la relación entre la solubilidad en agua del pireno y  $f_w$ .

#### 3.7.2.4. Determinaciones microbianas y bioquímicas

Con el fin de confirmar la viabilidad de las células de *P. putida* G7 a lo largo del experimento, se tomaron muestras de arena de macetas no marcadas radioactivamente a tiempo final de experimento de invernadero. Submuestras tomadas a diferentes alturas en la maceta (1 g), se mezclaron en un vórtex con 3 mL de medio MSB y se agitaron durante 30 min a 150 rpm. Después de un tiempo adecuado, se dejó decantar la arena y se sembraron diluciones seriadas del sobrenadante en placas de agar con MSB con cristales de naftaleno. La identificación visual de la estirpe y la movilidad bacteriana se confirmaron con un microscopio invertido de contraste de fase AxioVert.A1 (Zeiss, Alemania). La actividad de la deshidrogenasa (DH) de la arena en las macetas, se determinó mediante la reducción de la sal de tetrazolio cloruro de idonitrotetrazolio (INT) para dar lugar a la formación de idonitrotetrazolio (INTF) (Gong, 1997).



Tras la segunda inoculación (28 días) se realizó un control experimental para establecer la posible percolación de la bacteria a través del riego. Se realizaron determinaciones del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. putida* G7 en muestras de lixiviados procedentes de las macetas plantadas y no plantadas con y sin biocarbón. Se tomó una alícuota de 100 µL del percolado de las dos muestras siguientes tras la inoculación (4 y 7 días) de macetas con <sup>14</sup>C-pireno, se cultivaron en placas de TSA y se incubaron durante 48 h a 30°C.

### 3.7.2.5. Análisis de metabolitos mediante espectrometría de masas

Los análisis de los lixiviados se realizaron en un cromatógrafo líquido de ultra-alto rendimiento (UHPLC) con una bomba binaria Dionex Ultimate RS acoplada a un espectrofotómetro de masas híbrido cuádruplo-Orbitrap QExactive (Thermo Fisher Scientific, EEUU), equipado con una fuente de electroespray (HESI-II) que funciona en modo positivo a 3,5 KV y en modo negativo a -3,2 KV. El análisis por UHPLC se realizó con una columna analítica de fase inversa [Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm)], y tamaño de partícula de 1,7 µm. El flujo utilizado es de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. La separación cromatográfica se realizó utilizando un gradiente binario de agua (A) y metanol (B), ambos con eluyentes de ácido fórmico al 0,15 % (v/v) para favorecer la ionización. El perfil de elución constó de: gradiente isocrático durante 1 minuto al 5 % de B, luego se realizó un gradiente lineal durante 7,5 min hasta alcanzar el 100 % de B, se mantuvo 2 min y finalmente se volvió a las condiciones iniciales, manteniéndose durante 0,5 min. La columna cromatográfica se mantuvo a 40 °C durante todo el análisis. El volumen de inyección fue de 5 µL. Las muestras fueron previamente microfiltradas con filtros de nailon de 0,2 µm. El método de adquisición de espectros de masas QExactive se realizó mediante Método de Adquisición Dependiente de los datos (TOP5). Los archivos de datos adquiridos por UHPLC fueron procesados por el software Compound Discoverer 3.2 para la identificación de metabolitos desconocidos, y el software Tracefinder 5.1 (Thermo Scientific) para conocer los compuestos utilizando la fórmula molecular y la masa exacta.



### 3.7.3. CÁLCULO DE LOS FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN, TRANSLOCACIÓN Y RIESGO

La transferencia y distribución de pireno en los sistemas suelo-planta, se han calculado en función de los factores de bioconcentración (BCFs) y los factores de traslocación (TFs). Estos factores se definen como la relación de las concentraciones químicas en la biomasa de la planta y la solución del suelo, y entre la biomasa de la planta y la biomasa radicular respectivamente (Lin y col., 2006; Yang y Zhu, 2007; Tao y col., 2008; Doucette y col., 2018; González-García y col., 2019; Fernández-López y col., 2021).

Nuestra hipótesis es que cualquier diferencia significativa entre los tratamientos en las tasas de captación o transferencia de pireno por parte de las plantas era un indicio de la captación de metabolitos polares generados por la accesibilidad de la bacteria y el cometabolismo de este PAH en el suelo. Por tanto el BCF para el pireno se calculó utilizando la siguiente ecuación (González-García y col., 2019; Fernández-López y col., 2021) con algunas modificaciones:

$$BCF (L kg^{-1}) = \frac{C_p (mg kg^{-1} \text{ peso seco})}{C_s (mg L^{-1})}$$

Donde  $C_p$  es la concentración de pireno equivalente ( $Pir_{eq}$ ) en la biomasa seca vegetal (raíces, tallo, hojas y frutos), y  $C_s$  son los mg de pireno equivalente ( $Pir_{eq}$ ) por litro de solución de suelo calculados a partir de la siguiente ecuación:

$$C_s = \frac{\Sigma(A_f - A_0 - A_l)}{\Sigma(V_i - V_l)}$$

Donde  $A_0$  es la media de  $Pir_{eq}$  (mg) en las macetas medidas al principio del experimento,  $A_l$  es la media de  $Pir_{eq}$  (mg) en los percolados,  $V_i$  es el volumen de agua regado (mL), y  $V_l$  es el volumen de percolados recogidos (mL).



$A_f$  es el valor medio de  $Pir_{eq}$  (mg) al final del tiempo de experimentación y se calculó teniendo en cuenta los pesos específicos de cada una de las partes de la maceta usando la ecuación siguiente:

$$Af = \Sigma(At + Ac + Ab)x W$$

Donde  $A_t$  es la concentración de  $Pir_{eq}$  (mg  $kg^{-1}$ ) en la parte superior de la maceta multiplicado por el espesor de la capa superior.  $A_c$  es la concentración de  $Pir_{eq}$  (mg  $kg^{-1}$ ) en la parte central multiplicada por el espesor de la capa central y  $A_b$  lo correspondiente a la capa inferior de las macetas.  $W$  es el peso total de la arena en cada maceta (kg).

El factor de traslocación (TF) se calculó para evaluar la transferencia de la masa de pireno de las raíces a las distintas partes de los tejidos vegetales: hojas, tallo y fruto. La TF se calculó como la relación entre la masa de pireno en los distintos tejidos vegetales y las raíces:

$$TF = \frac{C_{plant}}{C_r}$$

Donde  $C_{plant}$  es la masa de  $Pir_{eq}$  (mg) por kg de peso seco de tallos, raíces y frutos, y  $C_r$  es la masa de  $Pir_{eq}$  (mg) por kg de peso seco de las raíces.

La evaluación de los riesgos del pireno asociados a los lixiviados en la salud humana (HQ), también se supone un parámetro de vital importancia. Muchos de los percolados son capaces de atravesar capas profundas del suelo, alcanzando reservorios de agua en forma de acuífero, algunos de ellos, utilizados para el consumo y actividades humanas. La ingestión es una de las vías de exposición más comunes. En este estudio, se evalúa la exposición del pireno en dos grupos de edad: adultos (18-65 años) y niños (3-10 años). Para determinar el riesgo, se estimó el valor de HQ como la relación entre la ingesta diaria y la dosis oral de referencia umbral establecida para los distintos tóxicos (0,03 mg/Kg para el caso del pireno)(USEPA-IRIS, 1990) mediante la siguiente ecuación:

$$HQ = \frac{C_w \times IR \times ABSg \times EF \times ED}{RfDi \times BW \times AT}$$



Donde  $C_w$  es la media de la concentración de equivalentes de pireno (PIReq) en las muestras de lixiviados (mg/L), IR es la tasa de ingestión de agua (2 y 0,64 L/día para adultos y niños respectivamente)(Division y col., 2004); ABSg es la fracción de contaminante absorbida por el tracto gastrointestinal (adimensional). Para compuestos orgánicos ABSg se asume que tener que ser entre 1 y 100% de absorción (Division y col., 2004); EF es la frecuencia de exposición (días/años); ED es la duración de la exposición (años); RfD es la dosis alimentaria de referencia para el pireno (mg/Kg día); BW es el peso corporal medio (kg) y AT es el tiempo medio (ED x 365 días/año). Los valores de HQ iguales o inferiores a 1 indican un menor riesgo.

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**





## 4. RESULTADOS

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**

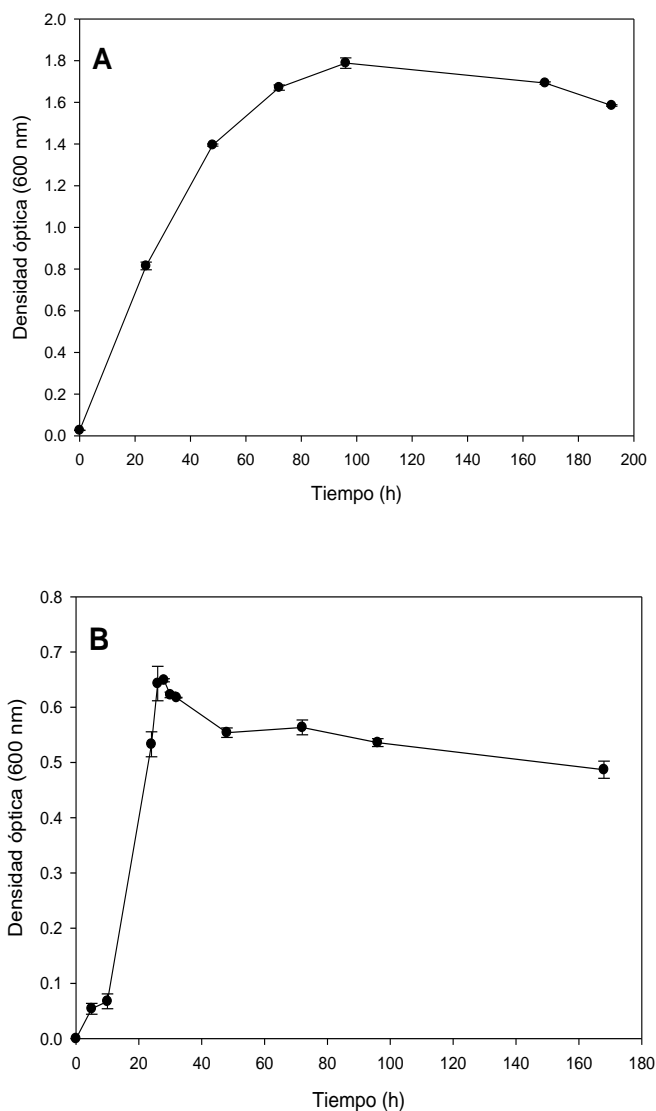


#### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTIRPES EMPLEADAS. CRECIMIENTO DE *P. fluorescens* LP6a y *P. putida* G7

Para inducir la actividad degradadora de la estirpe *Pseudomonas fluorescens* LP6a en los experimentos, la fuente de carbono empleada para su crecimiento fue naftaleno. Como se muestra en la curva de crecimiento (figura 4.1.A), durante las primeras 96 h la bacteria presentó un aumento exponencial en la densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) hasta valores de 1,7, a partir del cual se recogieron las células en fase estacionaria temprana para los experimentos de transporte y biodegradación. La tasa de duplicación de la estirpe fue de 12,84 h ( $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ ).

Para el crecimiento de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en medio basal salino (MSB) (dimensiones celulares, excluyendo flagelos:  $2,06 \pm 0,06 \mu\text{m} \times 1,12 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ), se utilizó salicilato sódico (5 mM) como fuente de carbono, dado que es un intermediario en la ruta de degradación de naftaleno (Yen y Gunsalus, 1985). Los valores máximos de densidad óptica (0,6 - 0,7 a  $DO_{600nm}$ ) se observaron a las 28 h, utilizando la bacteria para los experimentos en el inicio de la fase estacionaria temprana (30 h) (figura 4.1.B). En este punto, se aseguraba una movilidad bacteriana estable (controlada mediante microscopía), la cual era necesaria para los ensayos de respuesta táctica. Esta movilidad se caracterizó por un movimiento “smooth”, diferenciado del movimiento más caótico observado durante la fase exponencial temprana, cuando la movilidad no era estable a lo largo del tiempo. La tasa de duplicación fue de 4,83 ( $\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$ ).





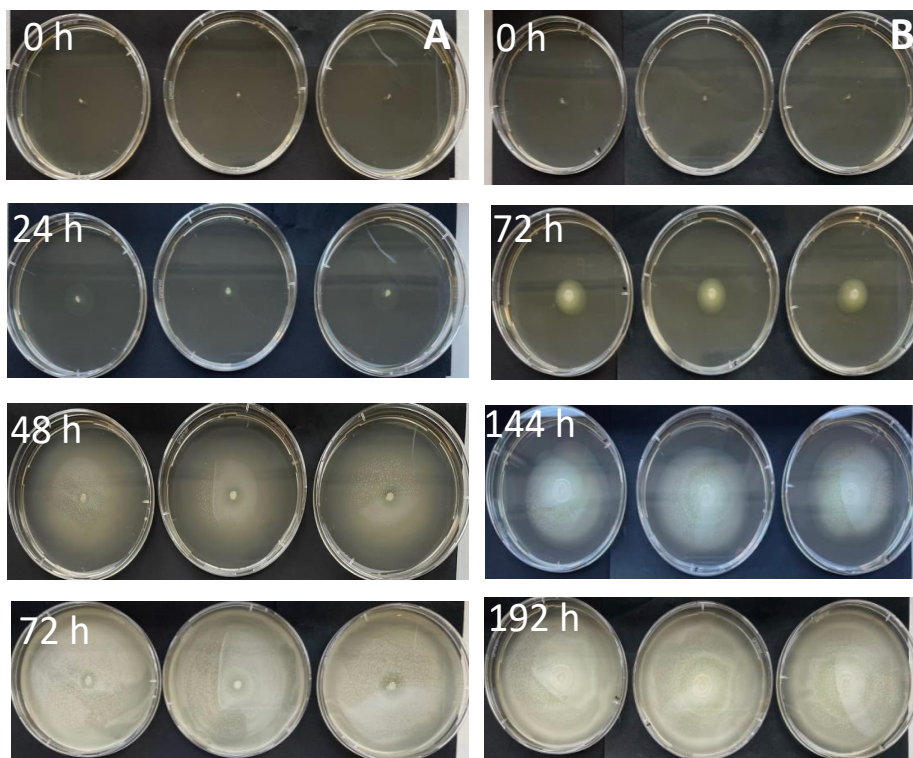
**Figura 4.1.** Crecimiento de las estirpes empleadas. (A) Curva de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* LP6a en medio mineral (MM) suplementado con naftaleno ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ) y de *Pseudomonas putida* G7 en medio MBS suplementado con salicilato sódico ( $5 \text{ mM}$ ) (B).



## 4.2. MOVILIZACIÓN DE CONTAMINANTES MEDIANTE ELECTROCINÉTICA. BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO POR *P. fluorescens* LP6a

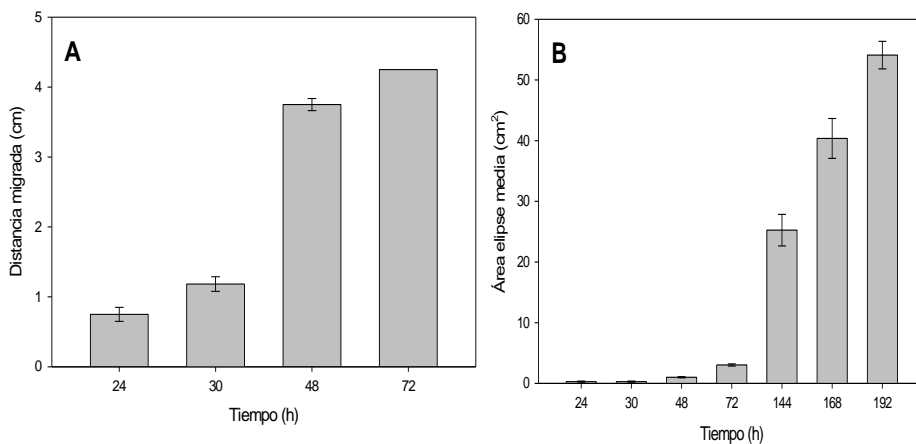
### 4.2.1. TEST DE MOVILIDAD

Los resultados de los ensayos de movilidad bacteriana mediante “swimming” y “swarming” confirmaron la ausencia de movilidad activa de esta estirpe en medio semisólido (figura 4.2). El cálculo de la distancia migrada (para “swimming”) o de las áreas de los halos de crecimiento en medio rico (para “swarming”), mostraron periodos de colonización celular de las placas no menores de 72 h y 192 h respectivamente (figura 4.3), excluyendo la movilidad mediante flagelos (Calvio y col., 2005).



**Figura 4.2.** Seguimiento de la movilidad bacteriana de *P. fluorescens* LP6a en ensayos de “swimming” (A) y “swarming” (B).





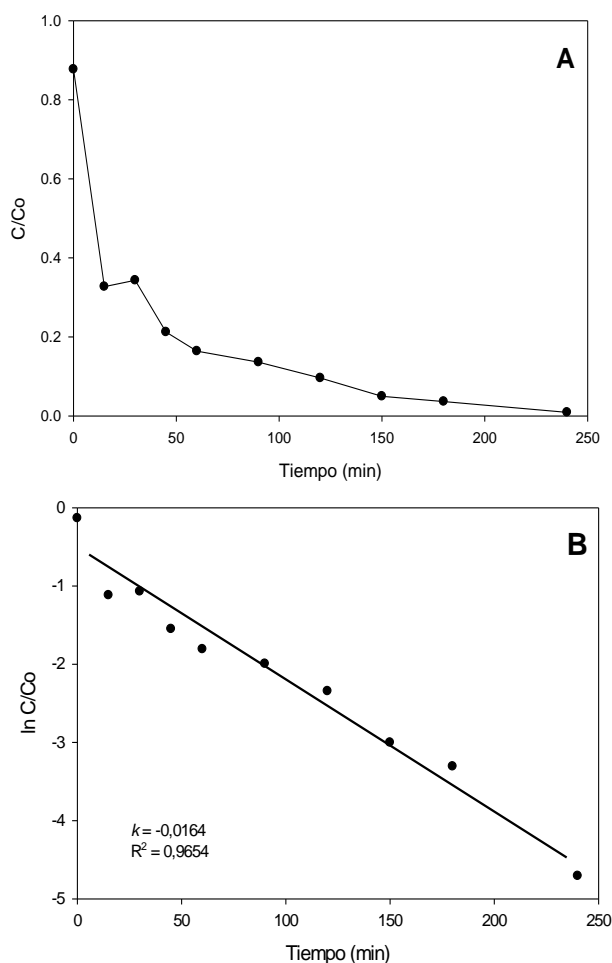
**Figura 4.3.** Evolución de la colonización de placas con medio rico, en ensayos de movilidad de “swimming” (A) y “swarming” (B). Los ensayos con *P. fluorescens* LP6a se realizaron por triplicado.

#### 4.2.2. BIODEGRADACIÓN

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo en matraces en los que se añadió naftaleno totalmente disuelto en tampón fosfato (véase punto 3.5.2.). De forma paralela, varios de los matraces se mantuvieron en condiciones abióticas como control. Aunque la concentración inicial antes del procesado de la muestras mediante centrifugación fue de 12 mg L<sup>-1</sup>, debido a las inevitables pérdidas producidas por la elevada volatilidad del compuesto, se calculó que el porcentaje de pérdida tras centrifugar las muestras fue de aproximadamente un 25 %, alcanzándose concentraciones iniciales reales entre 9 y 10 mg L<sup>-1</sup>. Pueden observarse en la figura 4.4.A, los valores de C/Co calculados como la relación entre la concentración del compuesto en ausencia de bacterias a cada tiempo experimental y la biodegradación de naftaleno por la estirpe LP6a. La adición de bacteria a los matraces probablemente produjo la absorción del compuesto a las células al inicio del experimento, lo que provocó una pequeña diferencia en las concentraciones iniciales del compuesto (C/Co =0,88).



La actividad microbiana provocó una rápida disminución de las concentraciones del contaminante, con porcentajes de biodegradación cercanos al 80 % a los 60 min hasta su total desaparición a los 240 min. El valor de la constante de degradación de primer orden fue  $k_{bio} = 0,016 \text{ h}^{-1}$  (figura 4.4.B). Se concluye, a partir de la cinética de primer orden observada, que estas concentraciones de naftaleno se encontraban por debajo de la  $K_m$  del organismo, lo cual da lugar a cambios directos en la velocidad de biodegradación frente a la variación de la concentración de exposición (Véase sección 1.6.).



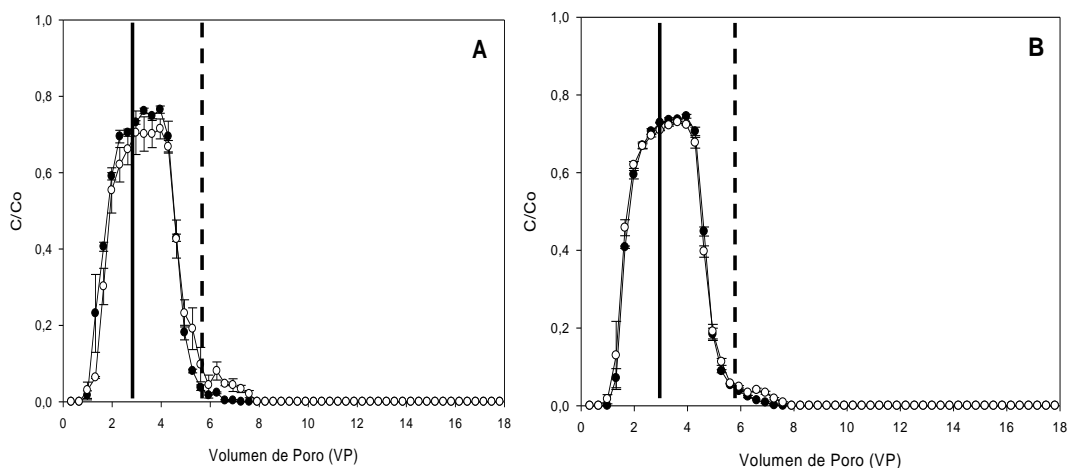
**Figura 4.4.** Ensayo de biodegradación con *P. fluorescens* LP6a. (A) Curva de biodegradación de naftaleno por la estirpe *Pseudomonas fluorescens* LP6a en medio tampón fosfato. (B) Cálculo de la constante de biodegradación ( $k_{bio}$ ) de naftaleno. Los experimentos se hicieron por triplicado.



#### 4.2.3. DEPOSICIÓN BACTERIANA EN COLUMNAS ELECTROQUÍMICAS

Se estudió el efecto de una corriente continua (DC) en la deposición bacteriana a través de columnas electroquímicas, que fueron empaquetadas con bolas de vidrio, a modo de material poroso, y a través de las que se bombeó tampón fosfato (100 mM). Puesto que el objetivo del estudio era conseguir un transporte controlado en las columnas y favorecer la deposición celular en el sistema de estudio, se utilizó un campo eléctrico de baja intensidad ( $1 \text{ V cm}^{-1}$ ) según resultados obtenidos en ensayos previos (Qin y col., 2015). Tal y como se muestra en la figura 4.5, se identificaron 3 fases bien diferenciadas dentro del experimento. Durante los 3 primeros volúmenes de poro (VP), se registró un aumento constante de la densidad óptica en los efluentes de las columnas para ambas concentraciones celulares, como consecuencia del flujo constante de células a través del influente. Una vez se aplicó la solución buffer comenzó a descender el número de células, reflejando la salida de aquellas células bacterianas que no habían quedado adheridas a las bolas de cristal. En ambas concentraciones celulares (figura 4.5.A y 4.5.B), los valores de densidad óptica mostraron patrones muy similares, no encontrándose diferencias significativas. En la tercera fase, tras alcanzarse valores de  $C/Co$  por debajo de 0,05 (aproximadamente a 6 VP), se aplicó un campo eléctrico de baja intensidad a las columnas de estudio, mateniendo las columnas control en las mismas condiciones pero sin corriente eléctrica. En este punto se produjo un ligero aumento del transporte bacteriano como consecuencia del voltaje aplicado, que se mantuvo durante 2 VP (hasta los 8 VP) y a partir de lo cual, no se detectó concentración celular en los efluentes hasta el final del experimento (18 VP). Este transporte pareció ser más significativo en las columnas en las que se aplicó electricidad a una densidad óptica de influente de 0,1 (figura 4.5.A).





**Figura 4.5.** Ensayo de transporte con *P. fluorescens LP6a* en columnas electroquímicas a las diferentes concentraciones celulares en el influente: 0,1 DO<sub>600</sub> (A) y 0,3 DO<sub>600</sub> (B). La línea de puntos negros representa el control donde no se aplicó una corriente eléctrica (DC), mientras que la línea de puntos blancos, representa las columnas en las que se hizo pasar una corriente eléctrica (1 V cm<sup>-1</sup>). Las distintas fases del experimento aparecen separadas por distintas líneas: no DC + bacteria (0-3VP, —) no DC + buffer (3-6VP, - -) y DC + buffer (6-18VP). Los experimentos se realizaron por duplicado.

En líneas generales, si comparamos los datos de porcentajes medios de células adheridas al material de las columnas (21,90 % para 0,1 OD<sub>600nm</sub> frente a 22,14 % para 0,3 OD<sub>600nm</sub>), no parece haber diferencias significativas en cuanto a la concentración de entrada de células empleadas ni a la aplicación o no de una corriente eléctrica (20,87 y 22,65 % para los controles y 22,93 y 21,94 % para columnas con campos eléctricos, para 0,1 y 0,3 OD<sub>600nm</sub>, respectivamente). Aún así, se tomó la decisión de utilizar la concentración celular más alta en los influentes, de tal forma que se mantuviera un número de células bacterianas suficiente en las columnas para producir un efecto en la biodegradación de naftaleno.





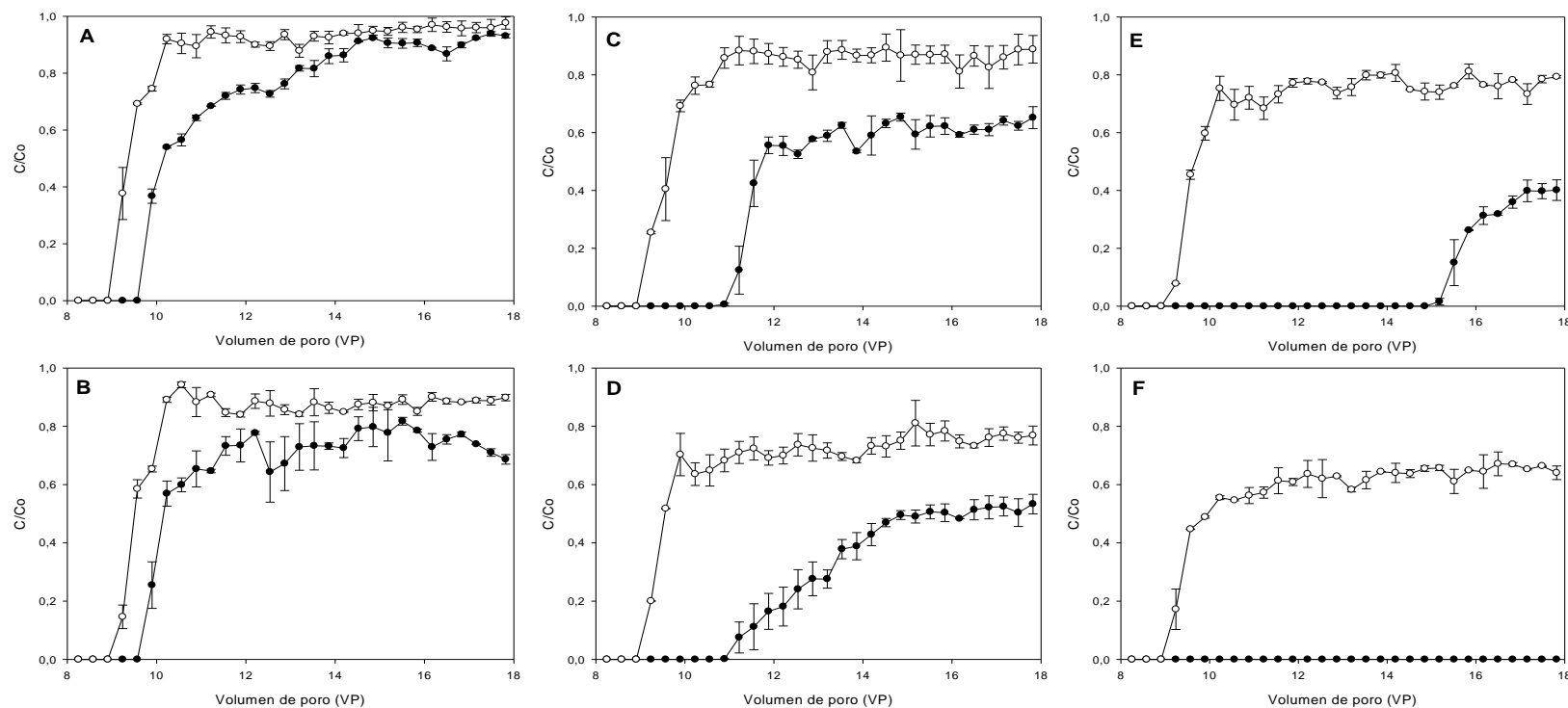
#### 4.2.4. ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN EN COLUMNAS

Una vez estudiado el transporte de la bacteria en las columnas electroquímicas y su deposición controlada, se realizaron ensayos de biodegradación utilizando naftaleno como fuente contaminante. El objetivo de estos ensayos se determinó en función del análisis de la electroósmosis como proceso de biorremediación. Este fenómeno se basa en una mayor interacción de las células (con carga iónica parcial) con el contaminante, de tal forma que la hipótesis del estudio sería que el naftaleno migraría, por la acción del campo eléctrico, hacia las partículas cargadas (bolas de cristal como sustrato) donde se encuentran adheridas las células, produciendo una mayor biodegradación (Kirby y Hasselbrink Jr., 2004; Masliyah y Bhattacharjee, 2006; Shan y col., 2018).

##### 4.2.4.1. Efecto de la concentración de naftaleno

Para ello, siguiendo el modelo experimental de los ensayos de transporte, se añadió una cuarta fase al proceso donde a partir de 8 VP, se bombeó una solución de naftaleno a distintas concentraciones [figura 4.6:  $20,7 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$  (A y B),  $14,5 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$  (C y D) y  $7,3 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  (E y F)] a las columnas. Durante 10 VP (hasta los 18 VP) se tomaron muestras de los efluentes de las columnas con y sin carga eléctrica. Paralelamente, se llevaron a cabo ensayos en condiciones abióticas para determinar las concentraciones del contaminante en los efluentes de las columnas (figura 4.6, línea de puntos blanca). Como se muestra en la figura 4.6, los valores de  $C/Co$ , entendidos como la relación de la concentración de naftaleno que entra en las columnas y la que sale por los efluentes, fueron menores para todas las concentraciones empleadas en comparación con los ensayos abióticos. Además, estas diferencias se hicieron más significativas conforme disminuía la concentración del contaminante en el efluente, dándose la máxima biodegradación a concentración de naftaleno de  $7,3 \text{ mg L}^{-1}$ . Además, dentro de cada una de las concentraciones empleadas, también existieron diferencias entre las columnas donde se aplicó un campo eléctrico comparándolas con las columnas control, sugiriendo un efecto directo de la aplicación del campo eléctrico y la concentración del contaminante en la biodegradación.



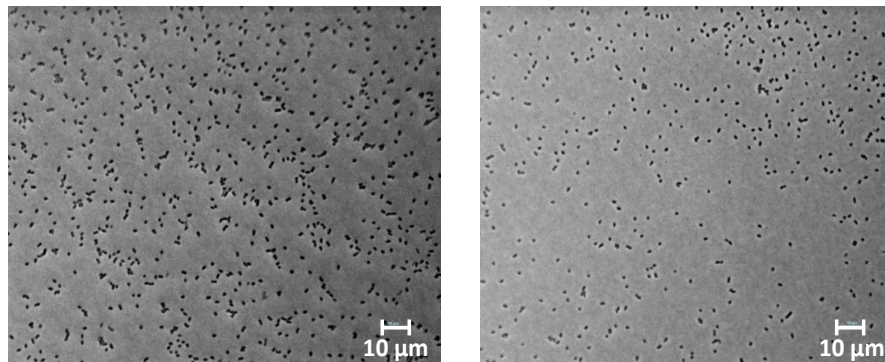


**Figura 4.6.** Biodegradación de naftaleno por la estirpe *P. fluorescens* LP6a en columnas electroquímicas. Se realizaron controles abióticos (línea de puntos blancos) y en presencia de la bacteria (línea de puntos negros) aplicando (B, D y F) o no (A, C y E) un campo eléctrico. La adición de una corriente eléctrica provocó una mayor biodegradación a medida que disminuía la concentración inicial de contaminante empleada: 20,7 mg L<sup>-1</sup> (A y B); 14,5 mg L<sup>-1</sup> (C y D) y 7,3 mg L<sup>-1</sup> (E y F). Los ensayos se realizaron por duplicado.



#### 4.2.4.2. Efecto de la inhibición bacteriana

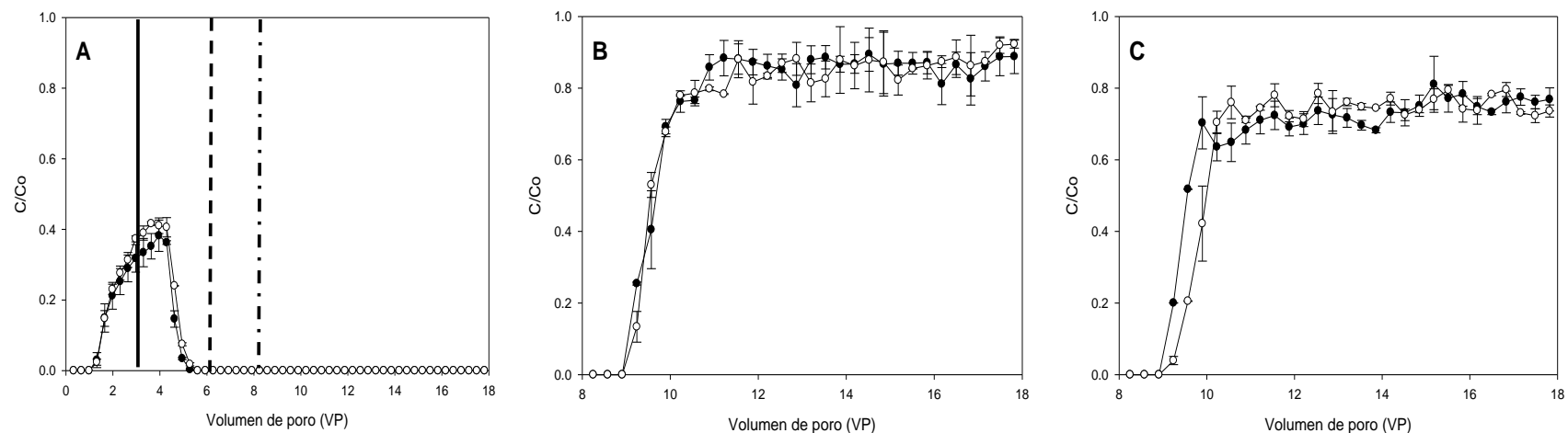
La inhibición celular por tratamiento térmico permitió evaluar la influencia de la actividad degradadora de la estirpe en el proceso, sin producir una alteración de la integridad celular (figura 4.7). Tras la inactivación celular, las tasas de desaparición del compuesto alcanzadas en las columnas registraron valores muy similares a los controles donde no se bombeó inóculo bacteriano (figura 4.8).



**Figura 4.7.** Aspecto al microscopio de la estirpe *P. fluorescens* LP6a en condiciones normales de experimentación (A) y tras tratamiento térmico durante 40 min a 70 °C (B). La bacteria no presenta degradación física tras el tratamiento.

Así, aunque las tasas de adhesión celular al material de vidrio empleado en las columnas electroquímicas fue muy superior al que mostraron los ensayos con células no tratadas (65% frente a 20%), las tasas de biodegradación de naftaleno no fueron significativas. La mayor adhesión sugiere que el tratamiento térmico pudo tener algún efecto sobre la superficie celular que causaba más adhesión al sustrato. No obstante, como se aprecia en la figura 4.8.B y 4.8.C, la relación C/Co permanece más o menos constante a lo largo de todo el experimento, no mostrando diferencias con el control abiótico en presencia de naftaleno. Esto indica la clara influencia clara de la actividad bacteriana sobre los valores de C/Co que se observan en la figura 4.6.





**Figura 4.8.** Ensayo de transporte, adhesión y biodegradación de naftaleno en columnas electroquímicas con células inactivadas térmicamente. En la figura A, se aprecia una elevada adhesión bacteriana a las bolas de vidrio del sistema. Las diferentes líneas representan las fases del experimento descritas anteriormente. La línea de puntos y rayas simbolizan el inicio de la aplicación del contaminante. B (sin corriente eléctrica) y C (con campo eléctrico) representan la relación en las tasas de biodegradación de naftaleno por parte de la estirpe (línea de puntos blancos), comparada con los ensayos en condiciones abióticas a una concentración del contaminante en el influente de  $14.5 \text{ mg L}^{-1}$  (línea de puntos negros)



### 4.3. TAXIS Y MOVILIZACIÓN BACTERIANA. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TÁCTICA Y CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE QUIMIOEFECTORES.

#### 4.3.1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN ENSAYOS CAPILARES

Los resultados obtenidos en los experimentos capilares se clasificaron según la respuesta producida por la bacteria y la sustancia táctica utilizada.

##### 4.3.1.1. Respuesta táctica positiva frente a componentes de exudados de raíces de girasol

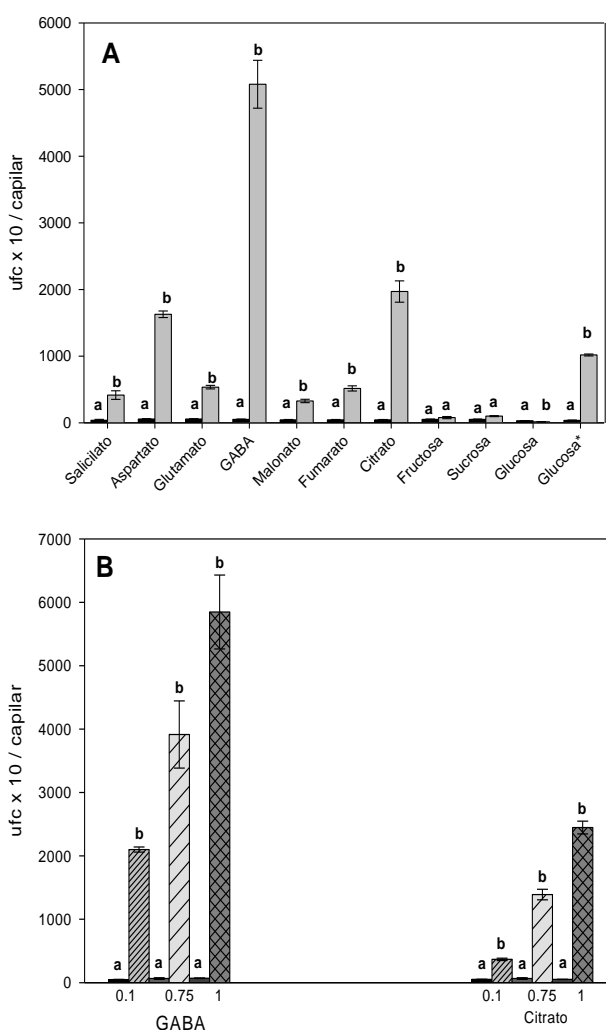
La exposición de *P. putida* G7 a ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares a concentraciones de 10 mM se manifestó con una respuesta táctica diferenciada (figura 4.9.A). GABA y citrato mostraron las respuestas tácticas positivas más significativas de las sustancias estudiadas con valores de índice táctico de 98 y 44, respectivamente. El salicilato, así como otros compuestos como el aspartato, el glutamato y el fumarato, mostraron respuestas positivas moderadas. Estos datos concuerdan con los ya descritos en otros estudios, donde se analizó la respuesta diferencial entre aminoácidos y azúcares incluyendo bacterias gram-negativas (Adler, 1973; Moulton y Montie, 1979; Bowra y Dilworth, 1981). También se evaluaron otras concentraciones para los compuestos con una mayor respuesta táctica positiva: 0,1 mM, 0,75 mM y 1 mM para GABA y 0,1 mM y 1 mM en el caso del citrato, presentando todas ellas diferencias significativas con el control (los capilares solo contenían medio MSB en su interior) (figura 4.9.B).

##### 4.3.1.2. Efecto de la hipermovilidad por glucosa

La glucosa mostró patrones diferenciados según actuaba como quimioatrayente o quimiorepelente. Según las observaciones anteriores llevadas a cabo en el grupo, la glucosa podría ser un inductor de la hipermovilidad en *P. putida* G7. Esto supone que, en presencia del compuesto, el movimiento de la bacteria se caracteriza por una alta frecuencia de aceleraciones, alta velocidad de natación y alta tortuosidad



(Jimenez-Sanchez y col., 2012). Nuestro objetivo fue caracterizar esta movilidad diferenciada y compararla con otros efectores químicos para su posterior utilización en los ensayos de transporte de esta tesis. Los resultados obtenidos (10 mM) mostraron una fuerte respuesta celular en ensayos de quimiorepelencia que afianzan la hipótesis de la inducción de la hipermovilidad, haciendo que la células entren en los capilares a unas tasas mayor que en el caso de los ensayos de atracción (figura 4.9.A). Para los ensayos de atracción con glucosa, los resultados no fueron muy significativos comparados con los obtenidos para el resto de sustancias quimiotacticas empleadas.

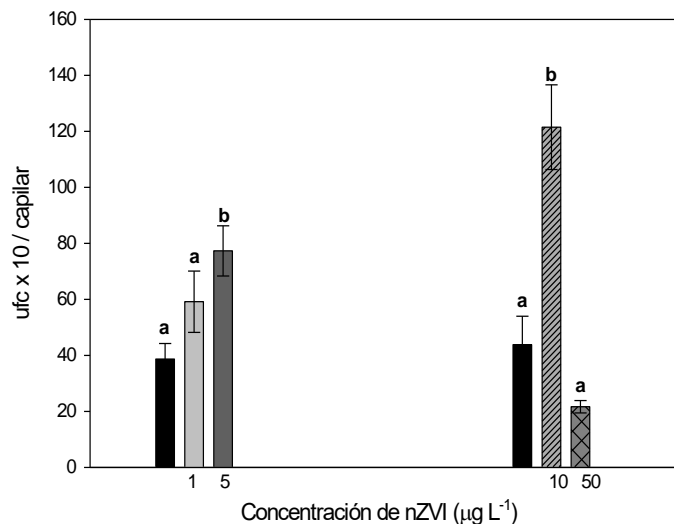


**Figura 4.9.** Ensayos capilares de *Pseudomonas putida* G7 frente a distintos quimioefectores a concentraciones de 10 mM (A) y 0,1, 0,75 y 1 mM (B). Las barras negras en A y B representan el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por capilar sin la adición de ningún quimioefector como control. Las barras grises indican las ufc detectadas en presencia del quimioefector. La glucosa se probó como atrayente y como quimiorepelente (glucosa\*, véase texto). Las barras de error indican la desviación estándar de la media (n = 6). Para cada quimioefector y su respectivo control, los valores marcados con la misma letra no son significativamente diferentes (P ≤ 0,05).



#### 4.3.1.3. Respuesta de repelencia a nanopartículas de Fe (nZVIs)

El efecto causado por nZVIs se hizo evidente en la mayoría de las concentraciones del compuesto empleadas (figura 4.10). A concentraciones 1, 5 y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  el número de células por capilar fue superior al control donde no se añadió nanopartículas, siendo más significativas estas diferencias para 5 y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Tras la exposición a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  se detectó un menor número de células que en los capilares control, lo que probablemente se debió a una reducción de la movilidad celular causada por nZVIs. Estos resultados concuerdan con las observaciones ya descritas en estudios anteriores, donde se mostraron pérdidas de la viabilidad celular tras la exposición de esta estirpe a concentraciones de nZVIs de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  y superiores (Auffan y col., 2008).



**Figura 4.10.** Ensayos capilares de repelencia para *P. putida* G7. Se muestran dos ensayos de quimiorepelencia con diferentes concentraciones de nanopartículas de Fe (nZVIs). Las barras de error indican la desviación estándar de la media ( $n = 6$ ). Para cada quimioefector (barras grises) y su respectivo control (barras negras), los valores marcados con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ).

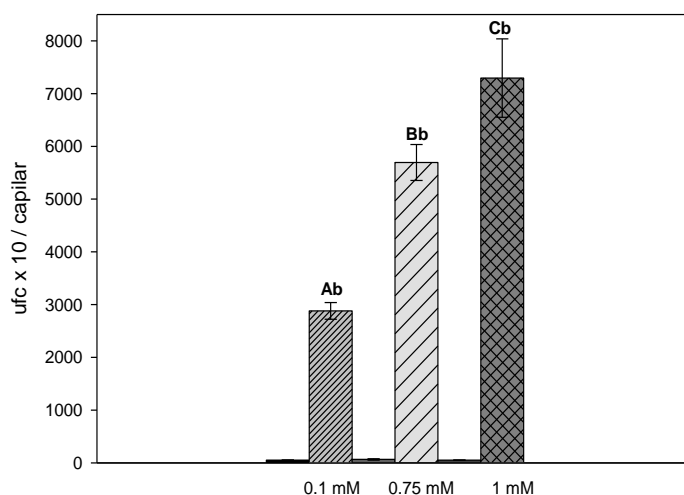


#### 4.3.1.4. Exudados de raíces artificiales (AREs) en la respuesta táctica

El empleo de una mezcla de exudados artificiales de raíces (“artificial root exudates”, AREs) tenía por objetivo evaluar la hipótesis de que la acción combinada de las sustancias con una mayor respuesta táctica positiva podría producir un aumento en la movilización de la estirpe en comparación con las sustancias empleadas a modo individual. La combinación de las sustancias empleadas representaba los 3 grupos principales de moléculas en los exudados vegetales, que presentaron una mayor respuesta táctica: aminoácidos (GABA), ácidos orgánicos (citrato) y azúcares (fructosa, por encontrarse en mayor proporciones en los exudados de girasol y las escasas diferencias en los valores de taxis positiva con respecto a la glucosa). Los resultados mostraron una respuesta táctica significativa para todas las concentraciones de AREs estudiadas (0,1 mM, 0,75 mM y 1 mM de cada una de las sustancias) en comparación a los ensayos controles (figura 4.11). Si comparamos los resultados obtenidos con los valores de respuesta táctica detectados para los compuestos empleados de forma individual (véase sección 4.3.1.1), no existió un efecto multiplicador en la respuesta táctica debida al aumento de concentración de la mezcla. En los compuestos como GABA o citrato el conteo de células por capilar tomaron valores de  $5,8 \times 10^4$  ufc/mL y  $2,4 \times 10^4$  ufc/mL respectivamente a 1 mM, mientras que la mezcla de las sustancias unida a la fructosa, alcanzó los  $7,3 \times 10^4$  ufc/mL. Este aumento pareció ser mayor en función de la concentración de los compuestos en la mezcla, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre ellas (ANOVA).







**Figura 4.11.** Respuesta quimiotáctica de atracción (barras grises) de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 frente a diferentes concentraciones (0,1, 0,75 y 1 mM) de una mezcla artificial de exudados (AREs) compuesta por GABA, citrato y fructosa. El control aparece representado por barras negras (no se añadió quimioefector). Las barras marcadas con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes con respecto al control ( $P \leq 0,05$ ). Las barras con la misma letra mayúscula no son significativamente diferente entre concentraciones de AREs ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2. CONTROLES DE CRECIMIENTO CON DISTINTOS QUIMIOEFECTORES

Ante la necesidad de ajustar las condiciones experimentales en cuanto a concentración de los compuestos quimioefectores se hizo indispensable, para detectar una respuesta táctica significativa en la estirpe, que no hubieran interferencias por la utilización de los contaminantes como fuente preferente de carbono. En la tabla 4.1 aparecen las tasas de duplicación de la estirpe para cada uno de los quimioefectores a las distintas concentraciones empleadas. El salicilato sódico no mostró diferencias en el crecimiento a altas concentraciones (10 mM) durante el tiempo de experimentación (8 h). Citrato y GABA por su parte causaron un mayor crecimiento bacteriano para el rango de concentraciones de 0,75 a 10 mM, siendo más evidente a partir de las 4 h de experimentación (tabla 4.1).



Ambas sustancias mantuvieron una relativa estabilización del crecimiento para 0,1 mM con tasas de duplicación de 47,8 h ( $\mu_{\max} = 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) y 30,8 h ( $\mu_{\max} = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ) para GABA y citrato respectivamente. En el caso de AREs se dieron patrones muy similares a los mostrados para GABA y citrato, produciéndose un pequeño incremento del crecimiento a consecuencia de la combinación de varios quimioefectores, siendo más acusado a mayor concentración de quimioefector empleada (tabla 4.1). La glucosa (10 mM) mostró un aumento claro del crecimiento bacteriano a partir de las 2 h de experimentación con tiempos de duplicación de 13,15 h ( $\mu_{\max} = 0,05 \text{ h}^{-1}$ ). Estos resultados garantizaron que las medidas de movilización táctica no estuvieran afectadas por el crecimiento bacteriano.

Tratamiento	Concentración (mM)	Fase de lag (h)	Tasa de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) ( $\text{h}^{-1}$ )	Tiempo de duplicación (h)
salicilato	10	>8	SD <sup>a</sup>	SD <sup>a</sup>
citrato	0,1	6	0,02	30,8
	0,75	4	0,05	12,47
	1	3	0,07	10,07
	10	4	0,08	7,86
GABA	0,1	3	0,01	47,8
	0,75	2	0,03	15,32
	1	2	0,04	14,94
	10	3	0,07	9,25
glucosa	10	2	0,05	13,15
AREs	0,1	2	0,02	31,5
	0,75	2	0,07	10,01
	1	2	0,08	8,54

**Tabla 4.1.** Experimentos de control del crecimiento de *Pseudomonas putida* G7 frente a diferentes quimioefectores utilizados en el estudio. <sup>a</sup>SD, sin determinar. El salicilato no mostró un incremento de la DO durante el periodo de incubación. Los datos se muestran como los valores medios obtenidos de los matraces por duplicado después de 8 h de incubación.



## 4.4. RESPUESTA TÁCTICA Y SU IMPLICACIÓN EN EL TRANSPORTE Y BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE HAPs EN MICROPOROSIDADES. BIORREACTORES DE MEMBRANA

### 4.4.1. TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

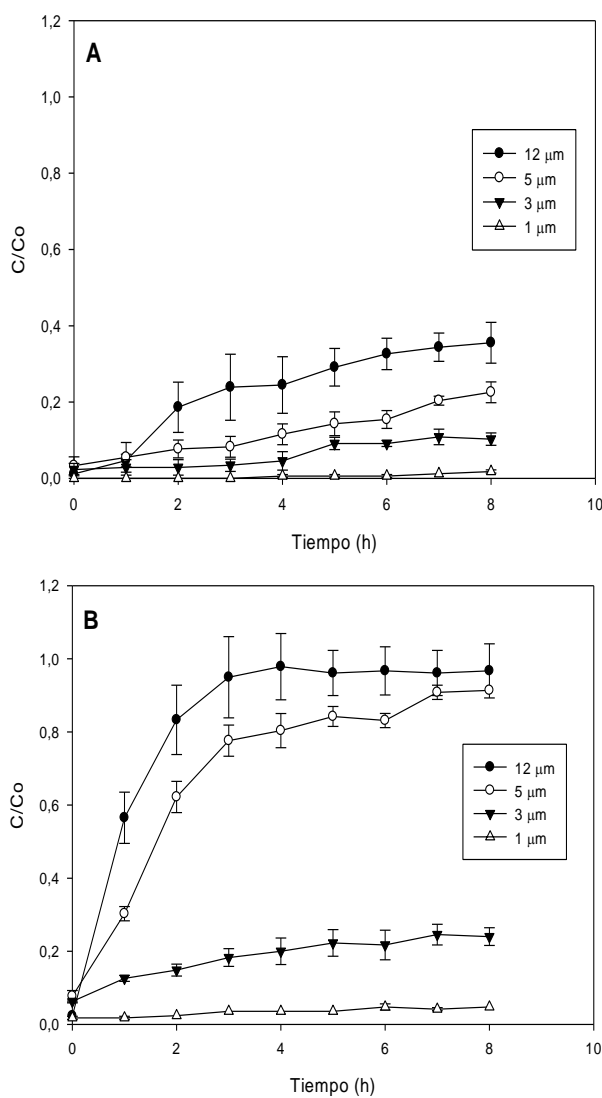
#### 4.4.1.1. Salicilato como quimioefector modelo. Influencia del tamaño de poro en la dispersión bacteriana

El salicilato se utilizó como sustancia quimioefectora modelo en los ensayos de biorreactores (10 mM) con diferentes tamaños de poro de la membrana. En la figura 4.12 se muestra la evolución de la concentración celular, representada como  $C/C_0$  en la cámara superior. En ausencia de quimioefector (figura 4.12.A) el paso de la bacteria a través del filtro se vio restringido (valores de  $C/C_0$  inferiores a 0,5). Este fenómeno se observó incluso para las membranas con un tamaño de poro de 12  $\mu\text{m}$ , disminuyendo progresivamente a medida que disminuía el tamaño de poro. La Figura 4.12.B muestra como la presencia de salicilato en la cámara superior del reactor potenció el transporte bacteriano a través de las membranas de 12  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$ , no mostrándose un efecto claro para 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. En el caso de las membranas de 12  $\mu\text{m}$  se alcanzaron valores de  $C/C_0$  muy cercanos a 1 después de 3 h de exposición al efector químico. Este resultado indica que el salicilato provocó una respuesta celular rápida que se tradujo en un mayor transporte a través de la membrana, produciendo una completa igualación de las concentraciones bacterianas en ambas cámaras del reactor. El valor del coeficiente de difusión ( $D$ ) para los ensayos control a este tamaño de poro (tabla 4.2) fue muy similar al coeficiente de movilidad intrínseco de la bacteria,  $0,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Marx y Aitken, 1999), lo que indicó una escasa interacción celular con la membrana.

Con las membranas de 5  $\mu\text{m}$  también se observó una mejora en el paso de las células a través de la membrana a partir de las 3 h en presencia de salicilato, aunque con valores de  $C/C_0$  menores que en el caso de las membranas de 12  $\mu\text{m}$ .



No obstante, el aumento progresivo de la concentración celular en la cámara superior después de 3 h condujo a una homogeneización casi completa al final del experimento. El paso de las células a través de la membrana, determinado a través del flujo celular y valor de  $D$  (Tabla 4.2), fue diez veces mayor que en el control sin salicilato. Para el de tamaño de poro de 3  $\mu\text{m}$ , se observaron eficiencias de paso significativamente menores en presencia de salicilato ( $C/C_0 = 0,24$  después de 8 h de experimentación). Las membranas de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro eran demasiado restrictivas para permitir que la respuesta táctica se tradujera en un mayor transporte en los biorreactores.



**Figura 4.12.** Influencia de salicilato en biorreactores de membrana determinados por la eficiencia de paso de *Pseudomonas putida* G7 a través de la membrana. Se estudiaron el control sin quimioefector (A) y en presencia de 10 mM de salicilato (B) con membranas de diferentes tamaños de poro, como se indica en cada una de las gráficas. Las barras de error representan la desviación estándar de experimentos por duplicado.



**Tabla 4.2.** Influencia de salicilato (10 mM) en la respuesta táctica de *Pseudomonas putida* G7 en ensayo de biorreactores.

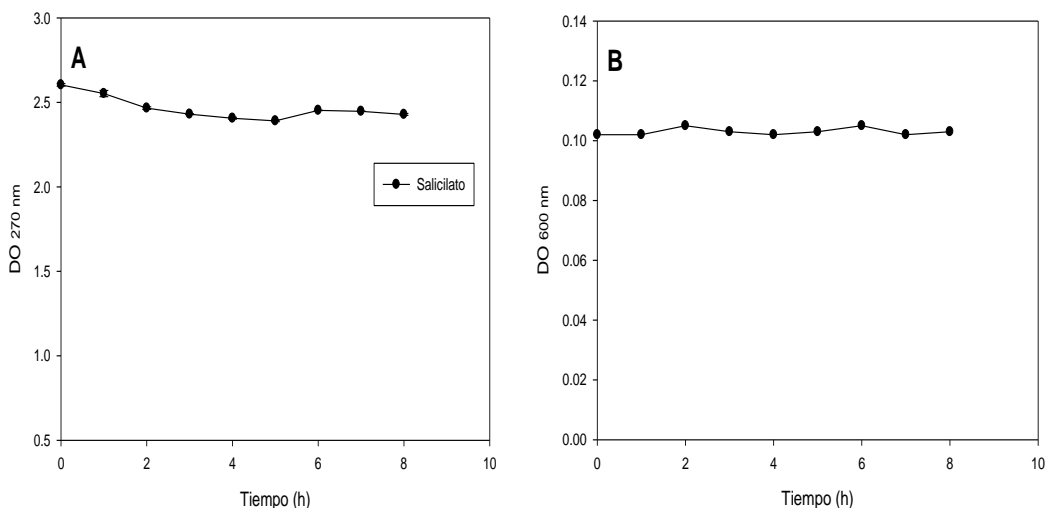
Tratamiento	Tamaño de poro ( $\mu\text{m}$ )	Respuesta táctica	IT <sup>a</sup>	Control			Quimioefector		
				Flujo celular ( $\times 10^8$ células $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	C/Co <sup>b</sup>	D <sup>c</sup> ( $\times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )	Flujo celular ( $\times 10^8$ células $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	C/Co <sup>c</sup>	D <sup>d</sup> ( $\times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )
salicilato	12	Taxis positiva	11	0,93	0,19 (0,35)	0,27	4,35	0,83 (0,97)	5,75
	5			0,20	0,08 (0,22)	0,08	2,51	0,62 (0,91)	1,15
	3			0,02	0,03 (0,10)	0,02	0,31	0,15 (0,24)	0,13
	1			ND <sup>e</sup>	ND (0,01)	0	0,02	0,02 (0,05)	0,01
salicilato + sonicación	5	Ninguna (inmóvil)	N A <sup>d</sup>	0,05	0,04 (0,11)	0,04	0,07	0,06 (0,13)	0,06

<sup>a</sup> IT (Índice táctico) según ensayos capilares. <sup>b</sup> C/Co se da al final del periodo de cálculo del flujo celular. Los valores máximos de C/Co a 8 h se indican en paréntesis.

<sup>c</sup> D, coeficiente de difusión. <sup>d</sup> NA, No aplicable. <sup>e</sup> ND, No detectado.



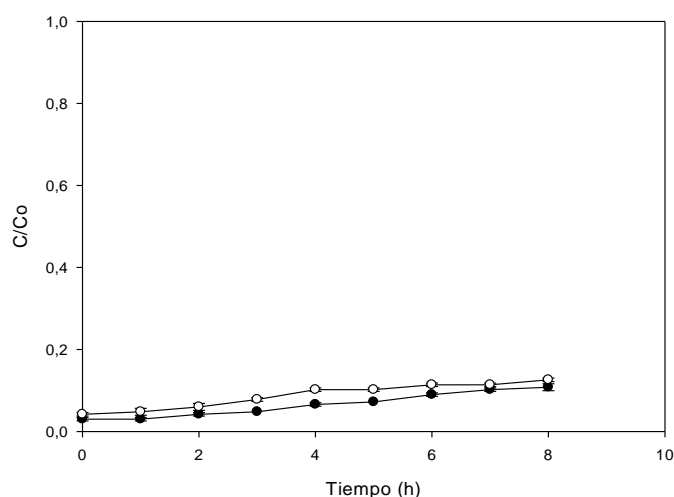
En el ensayo para determinar la formación del gradiente de salicilato a través de la membrana, se observó una disminución lineal de la concentración del compuesto a una velocidad de  $16,8 \mu\text{m mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ , lo que indica una transferencia del salicilato a través de los poros hacia la cámara inferior del biorreactor. Esta disminución lineal del quimioefector se debe, probablemente, a la imposibilidad de asegurar la homogeneización de la cámara inferior en el sistema de estudio. Tampoco se observó adsorción del compuesto (figura 4.13.A) ni adhesión bacteriana (figura 4.13.B) a las membranas de  $5 \mu\text{m}$ .



**Figura 4.13.** Ensayo de adsorción de salicilato (A) y adhesión de la estirpe *P. putida* G7 (B) a membrana de  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de poro empleadas en los biorreactores. Los datos no muestran variaciones en las medidas de la densidad óptica en ambos casos para el tiempo de experimentación (8h). Se muestran los valores medios de los ensayos por duplicado.



La ausencia del aumento en los valores de  $DO_{600nm}$  en los ensayos de crecimiento con salicilato realizados en las mismas condiciones que los experimentos con biorreactores (ver sección 4.3.2., tabla 4.1), permitió descartar el crecimiento celular en presencia de salicilato durante el experimento (8h). También se excluyeron interferencias en el sistema debidas a procesos no relacionados con la movilidad celular tras realizar un ensayo con células inmóviles (mediante sonicación previa). En estas condiciones, los biorreactores equipados con membranas de 5  $\mu m$  de tamaño de poro no mostraron diferencias significativas en el flujo celular con y sin salicilato (tabla 4.2 y figura 4.14).



**Figura 4.14.** Efecto de la sonicación de células de *Pseudomonas putida* G7 en ensayos de biorreactores con membrana de 5  $\mu m$ . En los ensayos control (línea de puntos negros) no se añadió salicilato a la cámara superior, mientras que en la situación experimental (línea de puntos blancos) se añadió el compuesto a una concentración de 10 mM. Las barras de error indican la desviación estándar de los biorreactores por duplicado.

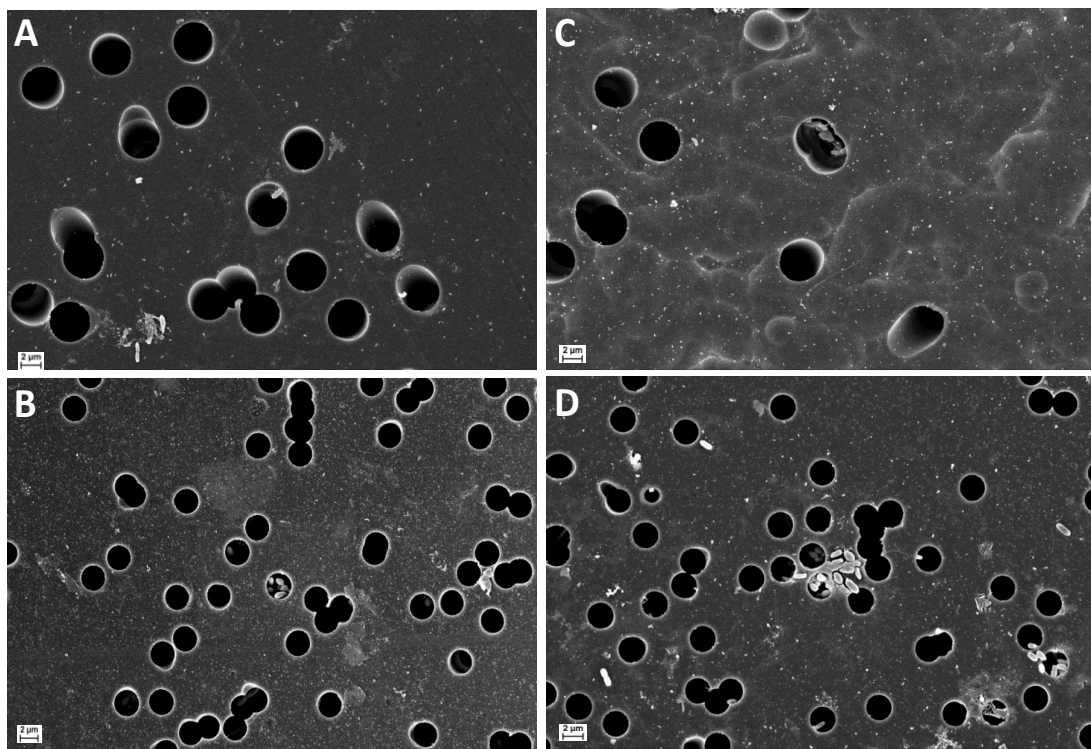


#### **4.4.1.1a. Paso de las células a través de la membrana por microscopía electrónica y láser confocal**

Las imágenes al microscopio electrónico observadas tras finalizar el experimento de biorreactores (8 h) no mostraron un taponamiento de los filtros de 3 y 5  $\mu\text{m}$  en ninguno de los casos, tanto para los biorreactores control como para aquellos en los que se había añadido salicilato. La hipótesis del colapso de los filtros de tamaño intermedio como consecuencia del transporte bacteriano hacia la CS, quedó por tanto descartado. Como puede observarse en la figura 4.15, en las imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido aparecieron algunas células ocupando los poros de la membrana, siendo más evidentes en el caso de los biorreactores donde se añadió el compuesto (figura 4.15.B y 4.15.D). En el control también se observaron algunas células entrando en los poros de la membrana (figura 4.15.A y 4.15.C), aunque en menor porcentaje que los casos anteriores. Pudo deducirse, observando las imágenes, que la gran mayoría de los poros no aparecían ocupados por las bacterias, lo que no impediría un transporte activo de la estirpe hacia la CS. Las imágenes capturadas con el microscopio confocal (figura 4.16) refuerzan la idea planteada anteriormente. En estas fotografías puede observarse, a los laterales, un corte transversal de la membrana en profundidad, donde se muestran los canales de paso para las bacterias en un punto determinado por las líneas verde y roja. En algunas de ellas pudo apreciarse el bloqueo de alguno de los canales de paso (figura 4.16.A y 4.16.D), o el movimiento celular a través de la membrana en las fotografías de corte transversal (figura 4.16.B y 4.16.C). Sin embargo, en todas ellas, la gran mayoría de los canales aparecían libres de células, no existiendo un taponamiento o colapso de los poros.

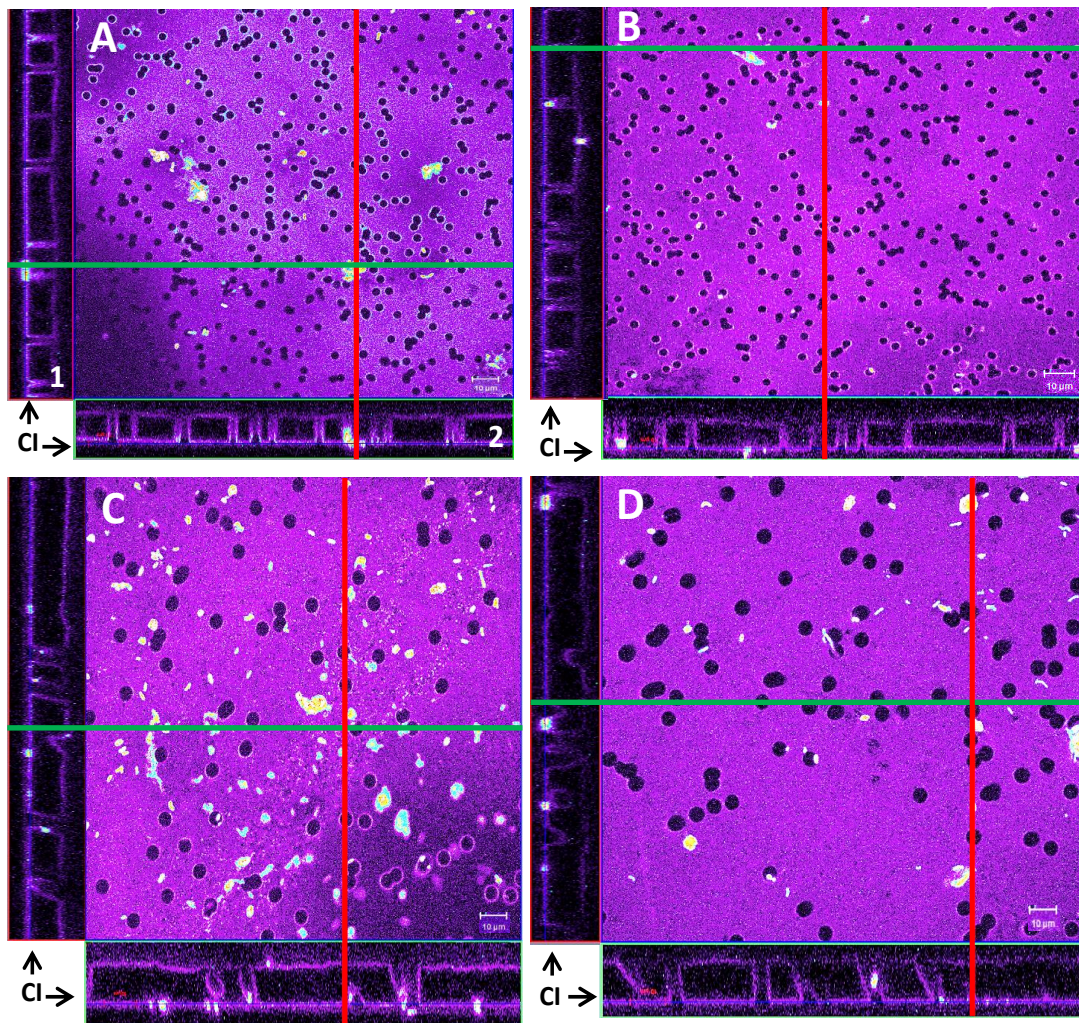






**Figura 4.15.** Imágenes tomadas por un microscopio SEM de muestras de membranas de 3  $\mu\text{m}$  (A y B) y 5  $\mu\text{m}$  (C y D). Se muestran las caras de las membranas expuestas a la suspensión bacteriana en la cámara inferior (C) donde no se añadió ningún quimioefector (A y C) y donde se añadió salicilato a 10 mM (B y D de los ensayos de biorreactores). En ellas puede apreciarse la presencia de la estirpe *P. putida* G7 ocupando algunos de los poros de la membrana.





**Figura 4.16.** Imágenes microscopio confocal (LSCSM) de membranas de 3  $\mu\text{m}$  (A y B) y 5  $\mu\text{m}$  (C y D) de tamaño de poro en ensayos de biorreactores. En B y D se añadió al sistema 10 mM de salicilato. Los poros son visibles como círculos negros o como canales negros individuales que conectan ambas cámaras (1 y 2). Los puntos coloreados indican células bacterianas o agregados. Los rectángulos al lado izquierdo (1) y abajo (2) muestran imágenes de los transectos de las membranas (indicado por una línea roja y verde, respectivamente), estableciendo una relación directa para cada poro individual con las imágenes frontales y laterales. La cara de la membrana expuesta hacia la cámara inferior (CI), está indicada abajo a la izquierda con flechas en 1 y 2. Los paneles 1 y 2 muestran la misma escala que el panel frontal (10  $\mu\text{m}$ ).





#### 4.4.1.2. Efecto de GABA y citrato en el transporte bacteriano a través de la membrana

Tras los ensayos con salicilato como quimioefector modelo, para los experimentos con GABA y citrato se eligió la membrana de 5 µm de tamaño de poro, ya que se observó que con el empleo de esta membrana se producía una mejora significativa del flujo celular en comparación con el control tras la aplicación del quimioefector. Para realizar un análisis comparativo también se estudió la respuesta táctica con la membrana de 3 µm. Las respuestas tácticas positivas tan elevadas detectadas en los ensayos capilares con GABA y citrato permitieron detectar diferentes intensidades en la respuesta de la estirpe, variando las concentraciones de estos efectores químicos en la cámara superior de los biorreactores. Se estudiaron 3 concentraciones diferentes [0,1, 1 y 10 mM] que produjeron una respuesta diferenciada en la eficiencia de paso a través de la membrana en función de los valores de IT, tanto para 5 µm como para 3 µm de tamaño de poro (tabla 4.3). El rango de respuestas tácticas varió desde un IT de 7 con una concentración de citrato de 0,1 mM (muy cercano al IT con 10 mM de salicilato) hasta un IT de 98 con 10 mM de GABA. El elevado poder de atracción celular causado por GABA se evidenció ya a 0,1 mM, donde se detectaron valores de flujo celular muy significativos en comparación con los biorreactores control (figura 4.17). Para las concentraciones de 1 y 10 mM se alcanzaron valores máximos de C/Co superiores a 1, lo que indicó una acumulación celular en la cámara superior como consecuencia de la fuerte respuesta táctica hacia este quimioefector. Sin embargo, la mejora observada en la respuesta fue muy similar a la causada por salicilato a ese tamaño de poro para 5 µm. De hecho, el flujo celular medido para salicilato ( $2,5 \times 10^8$  células  $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) no varió con la presencia de GABA en las 3 concentraciones empleadas al igual que los valores máximos de  $D$ , que fueron en todos los casos, 10 veces superiores a los controles ( $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ).

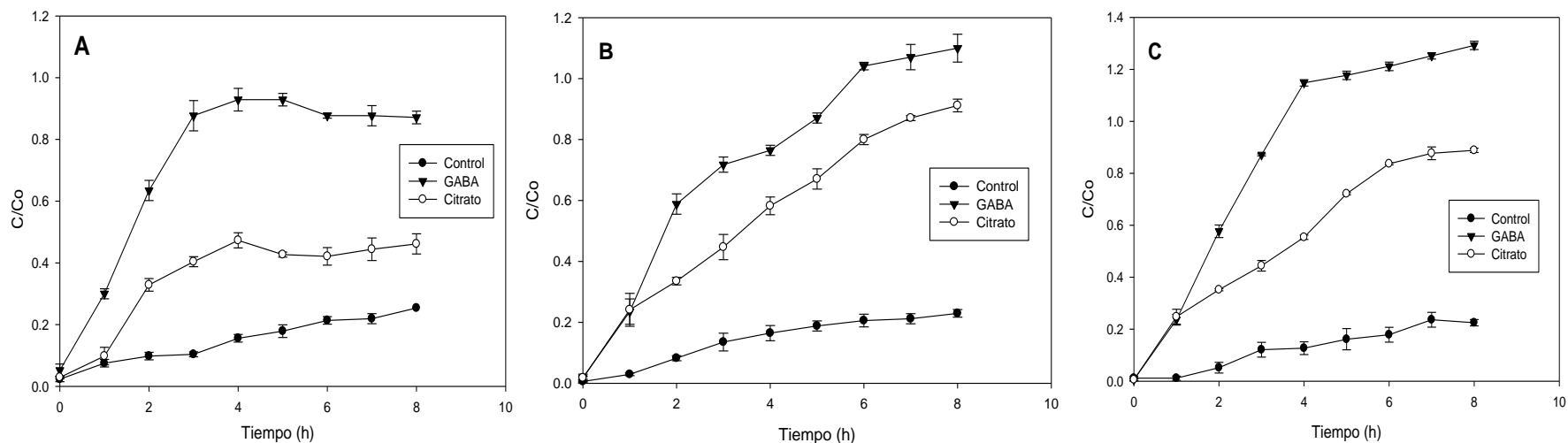


Para las membranas de 3  $\mu\text{m}$  (figura 4.18) observamos valores de flujo y  $D$  de aproximadamente la mitad de los registrados para 5  $\mu\text{m}$ , indicativo de la importante restricción física provocada por este tamaño de poro (tabla 4.4). Aun así, los valores de  $C/\text{Co}$  alcanzados para GABA a 10 mM fueron significativos teniendo en cuenta el tamaño de poro empleado para las primeras horas de experimentación.

En el caso del citrato, el aumento del transporte en las membranas también fue evidente para todas las concentraciones estudiadas, aunque en menor medida que la respuesta provocada por GABA o salicilato (figuras 4.17 y 4.18; tablas 4.3 y 4.4). Como sucedió en el caso anterior, la mayor respuesta observada en los valores de IT no provocó una diferencia en los flujos celulares, cuyos valores se mantuvieron alrededor del 50 % de los datos observados para los efectores químicos estudiados anteriormente. Las diferencias entre los tamaños de poro empleado, 3 y 5  $\mu\text{m}$ , también se hizo evidente. Al igual que sucedió con GABA, los datos más significativos de transporte celular se obtuvieron para las membranas de 5  $\mu\text{m}$  (tabla 4.4).

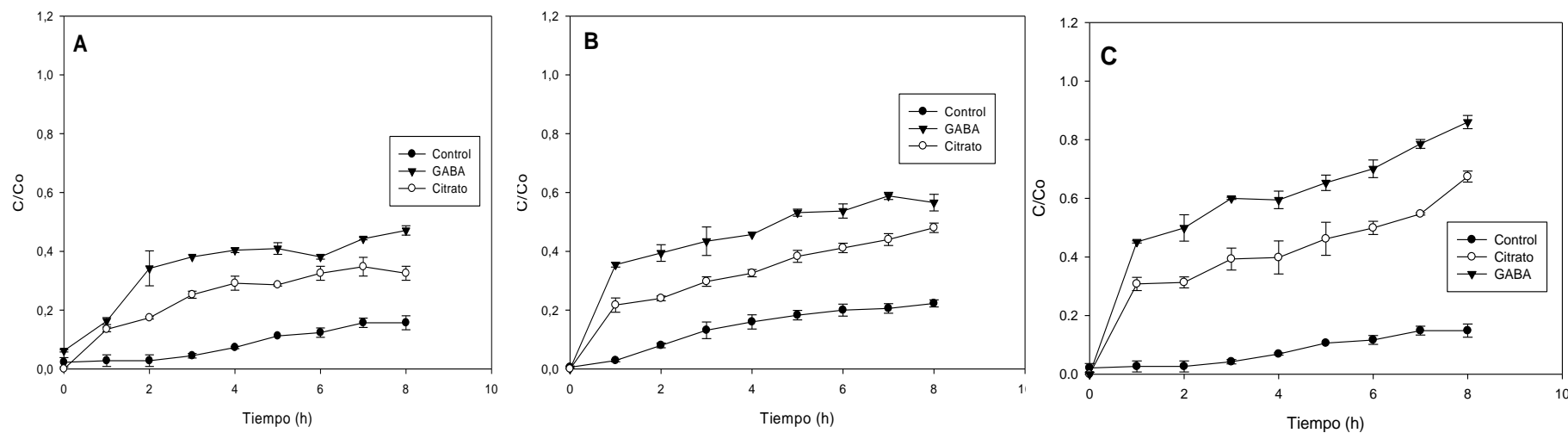
Es importante tener cuenta que, para las mayores concentraciones de efectores químicos empleadas, sobre todo para 10 mM, puede producirse en la cámara superior un crecimiento a corto plazo de las células que han atravesado la membrana debido a la elevada disponibilidad de carbono procedente de los quimioefectores. Por ello, en estos ensayos de transporte y en observaciones directas en el microscopio procedente de la cámara superior con 5  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$ , se vio como para ambos quimioefectores a partir de las 4 horas, aparecían algunas células en división, por lo que optó por la utilización de la menor de las concentraciones para los ensayos de biodegradación.





**Figura 4.17.** Influencia de los quimioefectores en *Pseudomonas putida* G7 en biorreactores según la eficiencia de paso. Se examinaron el citrato y GABA a 0,1 mM (A), 1 mM (B) y 10 mM (C), en biorreactores con membranas de tamaño de poro de 5  $\mu$ m. El control no tenía quimioefector. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos por duplicado.





**Tabla 4.3.** Influencia de citrato y GABA en la respuesta táctica de *Pseudomonas putida* G7 en los ensayos de biorreactores con 5 µm de tamaño de poro.

Tratamiento	Concentración (mM)	IT <sup>a</sup>	Control			Quimioefector		
			Flujo celular (x 10 <sup>8</sup> células cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	C/Co <sup>b</sup>	D <sup>c</sup> (x 10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	Flujo celular (x 10 <sup>8</sup> células cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	C/Co <sup>b</sup>	D <sup>c</sup> (x 10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
citrato	0,1	7	0,46	0,1 (0,25)	0,1	1,32	0,33 (0,46)	0,43
	1	47	0,33	0,08 (0,23)	0,08	1,37	0,33 (0,91)	0,43
	10	44	0,23	0,05 (0,22)	0,05	1,52	0,35 (0,88)	0,46
GABA	0,1	43	0,46	0,1 (0,25)	0,11	2,56	0,63 (0,87)	1,19
	1	84	0,33	0,08 (0,23)	0,08	2,46	0,59 (1,1)	1,04
	10	98	0,23 <sup>d</sup>	0,05 (0,22)	0,05	2,51	0,58 (1,29)	1,01

<sup>a</sup> IT (Índice táctico) según ensayos capilares. <sup>b</sup> C/Co se da al final del periodo de cálculo del flujo celular. Los valores máximos de C/Co a 8 h se indican en paréntesis. <sup>c</sup>

D, coeficiente de difusión. <sup>d</sup> El control fue el mismo que para citrato.



**Tabla 4.4.** Influencia de citrato y GABA en la respuesta táctica de *Pseudomonas putida* G7 en los ensayos de biorreactores con 3 µm de tamaño de poro.

Tratamiento	Concentración (mM)	IT <sup>a</sup>	Control			Quimioefector		
			Flujo celular (x 10 <sup>8</sup> células cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	C/Co <sup>b</sup>	D <sup>c</sup> (x 10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	Flujo celular (x 10 <sup>8</sup> células cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	C/Co <sup>b</sup>	D <sup>c</sup> (x 10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
citrato	0,1	7	0,02	0,03 (0,16)	0,02	0,64	0,17 (0,32)	0,16
	1	47	0,03	0,08 (0,18)	0,06	0,86	0,24 (0,48)	0,23
	10	44	0,02	0,03 (0,14)	0,02	1,01	0,31 (0,67)	0,32
GABA	0,1	43	0,02	0,03 (0,16)	0,02	1,23	0,34 (0,47)	0,36
	1	84	0,03	0,08 (0,18)	0,06	1,42	0,40 (0,57)	0,44
	10	98	0,02 <sup>d</sup>	0,03 (0,14)	0,02	1,73	0,50 (0,86)	0,62

<sup>a</sup> IT (Índice táctico) según ensayos capilares. <sup>b</sup> C/Co se da al final del periodo de cálculo del flujo celular. Los valores máximos de C/Co a 8 h se indican en paréntesis. <sup>c</sup> D, coeficiente de difusión. <sup>d</sup> El control fue el mismo que para citrato.





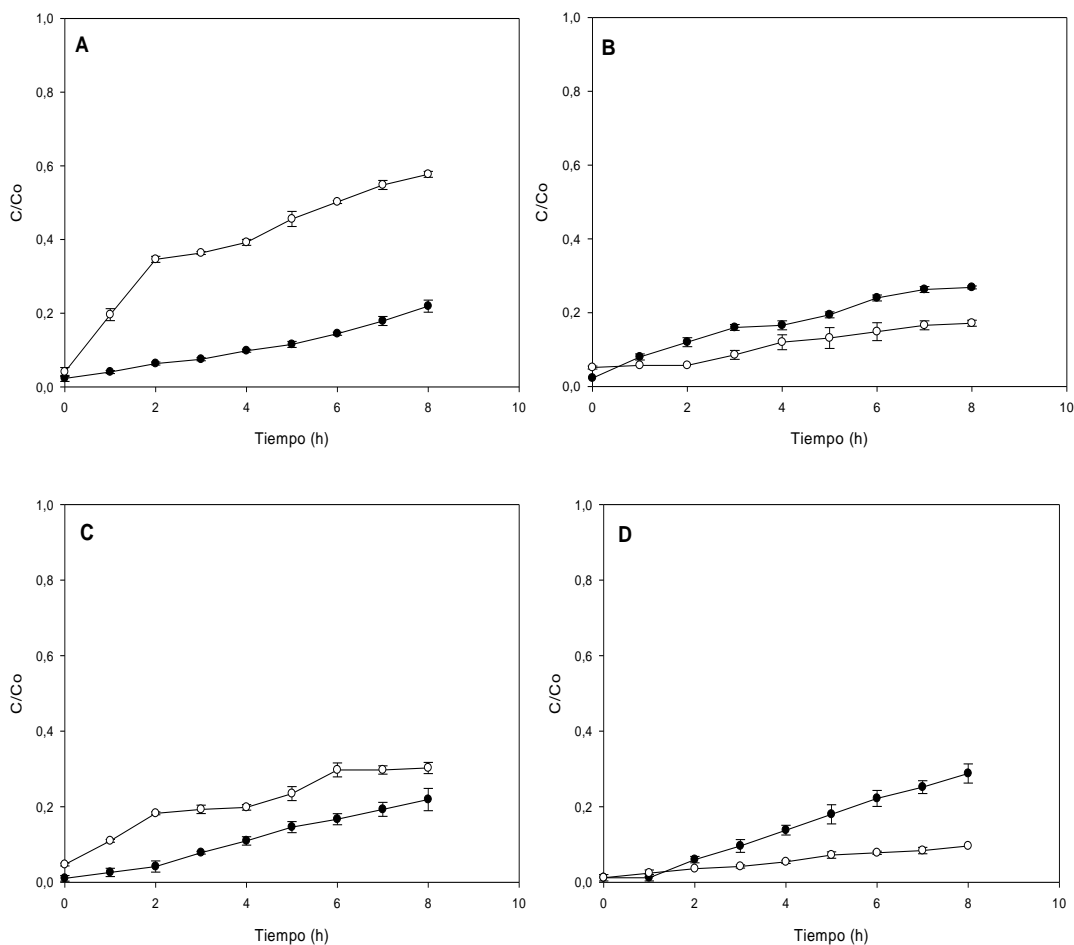
#### 4.4.1.3. Hipermovilidad y glucosa en el transporte a través de la membrana

En la figura 4.19.A y 4.19.B (12  $\mu\text{m}$ ) y en la figura 4.19.C y 4.19.D (5  $\mu\text{m}$ ) se muestran los resultados obtenidos en función de la exposición celular al compuesto: de forma directa al quimioefector en la cámara inferior (figura 4.19.A y 4.19.C) o separado por la membrana, incluyéndose éste en la cámara superior del reactor (figura 4.19.B y 4.19.D). Para ambos tamaños de poro, la presencia de glucosa en la cámara superior tuvo un efecto sobre el transporte de la bacteria, aumentando los flujos celulares en comparación con los controles sin quimioefector, aunque a unas tasas inferiores a los otros quimioefectores estudiados (tabla 4.5). En el caso de la exposición directa de la bacteria a la glucosa en la cámara inferior, las células tuvieron una débil tendencia a atravesar la membrana, obteniendo valores inferiores a los controles para ambos tamaños de poro. Por tanto, el aumento del número de movimientos celulares aleatorios asociados a la hipermovilidad (Jimenez-Sanchez y col., 2012) tuvo un efecto contrario al observado en los experimentos de ensayos capilares, donde las células hiper móviles se dispersaron en mayor medida que en el control, donde se movían de forma espontánea (dando lugar a una IT de 29). Probablemente, este movimiento celular dio lugar a trayectorias más caóticas e irregulares que impidieron a las células encontrar los canales de paso a través de la membrana.

#### 4.4.1.4. Efecto de la repelencia a nanopartículas de Fe (nZVIs)

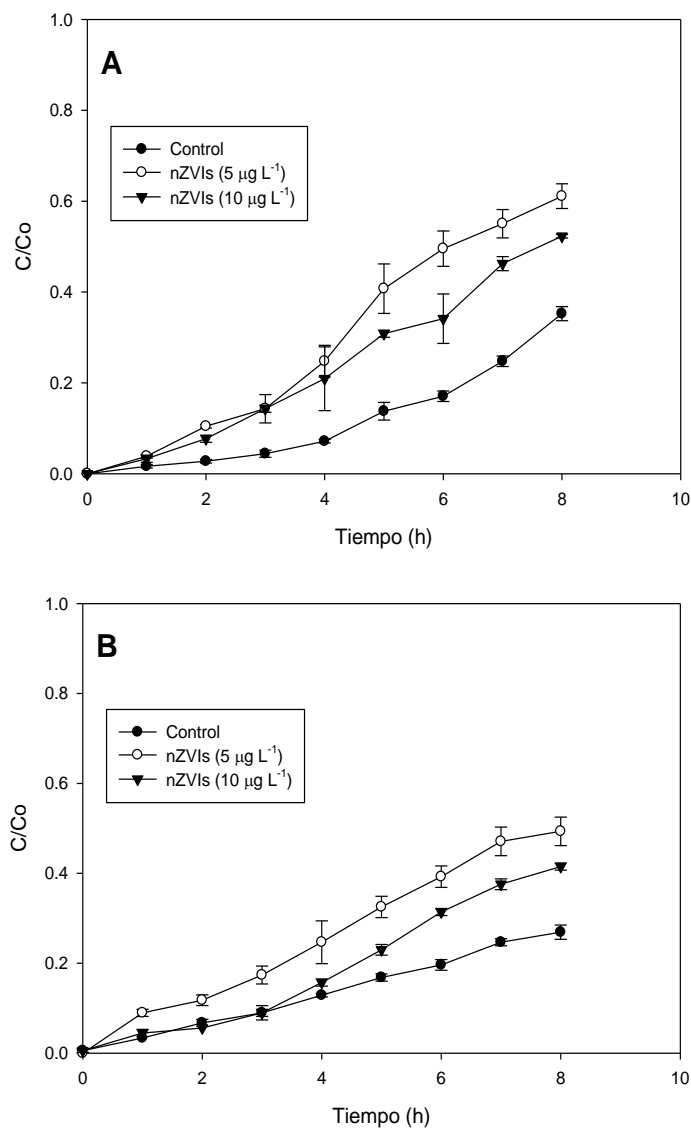
La exposición a nZVIs en la cámara inferior del biorreactor produjo una mejora en la eficiencia de paso de la bacteria a través de las membranas de 5  $\mu\text{m}$  y 12  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para ambas concentraciones estudiadas (figura 4.20 y tabla 4.5). Se observaron valores de flujo celular que duplicaban los registrados para el control, lo que indicó que la taxis negativa indujo un efecto más atenuado en el transporte de la bacteria a través del filtro que los observados para otros quimioefectores positivos que se colocaron en la CS. Aún así, las diferencias de flujo celular entre ambas membranas no fue muy significativa a pesar de las diferencias en el tamaño de poro entre 5  $\mu\text{m}$  y 12  $\mu\text{m}$ . Esta movilización fue muy similar a la encontrada en los ensayos capilares, como se observa en los valores de IT (tabla 4.5).





**Figura 4.19.** Respuesta táctica de *Pseudomonas putida* G7 a través del transporte en biorreactores de membrana con glucosa como quimioefector. 12 μm (A y B) y 5 μm (C y D) se utilizaron como tamaños de poro en los experimentos. La glucosa (línea de puntos blancos) se introdujo en contacto directo con la bacteria en la cámara inferior (B y D) o en la cámara superior (A y C) del biorreactor. En los controles (línea de puntos negros) no se añadió quimioefector al sistema. Los datos están representados como la media de los datos de ensayos por duplicado.





**Figura 4.20.** Efecto de la exposición a nanopartículas de Fe (nZVIs) en el transporte de la bacteria quimiotáctica *Pseudomonas putida* G7 en experimentos de biorreactores. Las células fueron expuestas a concentraciones de 5 y 10 µg L<sup>-1</sup> en la cámara inferior del biorreactor con tamaños de poro de 12 µm (A) y 5 µm (B). Las barras de error indican desviación estándar de los ensayos realizados por duplicado.



**Tabla 4.5.** Influencia de glucosa y nanopartículas de Fe en la respuesta táctica de *Pseudomonas putida* G7 en ensayo de biorreactores.

Tratamiento	Concentración (mM o $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Tamaño de poro ( $\mu\text{m}$ )	Posición <sup>b</sup>	Respuesta táctica	IT <sup>b</sup>	Control			Quimioefector		
						Flujo celular ( $\times 10^8$ células $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	C/Co <sup>c</sup>	D <sup>d</sup> ( $\times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )	Flujo celular ( $\times 10^8$ células $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	C/Co <sup>c</sup>	D <sup>d</sup> ( $\times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )
glucosa	10	12	CS	Hiper-movilidad	0,4 <sup>e</sup> 29 <sup>f</sup>	0,23	0,06 (0,22)	0,07	1,66	0,35 (0,58)	0,57
		5				0,15	0,04 (0,22)	0,04	0,66	0,18 (0,30)	0,21
		12	CI			0,44	0,12 (0,27)	0,16	0,02	0,06 (0,17)	0,08
		5				0,20	0,06 (0,29)	0,06	0,10	0,04 (0,10)	0,04
nZVI <sup>g</sup>	5	12	CI	Taxis negativa	2  2,77	0,48	0,35	0,12	0,95	0,61	0,28
		5				0,30	0,27	0,08	0,57	0,49	0,19
	12	0,48 <sup>h</sup>				0,35	0,12	0,78	0,52	0,21	
	5	0,30 <sup>i</sup>				0,27	0,08	0,50	0,41	0,14	

<sup>a</sup> Concentración en mM de Glucosa o  $\mu\text{g L}^{-1}$  para nZVIs. <sup>b</sup>CS (Cámara superior) o CI (Cámara inferior) indica donde está presente el quimioefector en los biorreactores.

<sup>b</sup> IT (Índice táctico) según ensayos capilares. <sup>c</sup> C/Co se da al final del periodo de cálculo del flujo celular. Los valores máximos de C/Co a 8 h se indican en paréntesis. <sup>d</sup>

D, coeficiente de difusión. <sup>e</sup> Ensayo capilar de atracción. <sup>f</sup> Ensayo capilar de repelencia. <sup>g</sup> nZVI, nanopartículas zero-valente de hierro. <sup>h,i</sup> El control fue el mismo que para

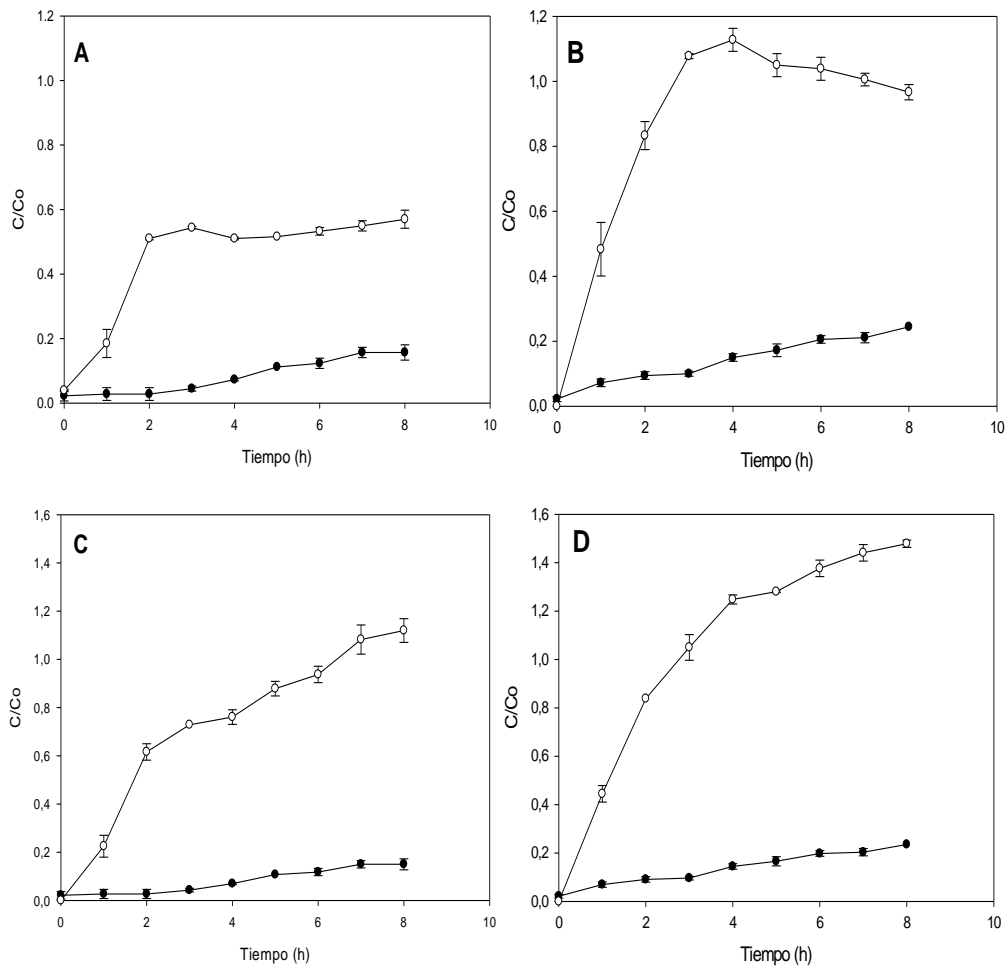
5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para nZVI



#### 4.4.1.5. Otros quimioefectores: exudados artificiales de raíces (AREs) en el transporte en biorreactores.

El empleo de varios de los compuestos estudiados anteriormente como efecto combinado en la respuesta táctica, provocó un aumento del transporte en los biorreactores. Se estudió el efecto de los AREs empleando las menores de las concentraciones planteadas en el estudio (0,1 y 1 mM) (figura 4.21), de tal forma que no aumentara demasiado la cantidad de carbono disponible para el organismo, ya que solo se quería conseguir un efecto en el transporte a través de la membrana. Los resultados mostraron nuevamente diferencias entre los tamaños de poro 5  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$  para ambas concentraciones. Sin embargo, de nuevo, pudimos observar mediante microscopía, una división celular de la estirpe en la cámara superior de los biorreactores a partir de las 4 h de experimentación para la mayor de las concentraciones empleadas (1 mM), lo que nos indica que solo podemos tener en consideración los datos de transporte obtenidos durante las primeras horas del ensayo. En consonancia, el flujo celular se vió aumentado con respecto a los otros efectores químicos positivos, siendo el doble de los registrados para estos últimos (tabla 4.6). Estos valores concuerdan con los obtenidos en los ensayos capilares para IT, donde también se observó el aumento en la respuesta de la estirpe al estímulo químico. Además, los valores de coeficiente de difusión  $D$  (tabla 4.6) arrojaron datos muy interesantes para 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, alcanzándose una situación muy similar a los valores registrados en los ensayos con salicilato y membrana de 12  $\mu\text{m}$  ( $D = 5,75 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , tabla 4.2). El aumento de la concentración del quimioefector para 5  $\mu\text{m}$  no provocó un aumento significativo del flujo celular.





**Figura 4.21.** Ensayos de transporte en biorreactores con la estirpe PPG7 y exudados artificiales de raíces a distintas concentraciones: 0,1 mM (A y B) y 1 mM (C y D). Los controles sin quimioefector aparecen representados por una línea de puntos negros mientras que la adición de la mezcla a la CS, se corresponde con la línea de puntos blancos. Se utilizaron dos tamaños de membrana en el estudio: 3  $\mu$ m (A y C) y 5  $\mu$ m (B y D). Los datos aparecen representados como la media de los ensayos por duplicado.



**Tabla 4.6.** Influencia de exudados artificiales de raíces en la respuesta táctica de *Pseudomonas putida* G7 en ensayo de biorreactores. <sup>a</sup> CS (Cámara superior), indica donde está presente el quimioefector en los biorreactores. <sup>b</sup> IT (Índice táctico) según ensayos capilares. <sup>c</sup> C/Co se da al final del periodo de cálculo del flujo celular. Los valores máximos de C/Co a 8 h se indican en paréntesis. <sup>d</sup> D, coeficiente de difusión.

Concentración (mM)	Tamaño de poro (μm)	IT <sup>b</sup>	Control			Quimioefector		
			Flujo celular (x 10 <sup>8</sup> células cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	C/Co <sup>c</sup>	D <sup>d</sup> (x 10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	Flujo celular (x 10 <sup>8</sup> células cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	C/Co <sup>c</sup>	D <sup>d</sup> (x 10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
0,1	3	56	0,02	0,03 (0,16)	0,02	1,72	0,51 (0,60)	0,64
	5		0,33	0,1 (0,24)	0,11	3,36	0,83 (0,97)	4,66
1	3	102	0,02	0,03 (0,15)	0,02	2,36	0,62 (1,12)	0,93
	5		0,27	0,1 (0,23)	0,11	4,03	0,83 (1,48)	4,66

<sup>a</sup> CS (Cámara superior), indica donde está presente el quimioefector en los biorreactores. <sup>b</sup> IT (Índice táctico) según ensayos capilares. <sup>c</sup> C/Co se da al final del periodo de cálculo del flujo celular. Los valores máximos de C/Co a 8 h se indican en paréntesis. <sup>d</sup> D, coeficiente de difusión.



#### 4.4.2. BIODEGRADACIÓN EN BIORREACTORES

Una vez realizado el estudio del transporte de la bacteria a través de las distintas porosidades, el siguiente paso fue determinar si este aumento del flujo celular mediado por la respuesta táctica (observado con los distintos quimioefectores), se tradujo también en una mayor biodegradación de contaminantes por parte de la estirpe.

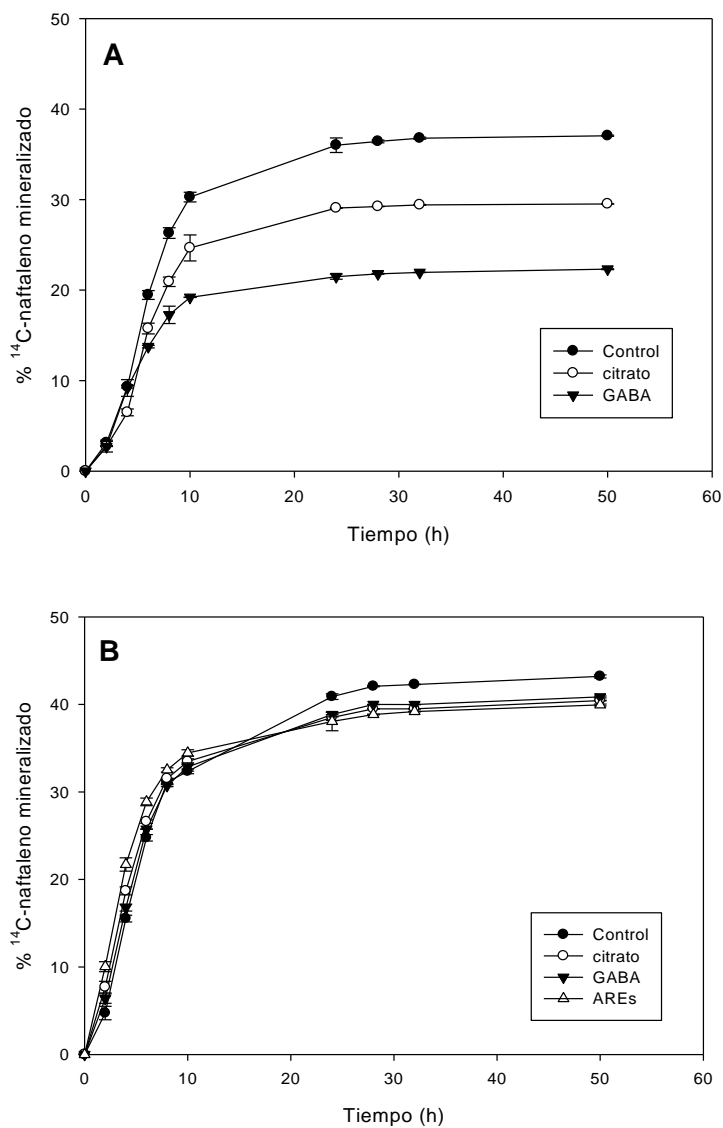
##### 4.4.2.1. Ensayos preliminares

###### 4.4.2.1a. Mineralización de naftaleno

Con el fin de determinar las tasas de mineralización de naftaleno por parte de *P. putida* G7 ante una total disponibilidad del compuesto, se llevaron a cabo diferentes ensayos en matraces con anillas cargadas con el compuesto marcado radioactivamente e incubados en condiciones estáticas. La adición de GABA y citrato a la máxima concentración (10 mM) (gráfica 4.22.A) causó una ligera inhibición de la mineralización de naftaleno por parte de la bacteria. Las velocidades máximas de mineralización ( $V_{max}$ ) fueron  $0,29 \pm 0,22 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y  $0,35 \pm 0,05 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para GABA y citrato respectivamente, siendo significativamente menores (t-student, p-valor  $\leq 0,05$ ) que el valor de  $V_{max}$  observado en el control ( $0,44 \pm 0 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Ello indicó que esta concentración de los compuestos quimioatrayentes suponía una fuente de C alternativa de elevada biodisponibilidad para la estirpe. A una menor concentración (0,1 mM, gráfica 4.22.B), los valores de mineralización observados con citrato ( $0,47 \pm 0,04 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), GABA ( $0,46 \pm 0,03 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y ARES ( $0,47 \pm 0,05 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no fueron estadísticamente diferentes a los detectados en el control ( $0,47 \pm 0,04 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Por ello, se eligió esta concentración para la realización de los ensayos en biorreactores de membrana.







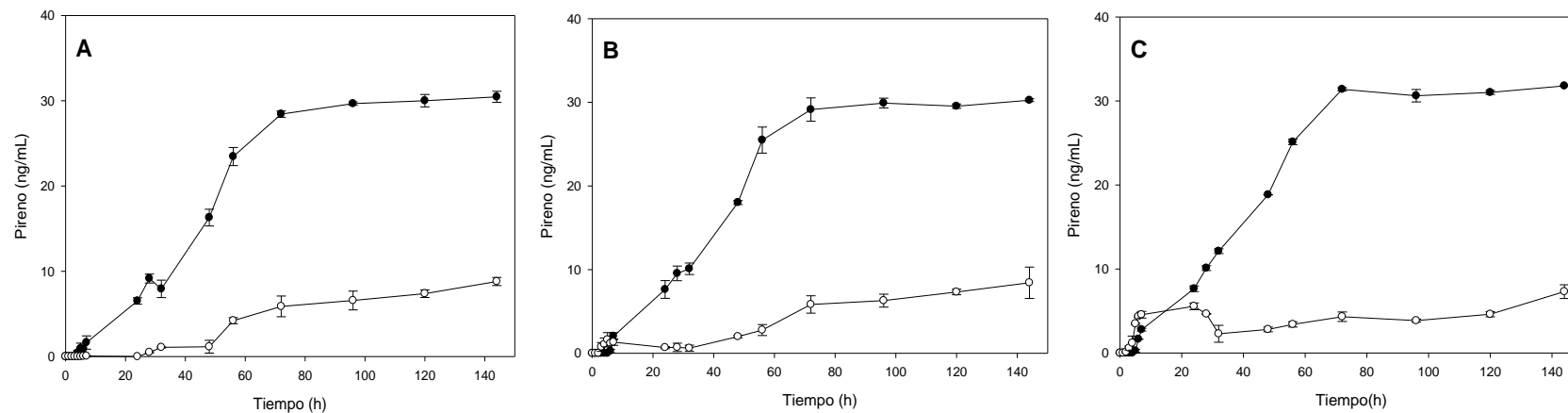
**Figura 4.22.** Mineralización de naftaleno por la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en ausencia de restricción física con diferentes quimioefectores [10 mM (A) y 0,1 mM (B)].



#### 4.4.2.1b. Cometabolismo de pireno

Los resultados de cometabolismo de pireno por *P. putida* obtenidos en experimentos sin restricción física con sistemas de dopaje pasivo aparecen representados en la figura 4.23. La suspensión bacteriana se puso en contacto con los distintos efectores químicos (GABA y AREs por presentar las mayores respuestas quimiotácticas, ambos a 0,1 mM, realizándose un control sin bacterias para cada caso. Para todos los quimioefectores, las concentraciones de pireno detectadas por fluorimetría alcanzaron valores, en ausencia de bacterias, muy similares al control sin adición de quimioatrayentes (aproximadamente 30 ng mL<sup>-1</sup> para todas las situaciones experimentales). Además, las diferencias con las situaciones experimentales en las que se añadió bacteria fueron muy significativas en todos los casos: se alcanzaron concentraciones de pireno (8,5 ng mL<sup>-1</sup>) por debajo de las alcanzadas en ausencia de bacterias, lo cual es indicativo la capacidad cometabolizadora de *P. putida G7*. Para excluir posibles artefactos por la amortiguación de la señal debida a la turbidez de la suspensión bacteriana, se utilizó un factor de corrección (FC) mediante una recta de calibrado a distintas concentraciones celulares, eliminando la interferencia de filtro interno de las células en la señal de pireno (FC=1, vease material y métodos).





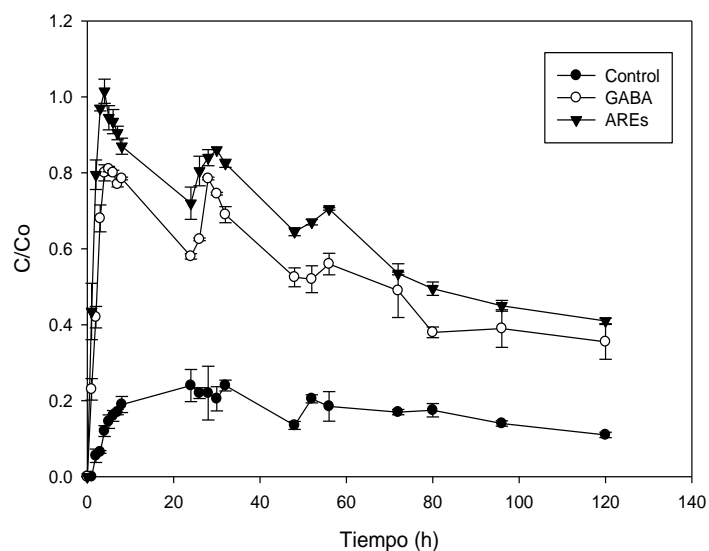
**Figura 4.23.** Cometabolismo de pireno por la estirpe *P. putida* G7 (puntos blancos). Las líneas de puntos negros representan el control abiótico sin bacteria. Las gráficas A (Control), B (GABA) y C (AREs) representan las distintas situaciones experimentales donde se añadió o no quimioefector a una concentración de 0,1 mM. Los puntos representan la media de los experimentos por duplicado.



#### 4.4.2.2. Efecto de la respuesta táctica a través de microporosidades en la mineralización de naftaleno

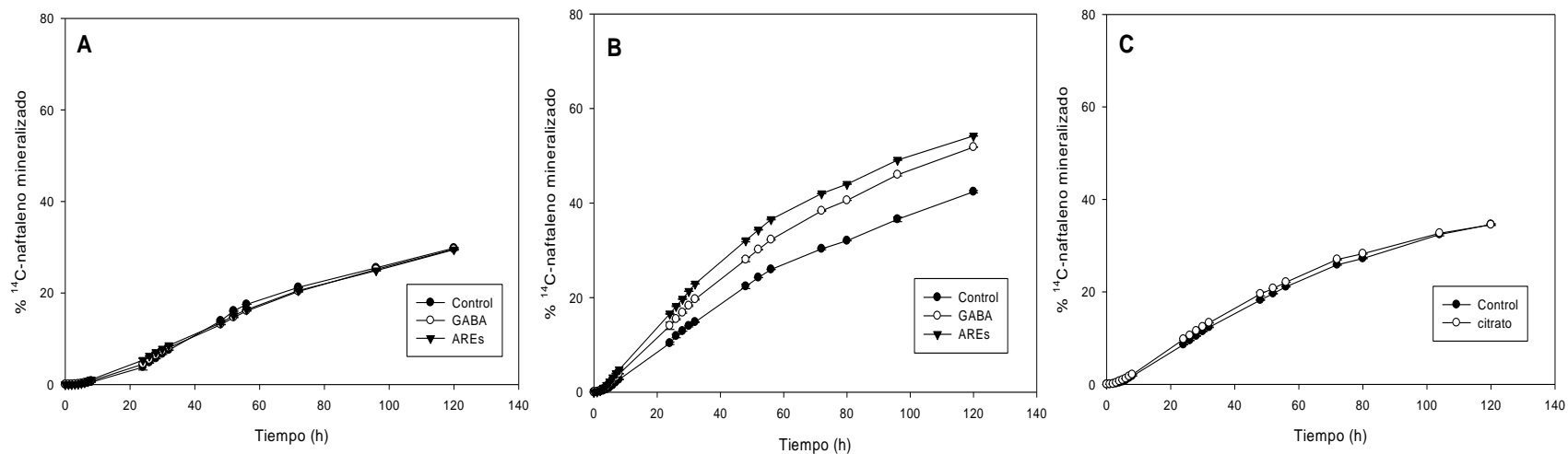
Para determinar la influencia del mayor transporte bacteriano mediante taxis bacteriana en la biodegradación de naftaleno, se utilizaron dos tamaños de poro (3  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ ) según los ensayos previos de transporte en biorreactores. Los datos obtenidos en un control de crecimiento bacteriano sugirieron que la presencia de los efectores químicos a 0,1 mM no inhibían el uso de naftaleno como sustrato, impidiendo también el crecimiento celular en los biorreactores (figura 4.24). Los resultados obtenidos para cada uno de los quimioefectores se representan en la figura 4.25. GABA y AREs no tuvieron un efecto sobre la biodegradación del contaminante con las membranas de 3  $\mu\text{m}$  con respecto a los biorreactores control (figura 4.25.A y tabla 4.7). A pesar de observarse un mayor transporte de la bacteria en los ensayos previos a esta concentración, no se observó una relación directa con el posible aumento de la biodegradación de naftaleno. Sin embargo, en el caso de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, las tasas de mineralización (tabla 4.7) alcanzaron valores estadísticamente superiores (t-student,  $P \leq 0,05$ ) a los registrados para el control ( $0,40 \pm 0,04 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) tanto para GABA ( $0,50 \pm 0,07 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) como para AREs ( $0,56 \pm 0,02 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). En el caso del citrato ( $0,48 \pm 0,05 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), no se mostraron diferencias significativas con los biorreactores control ( $0,45 \pm 0,03 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (figura 4.25.C). Los datos para la distribución de naftaleno en la fase acuosa en condiciones abióticas también fueron muy significativos (figura 4.26, tabla 4.7). La presencia de la membrana redujo a casi la mitad el paso del compuesto al medio de cultivo para 3  $\mu\text{m}$ , siendo algo menor en el caso de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.





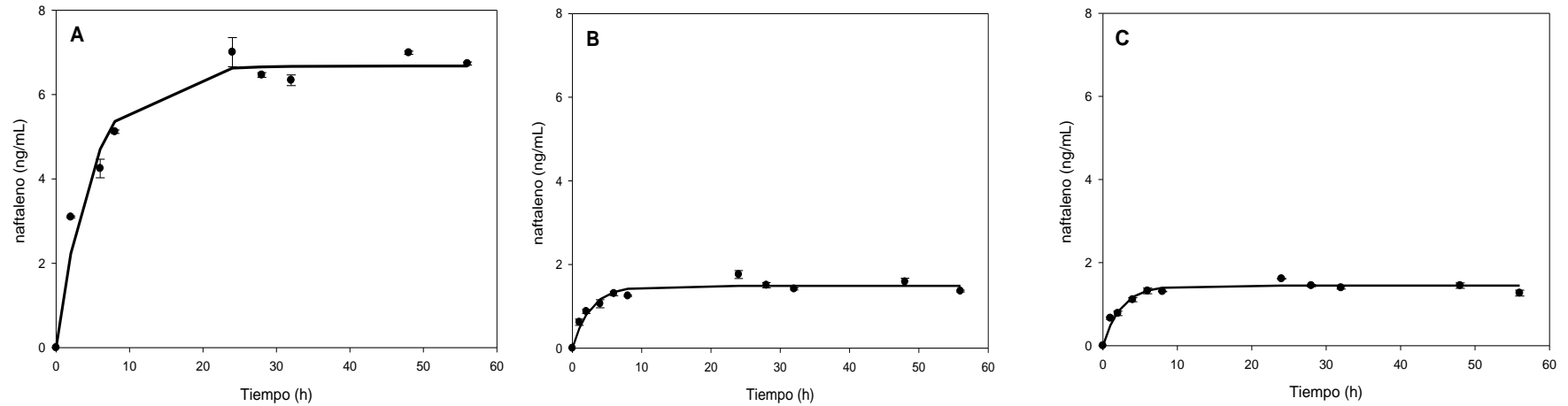
**Figura 4.24.** Control de crecimiento en biorreactores con los quimioefectores GABA y AREs a 0,1 mM en la cámara superior. *Pseudomonas putida* G7 se introdujo en la cámara inferior del reactor a 0,1 DO ( $10^8$  UFC/mL). En los biorreactores control no se añadió ningún quimioefector. Las barras de error representan una desviación estándar de los experimentos por duplicado.





**Figura 4.25.** Mineralización de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 en presencia de diferentes quimioefectores a una concentración 0,1 mM. Se utilizaron dos tamaños de poro de membrana en los ensayos en biorreactores: 3 μm (A) y 5 μm (B y C). Los datos se muestran como la media de los ensayos por duplicado. En los biorreactores control, no se añadió efector químico a la cámara superior.





**Figura 4.26.** Evolución del paso de naftaleno cargado en anillas de silicona mediante el método de dopaje pasivo a fase acuosa. Se realizaron dos ensayos diferentes: (A) sin restricción física y en las condiciones impuestas por el biorreactor con membranas de 3  $\mu\text{m}$  (B) y 5  $\mu\text{m}$  (C) de tamaño de poro. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos por duplicado.



**Tabla 4.7.** Tasas de reparto y mineralización de naftaleno en presencia o ausencia de la estirpe bacteriana *Pseudomonas putida* G7. Los experimentos en condiciones abióticas, se realizaron en en viales de cristal con 3 mL de medio de cultivo para simular la cámara superior del reactor.

Tamaño de poro ( $\mu\text{m}$ )	Intercambio de fase						Tasas de mineralización ( $\text{ng mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ )		
	Control		GABA		AREs		Control	GABA <sup>a</sup>	AREs <sup>a</sup>
	Tasa de reparto ( $\text{ng mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$C_{\text{eq}}$ <sup>b</sup>	Tasa de reparto ( $\text{ng mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$C_{\text{eq}}$	Tasa de reparto ( $\text{ng mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$C_{\text{eq}}$			
Sin membrana	1.35 $\pm$ 0.13	6.68 $\pm$ 0.22	NA <sup>d</sup>	NA	NA	NA	0.06 $\pm$ 0	0.05 $\pm$ 0	0.06 $\pm$ 0 <sup>c</sup>
3	0.65 $\pm$ 0.04	1.89 $\pm$ 0.01	NA	NA	NA	NA	0.24 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0	0.23 $\pm$ 0.03
5	0.80 $\pm$ 0.18	1.83 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.07	1.49 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.10	1.41 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup> GABA y AREs (0,1 mM) se corresponden, respectivamente, con ácido  $\gamma$ -aminobutírico y exudados de raíces artificiales. <sup>b</sup>  $C_{\text{eq}}$ , concentración en el equilibrio en  $\text{ng mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ . <sup>c</sup> El control fue el mismo para GABA. <sup>d</sup> NA, no aplicable.

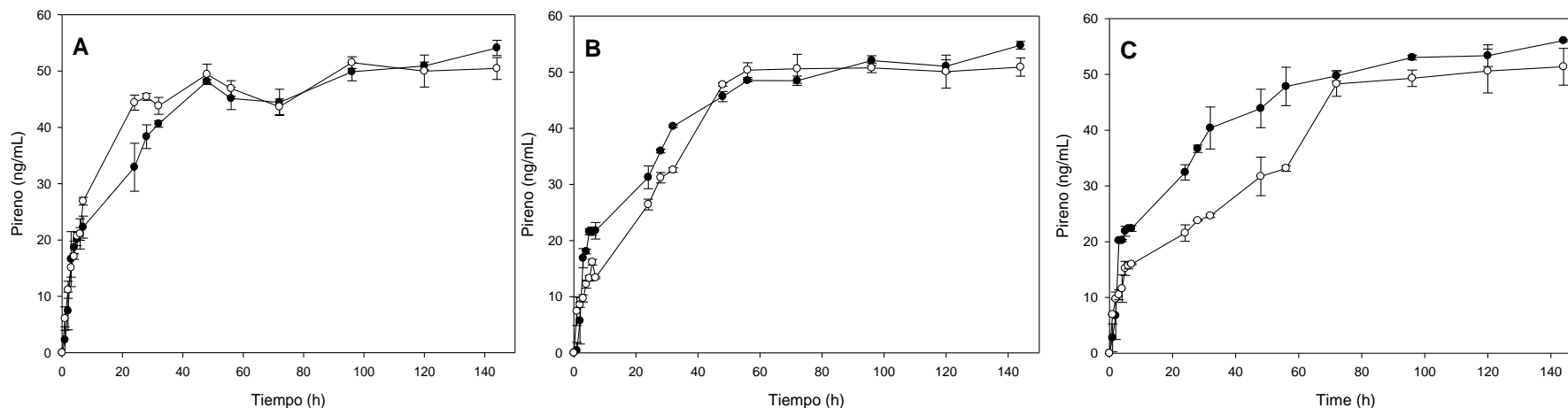




#### 4.4.2.3. Efecto de la respuesta táctica a través de microporosidades en el cometabolismo de pireno.

Siguiendo los estudios previos con naftaleno en biorreactores, se realizaron ensayos de cometabolismo de pireno con los distintos quimioefectores a concentraciones de 0,1 mM. Las concentraciones de pireno determinadas mediante fluorimetría en la cámara superior fueron significativamente diferentes para las situaciones en las que se añadió quimioefector. Si nos fijamos en la figura 4.27, los controles abióticos mostraron valores de concentración de pireno muy similares para todas las situaciones experimentales, alcanzando valores máximos de aproximadamente 50 ng/mL a las 48 h. Previsiblemente, a este tiempo de muestreo, la concentración de pireno alcanzó su equilibrio en el reparto de la anilla a la fase acuosa en la cámara superior del reactor. La presencia de bacterias en el biorreactor tuvo un efecto diferente sobre la concentración de pireno con respecto a la presencia o no de GABA y AREs. En los biorreactores donde no se añadió ninguna fuente quimiotáctica, la presencia de bacterias no tuvo ningún efecto significativo en la concentración acuosa del contaminante (figura 4.27.A). Sin embargo, el mayor transporte por taxis bacteriana frente a GABA y AREs también causó un descenso en la concentración acuosa, derivada del cometabolismo de pireno. A las 32 h para GABA y 48 h para AREs podían apreciarse diferencias en las concentraciones de pireno en presencia de bacterias que podían atribuirse a la función cometabólica de la estirpe, siendo más acusada para los exudados artificiales (figura 4.27.B y 4.27.C). A partir de las 48 h y 72 h respectivamente, los valores de concentración de pireno fueron muy similares a los ensayos abióticos. Este hecho probablemente se deba a la falta de una fuente de carbono viable a largo plazo, que permita a las células continuar con su actividad cometabólica normal unida a la fase de equilibrio del compuesto en la fase acuosa desde la anilla.





**Figura 4.27.** Cometabolismo de pireno en biorreactores de membrana con tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$ . Las líneas de puntos negros representan los controles abióticos donde solo se añadió la anilla cargada con pireno en la cámara superior de los biorreactores. Las líneas de puntos blancos simbolizan la presencia de bacteria y la adición o no (A) de los quimioefectores GABA (B) o AREs (C) a una concentración de 0,1 mM. La concentración del compuesto se presenta como la media de los experimentos por duplicado de cada una de las situaciones experimentales.



## 4.5. INFLUENCIA DE LA TAXIS BACTERIANA EN EL TRANSPORTE Y BIODEGRADACIÓN DE PIRENO EN COLUMNAS

Siguiendo los resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación sobre el transporte y biodegradación de naftaleno en columnas (Jimenez-Sanchez y col., 2015) y el más reciente sobre el cometabolismo de pireno por la estirpe *Pseudomonas putida* G7 (Rolando y col., 2020), se llevó a cabo un estudio de la movilidad y biodegradación de pireno mediante el empleo de nuevos quimioefectores en los sistemas de columnas. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo mediante la aplicación de un flujo continuo al sistema de columnas, a diferencia de los experimentos con biorreactores realizados en estanco.

### 4.5.1. TRANSPORTE DE LA BACTERIA *P. putida* G7 A TRAVÉS DE LA COLUMNA

#### 4.5.1.1. Adhesión a arena en transporte en columnas

Los resultados de adhesión al material poroso evidenciaron la diferente movilidad de la estirpe en presencia de los distintos quimioefectores. Mientras que en los ensayos control la adhesión bacteriana fue superior al 50 % ( $55,86 \pm 5,78$  %), los quimioefectores GABA y AREs a 0,75 mM registraron valores de  $36,42 \pm 1,60$  % y  $12,96 \pm 4,75$  % respectivamente. Estos datos concuerdan con los ya descritos anteriormente en otros estudios con diferentes quimioefectores (Jimenez-Sanchez y col., 2012, 2018) donde los movimientos celulares “smooth” en presencia de quimioefectores positivos, con pocos cambios de trayectoria, dan lugar a una menor adhesión a las superficies porosas, en comparación a las trayectorias celulares con un mayor número de cambios de dirección, características del movimiento espontáneo de la estirpe.



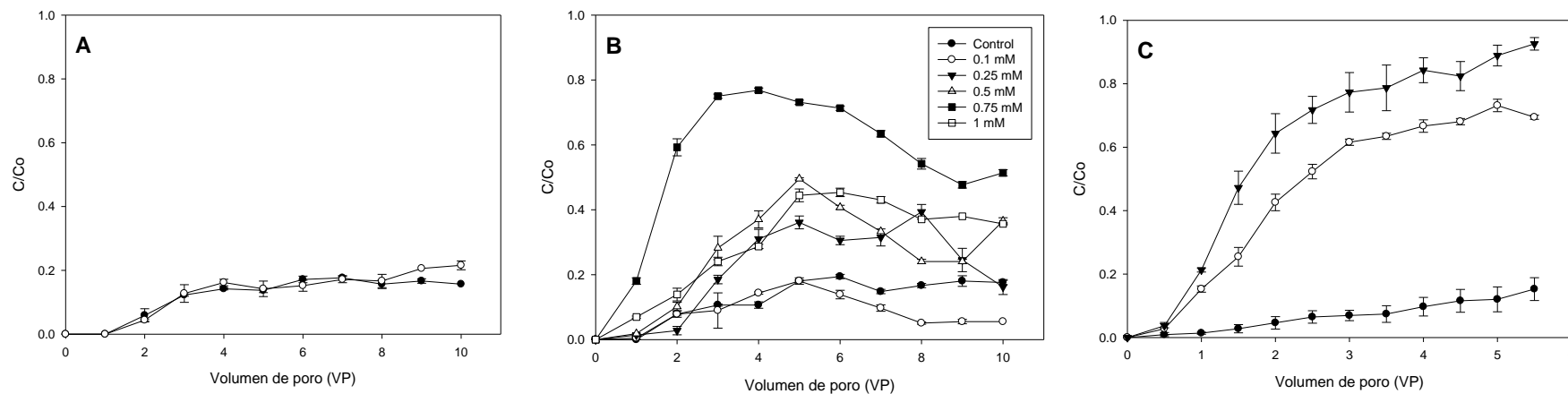
#### 4.5.1.2. Efecto de GABA

Se estudió un rango de concentración (0,1 a 1 mM) de acuerdo con los resultados previos en los ensayos capilares. En los experimentos de columna los efectores químicos se encontraban en contacto directo con la suspensión bacteriana durante periodos (hasta 8 h) que permitían el rápido consumo por parte de la bacteria. Esto provocó que no hubiera un efecto claro sobre el transporte a bajas concentraciones de quimioefector (figura 4.28.A). No obstante, a una concentración de 0,75 mM se observó una mayor capacidad de transporte bacteriano a través de la arena (figura 4.28.B), lo que también se correspondió con los ensayos capilares realizados a esta concentración. Cuando la bacteria fue introducida en las columnas de arena en presencia del quimioefector GABA, el transporte celular alcanzó valores significativamente diferentes a los mostrados por el control en ausencia de estos (figura 4.28.C). En los efluentes de las columnas se registraron valores muy altos de densidad óptica, que se tradujeron en incrementos de  $C/Co$  para GABA con valores de 0,7 a tiempo final, comparados con las columnas control donde solo se bombearon bacterias ( $C/Co = 0,1$ ).

#### 4.5.1.3. Efecto de exudados artificiales en el transporte en sistema de columnas

Los resultados obtenidos para los exudados artificiales fueron muy parecidos a los observados con GABA (figura 4.28.C). Existió un aumento considerable de la concentración celular en los efluentes de aquellas columnas donde se añadió el quimioefector junto con la suspensión de células de *P. putida* G7, con respecto a los ensayos control. Además, al igual que sucediera con los biorreactores, existió un incremento en los valores de  $C/Co$  (0,9 a tiempo final) en relación a la presencia de GABA como único quimioefector.





**Figura 4.28.** Ensayos de transporte en columnas de percolación con la estirpe *P. putida* G7 con los quimioefectores GABA y ARES a distintas concentraciones. En la figura A, GABA (línea de puntos blancos) se añadió a una concentración de 0,1 mM, no produciéndose diferencias en el transporte con el control (línea de puntos negros) sin quimioefector. En B, el efector químico GABA se estudió a diferentes rangos de concentraciones (0,1 – 1 mM). La figura C muestra el empleo de GABA (línea de puntos blancos) y ARES (línea de triángulos negros) a concentraciones de 0,75 mM comparados con las columnas control donde solo se añadió bacterias (línea de puntos negros).

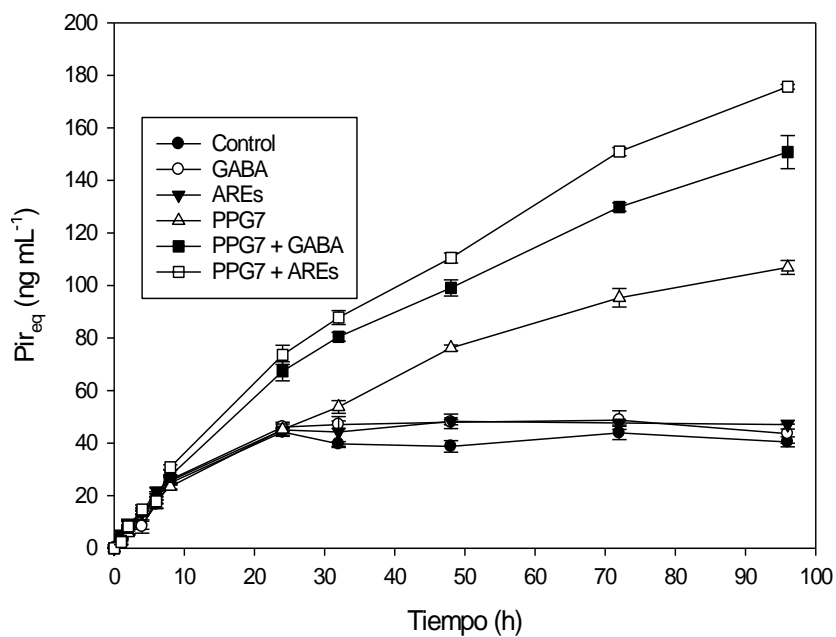


## 4.5.2. ESTUDIO DEL COMETABOLISMO DE PIRENO EN COLUMNAS DE ARENA

### 4.5.2.1. Experimentos en estanco

La capacidad cometabólica de la estirpe se determinó a partir de la evolución de la concentración de equivalentes de pireno ( $Pir_{eq}$ ) en la fase acuosa a lo largo del tiempo (figura 4.29). Para ello, se realizaron ensayos en estanco con anillas cargadas con  $^{14}C$ -pireno. Los quimioefectores GABA y AREs se añadieron a los matraces a una concentración de 0,75 mM. Los resultados mostraron como en los ensayos abióticos (Control, GABA y AREs) se alcanzó el equilibrio a las 24 h, alcanzándose valores muy similares ( $40,47 \pm 1,88 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $43,60 \pm 3,65 \text{ ng mL}^{-1}$  y  $47,04 \pm 1,66 \text{ ng mL}^{-1}$  respectivamente) al final del experimento (96 h). En cambio, se observó en los matraces en los que se añadió *P. putida* G7 que la concentración de  $Pir_{eq}$  siguió un ascenso constante (figura 4.29) como consecuencia del cometabolismo. Esto se debe a que la radioactividad detectada correspondía tanto al pireno como a los metabolitos formados en el proceso, más solubles en agua que el compuesto parental, y que por tanto tendían a establecer equilibrios independientes entre la anilla y la fase acuosa. Así mismo, las concentraciones de  $Pir_{eq}$  en presencia de GABA y AREs fueron significativamente mayores a las detectadas en presencia de bacterias sin quimioefectores ( $150,80 \pm 6,30 \text{ ng mL}^{-1}$  para GABA y  $175,65 \pm 0,88 \text{ ng mL}^{-1}$  para AREs, frente a  $106,89 \pm 2,65 \text{ ng mL}^{-1}$  para PPG7 sin quimioefector).





**Figura 4.29.** Biodegradación y reparto de pireno en presencia de células de *Pseudomonas putida* G7 en matraces con anillas cargadas con pireno. Se realizaron controles abióticos con presencia o ausencia de quimioefectores a una concentración de 0,75 mM (Control, GABA y AREs). Los matraces inoculados (PPG7, PPG7 + GABA y PPG7 + AREs) se mantuvieron bajo las mismas condiciones que matraces no inoculados para determinar la capacidad cometabólica de la estirpe en presencia o ausencia de efectores químicos.



De esta forma, se determinó a tiempo final (96 h) la fracción de  $^{14}\text{C}$  correspondiente a los metabolitos mediante un colector de fracciones acoplado a un HPLC. Los datos se expresan en la tabla 4.8 como concentración de pireno equivalente ( $Pir_{eq}$ ). En ella aparecen recogidos los datos pertenecientes a la fase acuosa y de células recogidas tras la centrifugación para la muestras de matraces inoculados, mientras que los controles abióticos se midieron directamente sin centrifugar. Los valores indican, por una parte, una concentración total de compuesto marcado en los controles abióticos muy similar a la obtenida por medida directa (es decir, sin pasar por el colector) en el contador de centelleo (aproximadamente  $40 \text{ ng mL}^{-1}$ ) para todos los casos.

En la columna correspondiente a otras fracciones aparecen valores de  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  de compuestos diferentes a pireno y que pueden deberse a pequeñas contaminaciones en el proceso de muestreo y medida, o a impurezas del stock radioactivo. Aún así, el gran porcentaje de compuestos detectados correspondió a la fracción del pireno. Los datos para los ensayos con bacterias resultaron también en unas concentraciones totales muy cercanas a las obtenidas antes de la introducción en el colector ( $95,93 \pm \text{ ng mL}^{-1}$  para el control sin quimioefector,  $142,80 \text{ ng mL}^{-1}$  para GABA y  $160,19 \text{ ng mL}^{-1}$  para AREs). Las fracciones medidas no correspondientes al pireno, es decir, de metabolitos, fueron también mayores para los quimioefectores que para el control tanto en las células como en la fase acuosa, siendo más significativas para los exudados artificiales.





**Tabla 4.8.** Datos de concentración de pireno (Pir<sub>eq</sub>) obtenidos mediante colector de fracciones de HPLC en ensayo de biodegradación en estanco con *Pseudomonas putida* G7.

Tratamiento	Fase acuosa <sup>a</sup>		Células <sup>b</sup>		Pir <sub>eq</sub> total (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Pir <sub>eq</sub> (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
	Fracción de pireno	Otras fracciones	Fracción de pireno	Otras fracciones		
No inoculado <sup>e</sup>	34,47 ± 2,56	3,06 ± 4,33	-	-	37,53	40,47
Inoculado	ND <sup>f</sup>	35,18 ± 24,55	25,06 ± 2,25	35,28 ± 20,42	95,53	106,88
Inoculado + GABA	ND	44,91 ± 15,87	44,36 ± 11,42	43,11 ± 9,35 10,40 ± 14,72 <sup>g</sup>	142,80	150,80
Inoculado + AREs	ND	60,80 ± 23	37,55 ± 3,07	51,65 ± 17,75 10,19 ± 11,49	160,19	175,65

<sup>a</sup> Fase acuosa (ng mL<sup>-1</sup>) y <sup>b</sup> “células” (ng mL<sup>-1</sup>), fueron analizados por separado para el caso de los matraces en los que se añadió bacteria. <sup>c</sup> Suma total de todas las fracciones detectadas en ng mL<sup>-1</sup>. <sup>d</sup> Concentración de Pir<sub>eq</sub> obtenida mediante medida por contador de centelleo a tiempo final (96 h). <sup>e</sup> Los datos recogidos en la columna de “fase acuosa” para control corresponden a las muestras medidas directamente en el colector (ensayos abióticos). <sup>f</sup> ND, no detectado. <sup>g</sup> Se detectaron varias fracciones en la muestra.



#### 4.5.2.2. Evaluación del proceso cometabólico durante el transporte

Se analizaron diferentes tiempos de muestreo (2, 4 y 5,5 VP) para el análisis de las concentraciones de pireno recogidas en los efluentes. Para ello se realizó un ensayo de transporte bacteriano siguiendo el mismo procedimiento de los experimentos anteriores, añadiendo el pireno adsorbido a una anilla de silicona como foco contaminante. Los datos mostrados en la tabla 4.9 se compararon con los resultados obtenidos de un control negativo sin bacteria, siguiendo las mismas condiciones que en los casos anteriores. Puede observarse como tanto en el control como durante el transporte de *P. putida* G7, las concentraciones totales de pireno equivalente alcanzadas (entendidas como la suma de las concentraciones de todas las fracciones), se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo de experimentación, fruto de el paso constante del pireno desde la anilla a la fase acuosa mediante reparto. Estos valores también se mantienen para todas las situaciones experimentales tanto en presencia o no de quimioefectores. Comparando estos resultados con los analizados cuando el inóculo fue introducido en las columnas, se observa un aumento de la concentración total de compuestos marcados, siendo más significativa cuando se añadieron efectores químicos. En las columnas control no se detectaron concentraciones de compuestos en la fase acuosa para ambos experimentos, aunque sí en otras fracciones para GABA y ARES siendo mayor para ese último compuesto. Si observamos las concentraciones en las células (tabla 4.9), las concentraciones medias de pireno decrecen con el tiempo, aumentando normalmente las concentraciones en otras fracciones, símbolo inequívoco de la transformación del contaminante por cometabolismo. Estos resultados confirman que el mayor transporte también supuso un mayor acceso al contaminante y por consiguiente, una mayor biodegradación de pireno.



**Tabla 4.9.** Valores de concentración de pireno equivalente (Pir<sub>eq</sub>) en ensayos de columna en presencia o ausencia de bacterias. Los datos fueron recogidos de los efluentes e introducidos en un colector de fracciones asociados a un HPLC.

Tratamiento	Experimento de columnas						
	C/Co <sup>c</sup>	VP <sup>d</sup>	Fase acuosa <sup>a</sup>		Células <sup>b</sup>		Pir <sub>eq</sub> total (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup>
			Fracción de pireno	Otras fracciones	Fracción de pireno	Otras fracciones	
Control <sup>f</sup> (sin bacterias)	-	2	20,44 ± 4,42	ND <sup>g</sup>	-	-	20,44
	-	4	17,78 ± 3,11	ND	-	-	17,78
	-	5,5	19,14 ± 7,27	ND	-	-	19,14
Control (con bacterias)	0,05	2	ND	ND	16,10 ± 5,17	14,75 ± 14,23	30,85
	0,10	4	ND	ND	14,38 ± 4,86	22,74 ± 3,60	37,11
	0,15	5,5	ND	ND	10,97 ± 0,40	21,49 ± 3,56	32,46
GABA	0,43	2	ND	5,19 ± 4,74	20,36 ± 3,03	25,94 ± 1,59	51,49
	0,67	4	ND	11,17 ± 10	24,63 ± 5,35	21,08 ± 0,60	56,88
	0,70	5,5	ND	8,04 ± 4,88	17,27 ± 5,15	25,83 ± 4,22	51,15
AREs	0,64	2	ND	0,78 ± 0,55	22,56 ± 4,77	24,46 ± 10,58	47,80
	0,84	4	ND	9,61 ± 6,87	15,39 ± 2,54	31,85 ± 0,66	56,85
	0,93	5,5	ND	13,61 ± 9,08	13,20 ± 3,38	28,78 ± 1,37	55,60

<sup>a</sup> Fase acuosa (ng mL<sup>-1</sup>) y <sup>b</sup> “células” (ng mL<sup>-1</sup>), fueron analizados por separado para el caso de las columnas en los que se añadió bacteria. <sup>c</sup> C/Co se da para cada uno de los tiempos de muestreo. <sup>d</sup> VP, volumen de poro. <sup>e</sup> Suma de las concentraciones de pireno totales de todas las fracciones analizadas. <sup>f</sup> Los datos recogidos en la columna de “fase acuosa” para control sin bacterias corresponden a las muestras medidas directamente en el colector (ensayos abióticos). <sup>g</sup> ND, No detectado.



#### 4.5.2.3. Evaluación del patrón de movilidad bacteriana durante el transporte en columnas

El análisis cuantitativo de las trayectorias celulares se realizó tanto en los influentes como en los efluentes de las columnas de percolación a diferentes tiempos experimentales. Para ello se introdujeron anillas cargadas con pireno en la parte final de la columna, de tal forma que las bacterias entraran en contacto con el contaminante una vez atravesado el material arenoso en la columna.

Las células presentes en los influentes de las columnas mostraron patrones de movilidad diferenciados (figura 4.30). Mientras que en los ensayos controles, donde no se añadió quimioefector, la estirpe presentó una movilidad constante con cambios de dirección moderados a lo largo de todo el experimento (tabla 4.10), los quimioefectores GABA (figura 4.30.B, E, H y K) y AREs (figura 4.30.C, F, I y L) adquirieron movimientos más suaves a lo largo del tiempo. La exposición a GABA y AREs del inóculo bacteriano provocó aumentos progresivos en las aceleraciones de las trayectorias, disminuyendo paralelamente la frecuencia en los cambios de dirección (tabla 4.10). En los efluentes (figura 4.31), el tiempo inicial del experimento no fue analizado, ya que las células aún no habían atravesado la columna de arena. Una vez las bacterias fueron detectadas en el efluente (2 VP), en todas las situaciones experimentales se mostró de un moderado a un elevado número de cambios de dirección al principio, causa probable de la salida del primer frente bacteriano, obligado a cruzar la tortuosidad del material poroso (tabla 4.10). Mientras en las columnas control (figura 4.31.A, D y G) se alcanzaron valores constantes similares al del influente para el resto de tiempos de muestreo (4 y 5,5 VP), con los quimioefectores GABA (figura 4.31.B, E y H) y AREs (figura 4.31.C, F e I) se siguieron trayectorias más rectilíneas hasta el final del experimento, caracterizadas por una baja frecuencia de cambios de dirección (tabla 4.10) más significativas frente a AREs, teniendo en cuenta el paso de las células a través de las columnas. Estos datos concuerdan con los resultados de adhesión en experimentos en estanco (4.5.1.1)

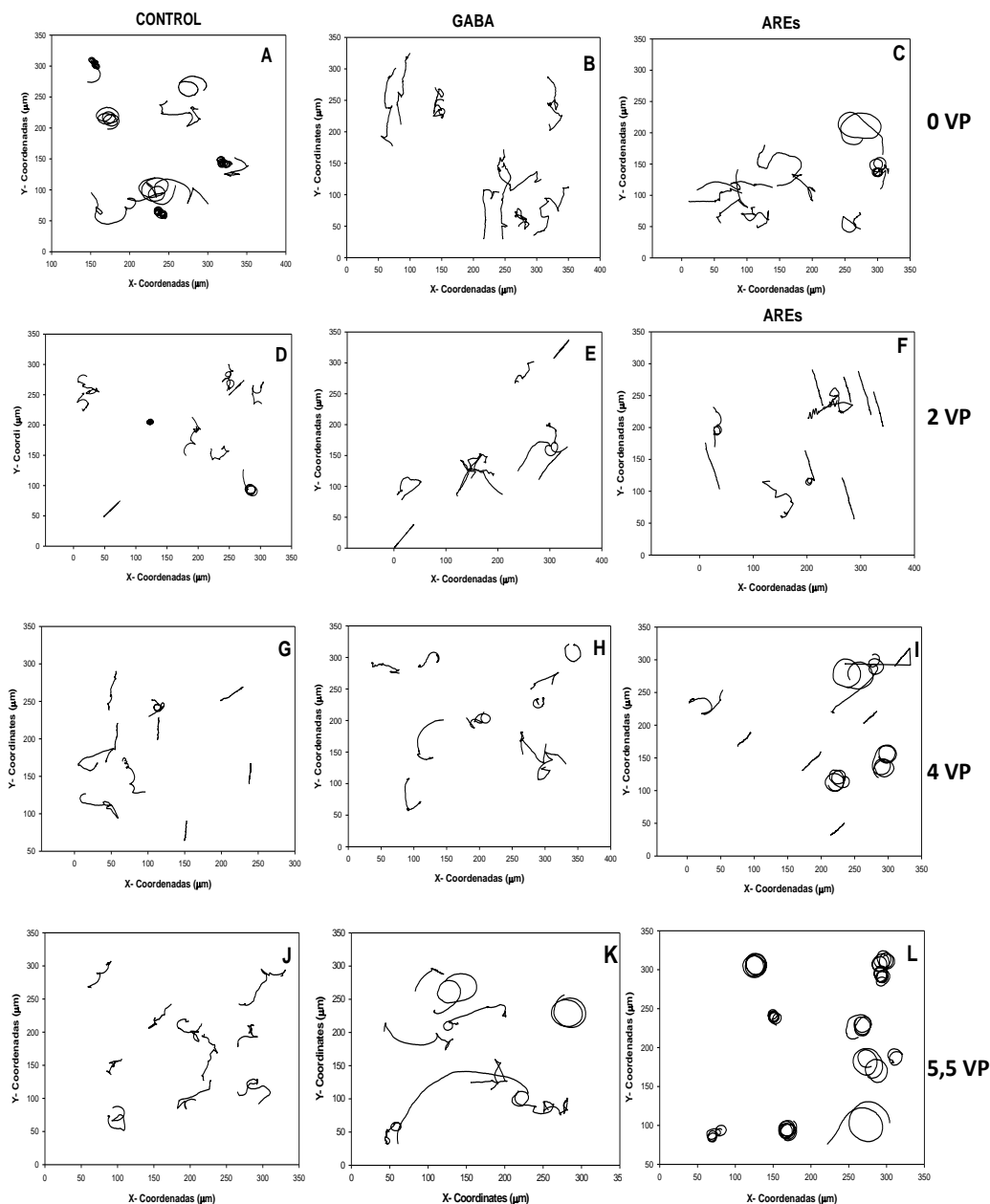


**Tabla 4.10.** Análisis cuantitativo de la movilidad celular en los influentes y efluentes de las columnas con pireno en función del tiempo experimental [(Volumen de poro: VP)].

Tratamiento	Tiempo (h)	Tiempo (VP)	Influente		Efluente	
			Número de cambios de dirección <sup>a</sup>	Número de aceleraciones <sup>b</sup>	Número de cambios de dirección	Número de aceleraciones
Control	0	0	43,1 ± 8,59	0,6 ± 1,07	-	-
	1	2	41 ± 10,98	1,5 ± 1,84	63,9 ± 8,54	1 ± 2,31
	2	4	36,8 ± 8,01	0,1 ± 0,32	40,9 ± 4,09	0,2 ± 0,63
	2,75	5,5	40,4 ± 5,30	0,4 ± 0,70	43,1 ± 6,97	1,6 ± 3,44
GABA	0	0	47,5 ± 8,91	4,2 ± 7,50	-	-
	1	2	39,02 ± 6,25	8 ± 11,12	56 ± 9,71	0
	2	4	30,2 ± 2,85	13,8 ± 13,04	46,8 ± 7,36	18,7 ± 26,71
	2,75	5,5	24,1 ± 9,23	17,1 ± 17,02	36,4 ± 2,88	3,3 ± 5,81
AREs	0	0	39,6 ± 7,23	2,1 ± 3,18	-	-
	1	2	20,7 ± 11,40	6,6 ± 7,81	47,6 ± 8,03	7,7 ± 17,01
	2	4	17,18 ± 9,32	33,72 ± 33,50	31,5 ± 5,42	27,5 ± 30,33
	2,75	5,5	11,7 ± 6,81	98,5 ± 81,06	19,94 ± 4,92	0,82 ± 1,92

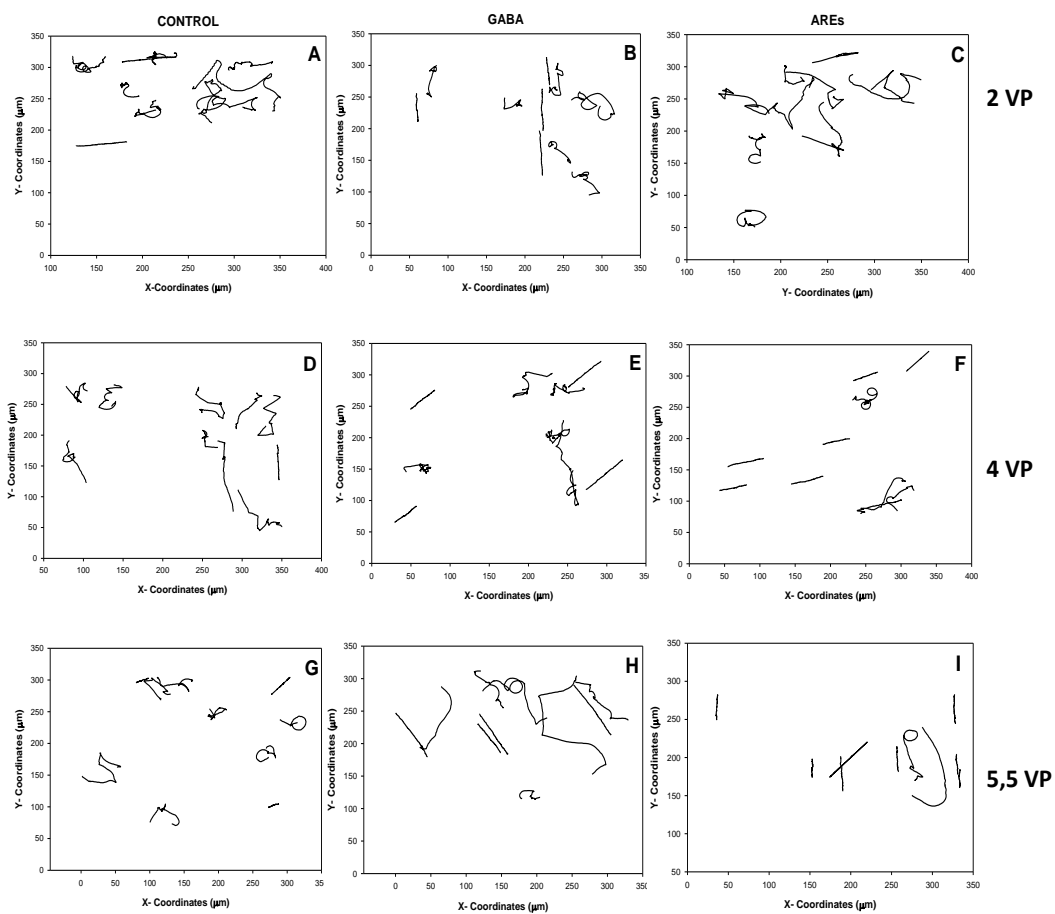
<sup>a</sup> Los números de cambios de dirección se calcularon por duplicado como la suma de los valores superiores a  $1.000^0 \text{ s}^{-1}$  para 10 trayectorias representativas en cada situación experimental. <sup>b</sup> En el caso de los picos de aceleración, los datos se tomaron a partir del sumatorio de las velocidades superiores a  $50 \mu\text{m s}^{-1}$ . GABA y ARES se utilizaron como quimioefectores a una concentración de 0,75 mM. La movilidad de la estirpe en los efluentes siguió el mismo patrón mostrado en los influentes.





**Figura 4.30.** Análisis de la movilidad de *P. putida* G7 en presencia de los quimioefectores GABA y AREs a una concentración de 0,75 mM. Se analizaron diferentes tiempos experimentales: 0 VP (A, B y C), 2 VP (D, E y F), 4 VP (G, H e I) y 5,5 VP (J, K y L) para observar los cambios en el patrón de motilidad celular en los influentes de las columnas. En el control no se añadió quimioefector.





**Figura 4.31.** Análisis de la movilidad de *P. putida* G7 en presencia de los quimioefectores GABA y AREs a una concentración de 0,75 mM. Los efluentes de salida de las columnas, se analizaron a diferentes tiempos experimentales: 2 VP (A, B y C), 4 VP (D, E y F) y 5,5 VP (G, H e I). El tiempo inicio de experimento (0 VP) no se analizó, ya que el frente bacteriano aún no había atravesado las columnas. En el control no se añadió quimioefector.



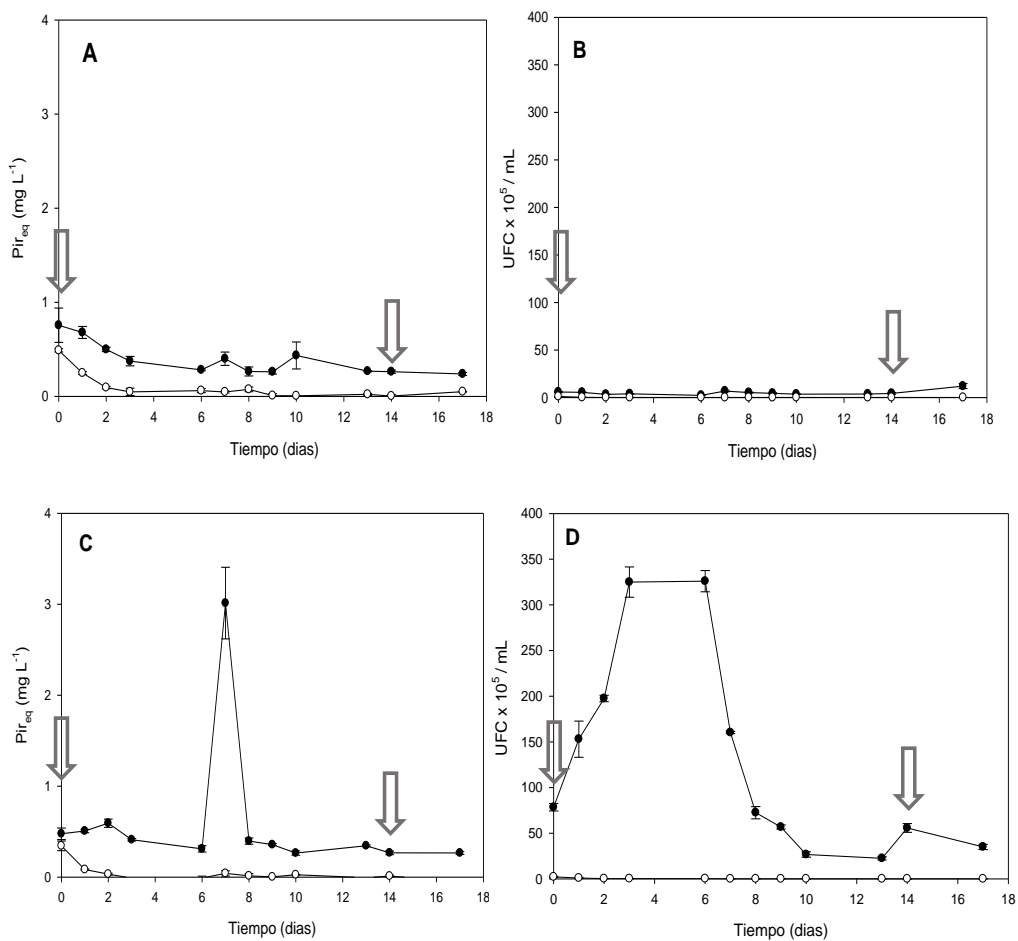
## 4.6. ANÁLISIS Y DISMINUCIÓN DEL RIESGO EN LA TRANSFORMACIÓN DE PIRENO EN SISTEMAS POROSOS

### 4.6.1. CARACTERIZACIÓN DEL COMETABOLISMO DE PIRENO EN EMBUDOS POROSOS Y EFECTO DE LA TRAMPA DE BIOCARBÓN

Se realizaron estudios previos en el laboratorio en embudos para caracterizar la transformación cometabólica de pireno por *P. putida* G7 y su movilización en la arena. Para ello, se empleó la acción combinada de las bacterias con plantas de girasol aprovechando la taxis bacteriana hacia los exudados producidos por estas plantas (Rolando y col., 2020; Fernández-López y col., 2021). Los resultados de los percolados (figura 4.32) evidenciaron un número significativamente mayor de células de *P. putida* en los lixiviados de los embudos que recibieron AREs (figura 4.32.D) comparados con los controles (figura 4.32.B). Este efecto fue máximo a los 3 y 6 días después de la adición de los AREs. Los resultados también mostraron que el paso de las bacterias hacia los percolados se vió impedido por la presencia de la capa de biocarbón, tanto con como sin AREs. La medida del  $^{14}\text{C}$  en los lixiviados de los embudos evidenció concentraciones significativamente menores de  $\text{Pir}_{\text{eq}}$  en los embudos que contenían biocarbón, tanto con (figura 4.32.C) como sin (figura 4.32.A) la adición de AREs. A los 7 días se observó un pico en la concentración de  $\text{Pir}_{\text{eq}}$  en los embudos en los que se había añadido AREs y no contenían la capa de biocarbón (figura 4.32.C), coincidiendo con la aparición del frente bacteriano en los lixiviados (figura 4.32.D). La concentración detectada ( $3,01 \pm 0,79 \text{ mg L}^{-1}$ ) resultó superior a la solubilidad del contaminante en agua, lo que es indicativo de la formación de metabolitos solubles.







**Figura 4.32.** Determinación de la concentración de equivalente de pireno ( $Pir_{eq}$ ) (gráfica A y C) y de la movilización de *Pseudomonas putida* G7 (gráficas B y C) a través de los lixiviados en los experimentos de embudos. El efecto de la presencia (línea círculos blancos) o de la ausencia (línea círculos negros) del biocarbón se representa en cada una de las situaciones experimentales. Se introdujeron exudados artificiales de raíces de girasol a una concentración de 1,25 mM (gráficas C y D) para promover la movilización de la estirpe, y se comparó con el experimento control en el que solo se añadió bacteria (gráficas A y B). Las flechas representan los tiempos de inoculación bacteriana para cada una de las situaciones experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar de los embudos por duplicado.



También se determinó la concentración de  $^{14}\text{C}$  en la arena a tiempo final. El material poroso se dividió en 3 capas: la capa superior, la capa central y la capa inferior, donde en algunas de las situaciones se encontraba el biocarbón (véase materiales y métodos). Los resultados mostraron que en la mayoría de los tratamientos sin biocarbón el pireno se concentraba en la capa central de los embudos, detectándose radioactividad en las capas inferiores pero sin diferencias significativas entre los embudos control y en los que se inocularon bacterias (tabla 4.11). En el caso de los embudos donde se añadió biocarbón se observaron diferencias entre los controles y la adición de bacterias, donde la mayor parte de la radiactividad se centró en las capas inferiores (donde se añadió el material adsorbente). Este no fue el caso del control, donde se mostró una situación similar a la de los embudos sin adición de biocarbón. Además, las concentraciones de pireno detectadas cuando se añadieron bacterias fueron inferiores a la de los controles, lo que sugiere un cometabolismo activo por parte de la estipe.

	Control		biocarbón		bacteria		bacteria + biocarbón	
	Embudo 1	Embudo 2	Embudo 1	Embudo 2	Embudo 1	Embudo 2	Embudo 1	Embudo 2
Arriba	0,05	0	0	0,12	0	0	0	0
Centro	2,35	2,83	0,05	3,52	0,13	1,57	0,03	0,01
Abajo	0,94	0,65	3,14	0,54	0,50	2,08	1,66	0,59

	bacteria + AREs		bacteria + AREs + biocarbón	
	Embudo 1	Embudo 2	Embudo 1	Embudo 2
Arriba	0,17	0,32	0	0
Centro	2,01	0,43	0,01	0
Abajo	0,64	0	0,66	0,31

**Tabla 4.11.** Concentración de  $\text{Pir}_{\text{eq}}$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en las diferentes partes de los experimentos del embudo. En todas las situaciones experimentales, el pireno se añadió a la capa central de arena a una concentración de  $8,67 \text{ mg kg}^{-1}$ .



#### 4.6.1.1. Adhesión a arena y biocarbón

Debido a la elevada turbidez causada por el biocarbón en suspensión acuosa se empleó una menor cantidad de arena y biocarbón que en los anteriores ensayos de adhesión. Las diferencias en adhesión entre ambas superficies porosas fue significativo. Los experimentos con arena mostraron valores de adhesión de  $16,67 \pm 1,67$  % para los frascos sin efectores químicos y  $8,04 \pm 1,79$  % con la presencia de AREs. Para la misma proporción de biocarbón, los resultados se incrementaron hasta un  $65,51 \pm 7,66$  y  $25,57 \pm 8,37$  % para el control y AREs, respectivamente. Estos resultados indican que las bacterias pudieron quedar retenidas en gran proporción en el biocarbón, creando un nicho ecológico favorable para propiciar su actividad biodegradadora.

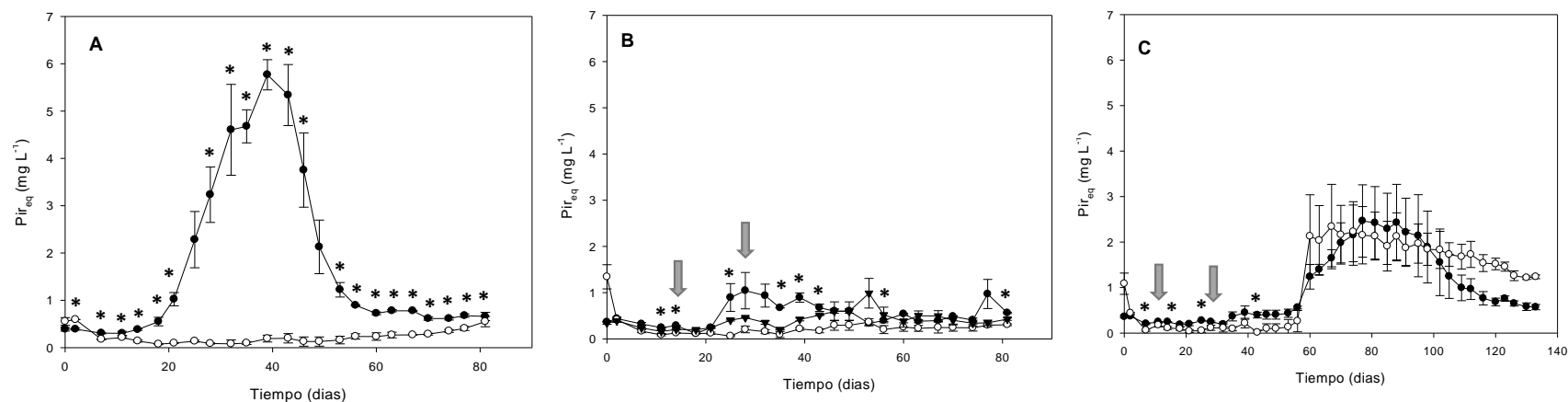
#### 4.6.2. MOVILIZACIÓN DEL PIRENO EN PERCOLADOS Y PLANTAS

La evolución a lo largo del tiempo de la concentración de equivalentes de pireno ( $Pir_{eq}$ ) en los lixiviados de las macetas se presenta en la figura 4.33. El desarrollo de la planta provocó un aumento significativo de la concentración de  $Pir_{eq}$  en los tratamientos en macetas no inoculadas a los 20 días (figura 4.33.A), alcanzando su concentración máxima a los 39 días. La concentración del compuesto también aumentó con la inoculación de las bacterias (realizada en dos fases, indicadas por las flechas en la figura 4.33 a, aproximadamente, los 20 días de experimentación en los lixiviados de las macetas plantadas con girasol (aproximadamente  $1 \text{ mg L}^{-1}$  con dos inoculaciones, figura 4.33.B). Este aumento de la concentración de  $Pir_{eq}$  no se observó en las macetas plantadas en las que se situó una capa de biocarbón en el fondo, con y sin inoculación. De hecho, las concentraciones de  $Pir_{eq}$  en los lixiviados de estas macetas fueron estadísticamente menores (t-student,  $P \leq 0,05$ ) que las correspondientes macetas sin biocarbón durante varios tramos del experimento (figura 4.33.A y 4.33.B). La inoculación no provocó la movilización del pireno en los lixiviados de las macetas sin plantar hasta los 40 días (figura 4.33.C), detectándose concentraciones máximas de  $Pir_{eq}$  más bajas que en las macetas plantadas que no recibieron inóculo bacteriano. Este aumento también se produjo en las macetas no plantadas con una capa de biocarbón. El muestreo en estos dos



tratamientos se mantuvo durante más tiempo (en comparación con las macetas plantadas, en las que el ciclo vital de las mismas forzó el final del experimento para asegurar el muestreo de la masa vegetal) para seguir la movilización del contaminante en etapas posteriores. Las concentraciones máximas de  $Pir_{eq}$  medidas en los tratamientos inoculados (figura 4.33.B y 4.33.C) superaron con creces la solubilidad del pireno en agua ( $0,135 \text{ mg L}^{-1}$ ), lo que indicó la presencia de metabolitos por la actividad cometabólica de la bacteria. Sin embargo, el pireno también se movilizó, incluso en mayor medida, en macetas plantadas que no recibieron inóculo (figura 4.33.A). La adsorción a la materia orgánica disuelta (MOD) también puede causar la movilización del contaminante y el aumento de su concentración en el medio acuoso (Yang y col., 2001; Zhu y col., 2009; Tian y col., 2017). Por ello se seleccionaron varios tiempos de muestreo para analizar los valores de carbono orgánico total (COT; empleadas para estimar los niveles de MOD), de tal forma que se reflejaran los picos de movilización de  $Pir_{eq}$  en los diferentes tratamientos (figura 4.33). Los resultados se muestran en la tabla 4.12. Las concentraciones de COT fueron menores en la mayoría de los lixiviados de las macetas con biocarbón, confirmando la buena capacidad de adsorción del material. El rango de concentraciones observado tanto en los tratamientos con planta sin biocarbón como sin inoculación (valores de entre  $13 \text{ mg L}^{-1}$  a  $32 \text{ mg L}^{-1}$ ), no fue suficiente para explicar la movilización de  $Pir_{eq}$  mediante adsorción a MOD. De acuerdo con los cálculos basados en el coeficiente de adsorción ( $K_{oc}$ ) del pireno y la concentración de COT en los lixiviados, la eventual adsorción del contaminante a la MOD solo habría duplicado su solubilidad en los lixiviados hasta  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  (tabla 4.13). Para confirmar experimentalmente que el  $^{14}\text{C}$ -pireno movilizado no se correspondía en su totalidad al compuesto parental, estas muestras de lixiviados se extrajeron con disolventes orgánicos y se analizaron por HPLC. El análisis dio una concentración muy baja del compuesto. Por ejemplo, las muestras de lixiviado de macetas plantadas y no inoculadas que dieron una concentración máxima de  $5,76 \pm 0,64 \text{ mg L}^{-1}$  a los 38 días tenían una concentración de pireno de  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (tabla 4.13). Estos resultados indican que los metabolitos solubles en agua fueron producidos por la acción directa de la planta, explicando así las altas concentraciones de  $Pir_{eq}$ .





**Figura 4.33.** Evolución de la concentración de equivalentes de pireno ( $Pir_{eq}$ ) en macetas plantadas (A y B) y en macetas sin plantar (C). Las líneas de círculos negros representan los tratamientos con plantas sin inoculación (A), plantas e inoculación (B) e inoculación sin plantas (C), respectivamente. En la gráfica B, se aplicaron una (línea de triángulos negros) o dos (línea de círculos negro) inoculaciones. En el caso de la línea de círculos blancos, había una capa de biocarbón en el fondo de las macetas. Las macetas con biocarbón en B y C recibieron inoculaciones. Los resultados se muestran a partir de macetas duplicadas. Las flechas indican las inoculaciones con *Pseudomonas putida* G7. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas (t-student,  $P \leq 0,05$ ) entre cada tratamiento con y sin biocarbón.



**Tabla 4.12.** Determinación del carbono orgánico mediante medidas de carbono orgánico total (COT) en las muestras de lixiviados de los diferentes tratamientos empleados en el ensayo de invernadero. ND, No detectado.

Tratamiento	Tiempo (días)	COT (mg L <sup>-1</sup> )
Plantas sin inoculación	35	25.37 ± 2.84
	39	17.28 ± 5.58
	49	15.65 ± 7.13
Plantas sin inoculación + biocarbón	35	21.26 ± 4.11
	39	7.35 ± 1.39
	49	3.38 ± 2.23
Plantas e inoculación 2x	25	15.31 ± 1.70
	28	12.71 ± 1.34
	32	14.61 ± 1.97
	35	31.96 ± 6.80
	39	16.97 ± 0.65
	43	15.26 ± 0.97
Plantas e inoculación 2x + biocarbón	25	12.99 ± 18.36
	28	3.20 ± 4.52
	32	6.70 ± 2.22
	35	24.63 ± 8.60
	39	7.16 ± 3.04
	43	4.07 ± 3.21
Inoculación 2x sin planta	39	8.62 ± 1.05
	70	8.90 ± 0.97
	74	9.40 ± 1.58
	77	8.71 ± 1.27
Inoculación 2x sin planta + biocarbón	39	ND
	70	ND
	74	ND
	77	ND

**Tabla 4.13.** Comparación entre Pir<sub>eq</sub> y la concentración de pireno en muestras de lixiviado seleccionadas.

Tratamiento	Día muestreo (d)	Pir <sub>eq</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Pireno (µg L <sup>-1</sup> )	COT (mg L <sup>-1</sup> )	Max. Capac. Pir (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Área del pico de P-4-C <sup>b</sup>
Plantas sin inoculación	38	5.76 ± 0.64	0.9 ± 0.1	17.3 ± 5.6	0.25	116558521
Plantas e inoculación 2x	28	1.04 ± 0.79	1.5 ± 0.70	12.7 ± 1.3	0.22	949009

<sup>a</sup>Calculado a partir de la concentración del carbono orgánico total de la tabla 4.13

<sup>b</sup>P-4-C, ácido fenantreno-4-carboxílico



La distribución de  $Pir_{eq}$  en las diferentes partes de la planta se muestra en la tabla 4.14. En general, los resultados tienen concordancia con la movilización de pireno observada en los lixiviados. Con la excepción de las raíces, se midieron concentraciones de  $Pir_{eq}$  significativamente más altas ( $P \leq 0,05$ ) en los tejidos de las plantas que crecieron en macetas sin inóculo ni biocarbón (sin inocular, véase tabla 4.14). Este tratamiento, al igual que las macetas con dos inoculaciones, se caracterizó por la ausencia de diferencias estadísticas significativas entre los distintos tejidos, es decir, el pireno se distribuyó de forma homogénea por las plantas. En el resto de tratamientos se observaron concentraciones de  $Pir_{eq}$  significativamente mayores en las raíces, en comparación con los tallos, hojas y flores.

**Tabla 4.14.** Concentración de equivalentes de pireno en muestras de planta ( $mg\ kg^{-1}$  peso seco) en condiciones experimentales de invernadero.

	Sin inoculación	Sin inoculación + biocarbón	Inoculación 1x	Inoculación 2x	Inoculación 2x + biocarbón
<b>Raíz</b>	88.37 ± 35.65 Aa	159.12 ± 83.67 Aa	256.29 ± 86.68 Aa	91.90 ± 104.28 Aa	166.72 ± 73.37 Aa
<b>Tallo</b>	130.21 ± 47.10 Aa	15.04 ± 4.69 Bb	19.70 ± 2.62 Bb	29.26 ± 7.83 Ba	22.97 ± 7.98 Bb
<b>Hoja</b>	92.06 ± 42.92 Aa	17.63 ± 2.59 Bb	17.33 ± 5.65 Bb	25.92 ± 3.71 Ba	27.17 ± 13.76 Bb
<b>Flor/Fruto</b>	64.77 ± 6.90 Aa	21.31 ± 4.01 Bb	26.47 ± 10.14 Bb	19.80 ± 7.57 Ba	31.42 ± 6.77 Bb

<sup>a</sup> Los valores de una fila seguidos de la misma letra, no son significativamente diferentes.

<sup>b</sup> Los valores de una columna seguidos de la misma letra minúscula, no son significativamente diferentes.



#### 4.6.3. RESPUESTA DE LA PLANTA

La concentración inicial de pireno en el suelo no tuvo efectos significativos en las plantas ni en el porcentaje de germinación de las semillas. Tampoco tuvo influencia en el desarrollo normal de la planta ni en la floración. Por tanto, las plantas de girasol toleraron bien las condiciones de crecimiento en presencia del contaminante. El porcentaje de germinación de las semillas fue del 78,12 % a los 6 días del inicio del experimento y del 100 % a los 24 días. A medida que avanzaba el experimento, la longitud de la planta alcanzó una media de 68,83 cm a los 44 días y de 96,94 cm a los 63 días. El porcentaje de plantas florecidas se situó en un 92,5 % a los 28 días. A los 49 días, todas las plantas presentaban floración. No se encontraron diferencias entre tratamientos con respecto al peso fresco al final del ensayo (tabla 4.15). Solo en el caso de las hojas, el peso fresco en presencia de biocarbón fue estadísticamente mayor (2,31 g) que el obtenido en ausencia del mismo (1,63 g), indicando una baja influencia en el desarrollo de la planta, así como en la mayoría de los casos, de la adición del biocarbón. De acuerdo con el ciclo ontogénico del girasol en las condiciones de invernadero, las plantas comenzaron a decaer a los 60 días de experimentación. No se encontraron diferencias significativas ente los parámetros estudiados en relación con la inoculación bacteriana (t-student  $p \leq 0,05$ ).





**Tabla 4.15.** Valores de peso fresco de las plantas completas y los diferentes órganos por tratamiento. N es el número de muestras para cada tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (test de Turkey,  $P \leq 0.05$ ) entre cada uno de los tratamientos empleados.

Peso fresco (g)	Tratamiento	N	Media (g)
<b>Raíz</b>	<sup>14</sup> C-pireno	16	4.49 A
	<sup>12</sup> C-pireno	24	4.01 A
	Con biocarbón	14	4.89 A
	Sin biocarbón	26	3.83 A
	Inoculación	20	3.85 A
	Sin inoculación	20	4.59 A
<b>Tallo</b>	<sup>14</sup> C-pireno	16	10.33 A
	<sup>12</sup> C-pireno	24	9.46 A
	Con biocarbón	14	10.21 A
	Sin biocarbón	26	9.60 A
	Inoculación	20	9.51 A
	Sin inoculación	20	10.14 A
<b>Hojas</b>	<sup>14</sup> C-pireno	16	2.13 A
	<sup>12</sup> C-pireno	24	1.69 A
	Con biocarbón	14	2.31 B
	Sin biocarbón	26	1.63 A
	Inoculación	20	1.69 A
	Sin inoculación	20	2.06 A
<b>Flores/frutos</b>	<sup>14</sup> C-pireno	16	3.04 A
	<sup>12</sup> C-pireno	24	2.96 A
	Con biocarbón	14	3.25 A
	Sin biocarbón	26	2.86 A
	Inoculación	20	2.70 A
	Sin inoculación	20	3.32 A
<b>Planta completa</b>	<sup>14</sup> C-pireno	16	20.95 A
	<sup>12</sup> C-pireno	24	17.52 A
	Con biocarbón	14	21.89 A
	Sin biocarbón	26	17.27 A
	Inoculación	20	19.67 A
	Sin inoculación	20	18.03 A



#### 4.6.4. ESTUDIO DE LAS DETERMINACIONES MICROBIANAS Y BIOQUÍMICAS

En las macetas sin planta, la mayor parte de la actividad de la deshidrogenasa (DH) (alrededor del 90 %) se detectó en la capa superior (tabla 4.16). Cuando las plantas estaban presentes y en ausencia de biocarbón, la actividad enzimática se distribuyó entre la parte superficial (aproximadamente el 60 %) y la capa central (20 %). La parte inferior no mostró una actividad muy significativa. En las macetas que contenían biocarbón, no se detectó actividad de DH en las capas inferiores. Aparentemente, no había actividad microbiana en estas muestras, aunque no pudo descartarse la posibilidad de que el biocarbón hubiera interferido en el procedimiento analítico. De estos resultados puede destacarse que las plantas facilitaron la movilización de la estirpe y a su distribución a través del sustrato. Estos datos parecen estar de acuerdo con resultados previos sobre la promoción del transporte de esta cepa mediante taxis a los componentes de la MOD del girasol a una concentración de COT de 16 mg L<sup>-1</sup> (Jimenez-Sanchez y col., 2015), y son comparables a las detectadas en los lixiviados de las macetas con plantas. La determinación del conteo de viables en muestras de arena (aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup>) mostró que las células de *P. putida* G7 seguían activas al final del experimento, y eran capaces de crecer en medio agar selectivo (MSB con cristales de naftaleno como única fuente de carbono) manteniendo incluso, su capacidad móvil (observada mediante visu al microscopio). Sin embargo, debido a la elevada variabilidad en el conteo de las UFC, no se pudo establecer una relación clara entre los diferentes tratamientos y la altura en el perfil de la maceta.



**Tabla 4.16.** Actividad de la deshidrogenasa (en  $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , media  $\pm$  desviación estándar) en muestras de arena del experimento de macetas a 3 profundidades diferentes (81 d).

	Plantas sin inoculación	Plantas sin inoculación + biocarbón	Plantas con inoculación 2x	Plantas con inoculación 2x + biocarbón	Inoculación 2x sin planta	Inoculación 2x sin planta + biocarbón
<b>Arriba</b> <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.38 ABa	0.96 $\pm$ 0.14 ABa <sup>c</sup>	1.49 $\pm$ 0.11 Ba	0.55 $\pm$ 0.31 Aa <sup>c</sup>	2.42 $\pm$ 0.57 Ca	3.67 $\pm$ 0.18 Da <sup>c</sup>
<b>Centro</b> <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.07 Ab	0.76 $\pm$ 0.07 Bb <sup>c</sup>	1.06 $\pm$ 0.18 Bb	0.80 $\pm$ 0.24 Ba <sup>c</sup>	0.29 $\pm$ 0.20 Ab	0.35 $\pm$ 0.01 Ab <sup>c</sup>
<b>Abajo</b> <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.08 ABb	ND <sup>d</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 Bc	ND <sup>d</sup>	0.10 $\pm$ 0.00 Ab	ND <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Valores de una fila seguidos de la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes (ANOVA,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>b</sup> Valores de una columna seguidos de la misma letra minúscula no son significativamente diferentes (ANOVA,  $P \leq 0.05$ ).

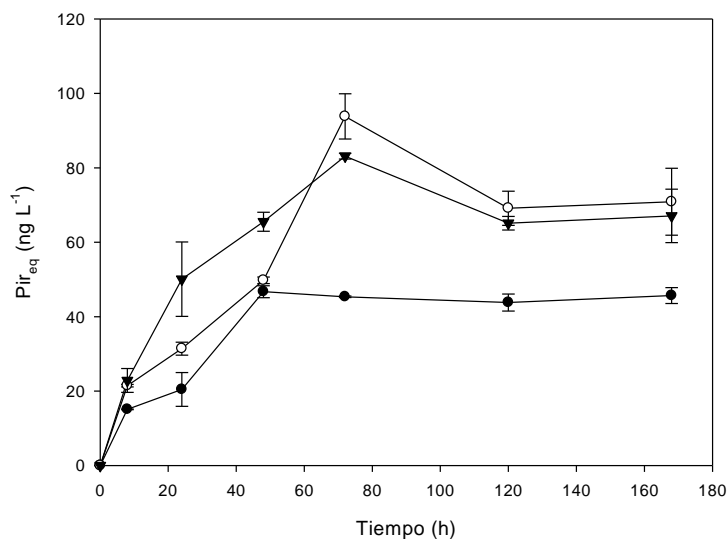
<sup>c</sup> Valores de una columna seguidos de la misma letra minúscula no son significativamente diferentes (Student's t test,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>d</sup>ND, no detectado



Dado que, como se comentó con anterioridad, las macetas plantadas que no recibieron inóculo desarrollaron una movilización significativa del *Pireq* en los lixiviados, es razonable pensar que esta movilización esté causada por la transformación directa del pireno por la planta. Para excluir cualquier interferencia en la transformación del pireno por contaminación cruzada debida a otros microorganismos desarrollados de forma eventual en la maceta, se realizó un control microbiológico con muestras de sustrato obtenidas a tiempo final del experimento. Este control reveló la presencia de un número muy bajo de colonias ( $<10^3$  UFC g<sup>-1</sup>) con morfología diferente a las colonias de PPG7, en comparación con el elevado número de colonias observadas en las macetas inoculadas (véase más arriba). La presencia de diferentes bacterias era esperable ya que no existían condiciones de esterilidad en el invernadero. La baja concentración a la que se encontraban otros organismos también excluyó la posibilidad de una transformación significativa del pireno. No obstante, se aislaron en medio TSA dos tipos de colonias observadas en las placas, y se determinó su capacidad para la transformación del pireno en matraces mediante sistema de dopaje pasivo con <sup>14</sup>C-pireno. En el experimento de mineralización (figura 4.34) no se detectó <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> en las trampas de sosa para ninguna de las especies y el reparto del pireno en la fase acuosa, mostró resultados similares a los experimentos control (condiciones abióticas). Por tanto, la transformación por las plantas parecer ser la explicación más probable.





**Figura 4.34.** Mineralización y reparto de <sup>14</sup>C-pireno de dos aislados del experimento invernadero. El ensayo se llevó a cabo en matraces de 100 mL con MSB y anillas de silicona cargadas con 100.000 dpm de <sup>14</sup>C-pireno. 1 mL de los matraces se recogió y midió en un contador de centelleo. El experimento control (sin bacteria, línea de puntos negros) y el aislado 1 (línea de puntos blancos) y aislado 2 (línea de triángulos) no mostraron diferencias significativas en la distribución del pireno en la fase acuosa. No se detectó mineralización en ninguno de los casos (1 mL de NaOH de las trampas). Se realizaron 2 réplicas para cada tratamiento.

#### 4.6.5. METABOLITOS PRODUCIDOS POR COMETABOLISMO

Para analizar los metabolitos del pireno se seleccionaron duplicados de muestras de lixiviados que contenían pireno no marcado, siguiendo los resultados obtenidos en paralelo en las macetas con marcaje que dieron lugar a unas mayores concentraciones de equivalentes de pireno (Pir<sub>eq</sub>) (véase sección 4.6.2).

Se realizó un análisis mediante UHPLC-MS y se utilizó el modo de ionización en positivo y negativo (figura 4.35). Se encontró un metabolito principal del pireno, con fórmula C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>, con tiempo de retención de 6,1 min y una masa molecular de 222,05969 (Figura 4.35.B). Para asegurar la asignación de estos datos al compuesto, se utilizó un segundo software de procesamiento de datos (Tracefinder) que, utilizando la masa molecular exacta, mostró la fragmentación



correspondiente a este metabolito. La biblioteca de espectros de masas lo atribuyó al compuesto ácido fenantreno-4-carboxílico (P-4-C, también llamado ácido 4-fenantrónico). Este compuesto dió lugar al ion  $[M-H]^-$  en el procedimiento de modo ión negativo, correspondiente a la pérdida de un grupo ácido y a la aparición de fragmentación a  $m/z$  177,07097 (figura 4.33.C). Aunque no fue posible realizar un análisis cuantitativo detallado debido a la falta de un estándar apropiado, las diferencias relativas en las áreas de los picos de P-4-C en estas dos muestras (tabla 4.16), sugirieron una concentración 100 veces mayor de este metabolito en el tratamiento plantado no inoculado en comparación con el tratamiento plantado que recibió inoculación. Además, este compuesto se identifica como un metabolito del pireno en algunas propuestas de vías de degradación del contaminante (Pugazhendi y col., 2017), demostrando que la degradación del pireno ha tenido lugar en estos tratamientos. Los picos del pireno además se identificaron en todos los cromatogramas a un tiempo de retención de 5,5 min, lo que indica que el pireno se degradó en su mayor parte después de 25 días. Lamentablemente, no pudieron identificarse otros metabolitos del pireno, probablemente, debido a que no estaban en concentraciones suficientes para su detección.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE23e00010408683

CSV

GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e

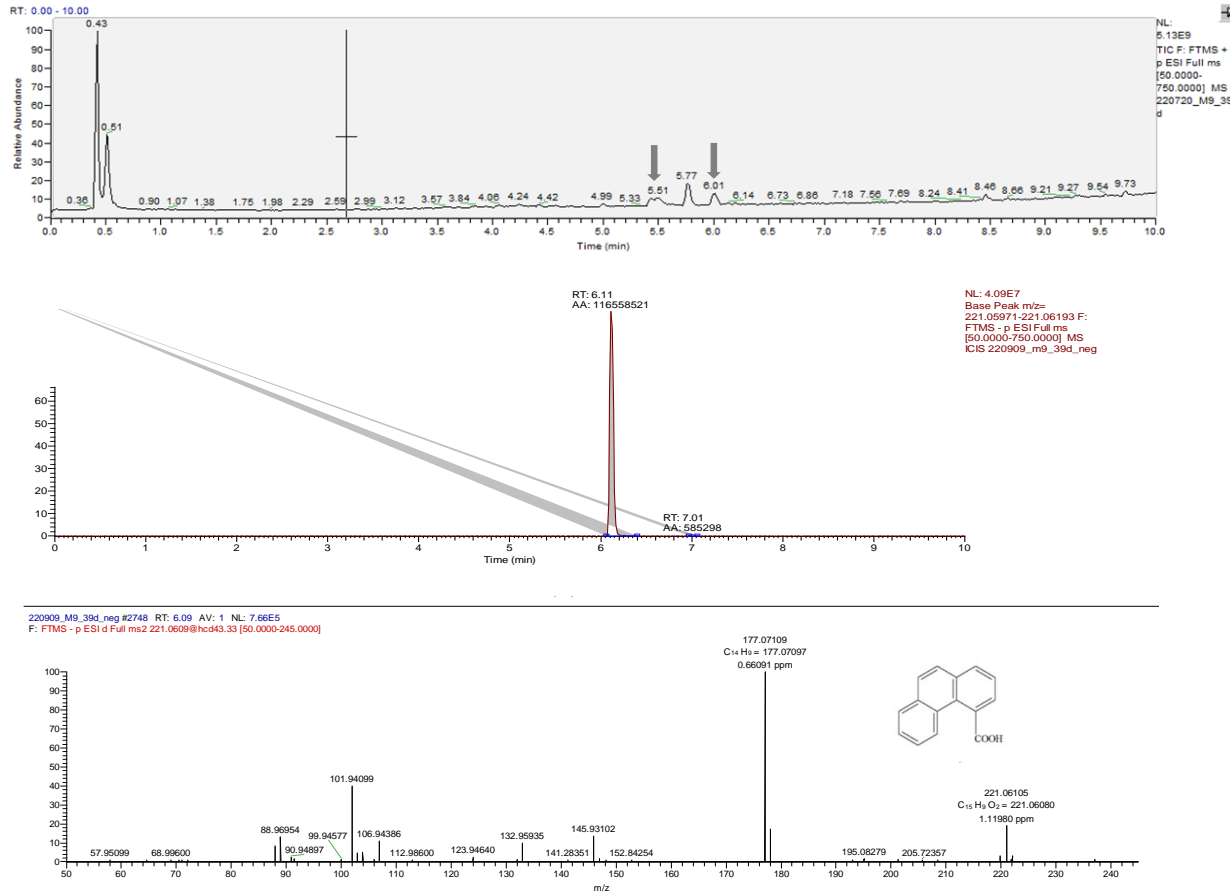
DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular





**Figura 4.35.** Análisis de una muestra de lixiviado (maceta plantada sin inocular, 39 d) mediante UHPLC-MS. A, fragmento del cromatograma completo analizado en modo de ionización positiva, donde la primera flecha indica el pico del pireno y la segunda flecha indica el pico del metabolito identificado. B, cromatograma de iones m/z 221,06 que muestra el área y el tiempo de retención del metabolito. C, espectro de masas del ión [M-H]<sup>-</sup> del metabolito, identificado como ácido fenantreno-4-carboxílico.



#### 4.6.6. FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN, TRANSLOCACIÓN Y RIESGO

En la tabla 4.17 se muestran los valores de BCF y TF en las muestras de plantas después de su recogida. Estos datos se determinaron para las distintas partes de la planta. En el caso de las raíces, los valores mostrados fueron superiores cuando se adicionó bacterias al sistema que cuando encontramos la planta sin inoculación en las macetas. La adición de biocarbón también supuso una mayor interacción de las raíces con el compuesto. Para tallos y hojas, los datos de factor de bioconcentración mostraron un patrón inverso al caso anterior, donde los valores máximos se registraron en los tratamientos no inoculados (tabla 4.17). Comparando las raíces con el resto de órganos de la planta (tallo, hojas, flores/fruto), los valores se situaron muy por debajo de los mostrados en el primer caso. El girasol por si solo mostró los valores más altos de BCF para el resto de órganos, mientras que en los otros tratamientos, las diferencias no fueron muy significativas para tallo, hojas y flor/fruto. Cabe destacar que la aplicación conjunta de bacteria y biocarbón en asociación con la planta, supuso los mayores valores de BCF tras el girasol como único elemento del sistema.

En cuanto a los valores de TF medidos a partir de la radioactividad de las distintas partes del girasol a tiempo final, fueron diferentes según tratamiento aplicado. De nuevo, los valores más altos de TF se dieron en el caso de las macetas con girasol sin inocular y sin biocarbón. Los tratamientos con 2 inoculaciones bacterianas mostraron valores algo superiores a los mostrados para el resto de tratamientos en todos los casos. Estos resultados indican que los tratamientos redujeron significativamente la movilización de  $Pir_{eq}$  en las plantas.

Referidos a los valores de riesgo asociado a lixiviado (HQ) indicaron que hubo una disminución del riesgo cuando se añadió la bacteria a las macetas de girasol en comparación con las macetas que solo fueron plantadas (tabla 4.18). Además, el uso del biocarbón redujo significativamente el riesgo tanto para las macetas inoculadas como para las no inoculadas, siendo esta reducción mayor cuando se utilizó la combinación planta-bacteria-biocarbón en comparación con los tratamientos donde no se empleó el adsorbente.





**Tabla 4.17.** Factores de bioconcentración (BCF, L kg<sup>-1</sup>) y translocación (TF) en muestras de plantas (raíz, tallo, hojas y frutos) en condiciones de invernadero.

		Sin inoculación	Sin inoculación + biocarbón	Inoculación 1x	Inoculación 2x	Inoculación 2x + biocarbón
<b>BCF</b>	<b>Raíz</b>	1.95 ±0.77A	8.40 ±5.11AB	12.37 ±4.56B	3.38 ±3.96A	7.65 ±4.16AB
	<b>Tallo</b>	2.88 ±1.00A	0.76 ±0.18B	0.95 ±0.15B	1.06 ±0.31B	1.02 ±0.31B
	<b>Hoja</b>	2.02 ±0.93A	0.90 ±0.06B	0.83 ±0.28B	0.93 ±0.13B	1.14 ±0.39AB
	<b>Flor/Fruto</b>	1.43 ±0.25A	1.09 ±0.12A	1.31 ±0.62A	0.71 ±0.25A	1.40 ±0.34A
<b>TF</b>	<b>C<sub>tallo</sub>/C<sub>raíz</sub></b>	1.85 ±1.27A	0.12 ±0.08B	0.09 ±0.04B	0.65 ±0.50AB	0.12 ±0.08B
	<b>C<sub>hoja</sub>/C<sub>raíz</sub></b>	1.28 ±0.87A	0.14 ±0.06B	0.08 ±0.05B	0.57 ±0.38AB	0.22 ±0.21B
	<b>C<sub>fruto</sub>/C<sub>raíz</sub></b>	0.82 ±0.30A	0.17 ±0.10B	0.11 ±0.04B	0.41 ±0.34AB	0.24 ±0.16B

<sup>a</sup> Valores en una fila seguidos de la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes (ANOVA, P ≤ 0.05).



**Tabla 4.18.** Evaluación del riesgo (HQ) de los lixiviados para los distintos tratamientos empleados en el ensayo invernadero

Tratamiento	HQ lixiviados (ingestión)	
	Adultos	Niños
Plantas sin inoculación	1,67	1,62
Plantas sin inoculación + biocarbón	0,22	0,22
Plantas con inoculación 1x	0,39	0,37
Plantas con inoculación 2x	0,51	0,49
Plantas con inoculación 2x + biocarbón	0,25	0,24
Inoculación sin planta	0,75	0,73
Inoculación sin planta + biocarbón	0,73	0,71



## 5. DISCUSIÓN

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



## 5.1. PAPEL DE LA ELECTROCINÉTICA EN LA BIODEGRADACIÓN

En nuestro estudio, la degradación de naftaleno por *P. fluorescens* LP6a se incrementó con la aplicación de una corriente eléctrica en comparación con las columnas control, donde se estudió la actividad degradadora de la estirpe en ausencia de un campo eléctrico. Bajo este contexto, el potencial eléctrico tuvo una doble influencia en el proceso de biodegradación: controlar la deposición bacteriana y facilitar la movilización e interacción del contaminante con las células adheridas al material poroso. Para facilitar el proceso de deposición bacteriana en las columnas, fue fundamental emplear un voltaje de baja intensidad ( $1 \text{ V cm}^{-1}$ ) ya que corrientes eléctricas intensas pueden provocar un aumento muy significativo del transporte celular que impida la deposición controlada de los organismos degradadores o incluso dar lugar a su inactivación. Algunos estudios sobre la influencia de distintos campos eléctricos en la movilización bacteriana en sistemas porosos demostraron la relación entre la disminución de la deposición celular y el aumento de la intensidad de la corriente eléctrica empleada (Shan y col., 2018) así como de la disminución de la actividad de las células bacterianas (Zhang y col., 2021).

El efecto producido por la combinación de las fuerzas electrosmóticas y de electroforesis en la deposición bacteriana y el transporte del contaminante hacia las superficies cargadas (del ánodo al cátodo) (Kirby y Hasselbrink Jr., 2004), probablemente, estuvieran detrás de la mayor interacción del naftaleno con la estirpe bacteriana y con ello, del aumento de la biodegradación. Aunque el efecto sobre la biodegradación fue dependiente de la concentración de naftaleno empleada, los ensayos con células inactivadas permitieron demostrar la importancia de las interacciones celulares con el contaminante en el proceso de biodegradación. Y es que, a pesar de obtener unos valores de adhesión muy superiores a los mostrados cuando las células se encontraban en condiciones óptimas (65% frente a 20 %), no se observó ningún efecto en las concentraciones de naftaleno disuelto.



Una investigación sobre el papel de la electro-biorremediación en un suelo real contaminado con disolventes orgánicos parece estar en consonancia con estos datos. Se evaluó el bioaumentado potenciado por una corriente eléctrica, observándose que la distribución de la cepa bacteriana *Dehalococcoides* estaba impulsada por electroósmosis. Además, se observó el transporte de los compuestos clorados hacia el lado del ánodo, lo que aumentó la biodegradación de los contaminantes (Mao y col., 2012). Las investigaciones de Yuan y col., también respaldan los resultados obtenidos en esta tesis donde las tasas de degradación del contaminante n-hexadecano por parte de un consorcio bacteriano en un suelo modelo contaminado fueron de un 53,7% cuando se aplicó electro-biorremediación, lo que supuso un 20,3 % más en comparación la biorremediación en la que no se aplicó un campo eléctrico (Yuan y col., 2013). Con ello, en nuestro estudio existieron algunas limitaciones en el sistema de experimentación que provocaron una estabilización en las tasas de degradación de naftaleno. Esto pudo deberse a la capacidad limitante del medio tampón empleado, que impediría una actividad metabólica significativa a largo plazo de la estirpe por falta de algún nutriente. Aun así, el manejo del potencial eléctrico podría favorecer la deposición controlada de bacterias degradadoras de contaminantes que, además, verían aumentada su actividad metabólica por una mayor interacción bacteria-contaminante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio sobre el efecto de la electrocinética sobre la biodegradación de <sup>14</sup>C-fenantreno en un suelo arcilloso (Niqui-Arroyo y col., 2006). Los autores observaron una estimulación de la biodegradación debida al campo eléctrico y una cinética de biodegradación de primer orden en experimentos en ausencia del mismo, indicativa de una biodegradación dependiente de la concentración. Por lo tanto, era posible que el tratamiento electrocinético provocara una movilización de fenantreno hacia las células bacterianas, contribuyendo así a un aumento de la transferencia de masa y, por lo tanto, de la tasa de biodegradación de los compuestos dentro del suelo. De hecho, con una población típica de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> células g<sup>-1</sup>, las colonias de microorganismos degradadores en el suelo están separadas por una distancia promedio típica de 100 μm, y rodeadas por un entorno desolado donde el lento aporte de los



contaminantes hidrófobos por disolución y difusión a partir de fuentes distantes, dicta la tasa de biodegradación (Bosma y col., 1997). De acuerdo con este mecanismo, no habría sido necesaria una electro-movilización osmótica significativa de fenantreno a nivel macroescalar para la estimulación observada. Este mismo principio podría aplicarse a los resultados obtenidos en esta tesis doctoral con naftaleno, donde la estimulación de la biodegradación no se dio a la concentración máxima (20,7 mg L<sup>-1</sup>), que era posiblemente superior a la constante de afinidad del microorganismo.

## 5.2. MOVILIDAD Y TAXIS BACTERIANA EN *P. putida* G7

Según el tipo de reacción provocada en las células, el estudio del comportamiento bacteriano frente a diferentes sustancias implicó cambios en los patrones tácticos de la estirpe.

### 5.2.1. ATRACCIÓN

Los quimioefectores sacilato, GABA y citrato, así como los exudados de raíces artificiales (AREs) ejercieron una clara atracción sobre la estirpe como consecuencia de una respuesta táctica positiva. Aunque algunos autores ya describieron este comportamiento para salicilato en bacterias del género *Pseudomonas*, las concentraciones empleadas en este estudio (10 mM) han supuesto la detección de la respuesta táctica incluso a concentraciones 50 veces inferior a la empleada en otros ensayos de atracción (500 mM) (Grimm y Harwood, 1997), lo que indica el enorme poder de atracción que ejerce el salicilato sobre la estirpe. Otros compuestos como el aspartato, glutamato o fumarato también indujeron una respuesta táctica positiva en *P. putida* G7 coincidiendo con otros ensayos en los que emplearon estos quimioefectores frente a distintas especies de *Pseudomonas* (Parales y col., 2013; Polonio y col., 2017). Los valores tácticos mostrados con estos compuestos a la concentración empleada fueron moderados, aunque superiores a la mostrada por el salicilato como efector táctico modelo. La respuesta producida por la estirpe en presencia de GABA fue la más significativa de las sustancias empleadas. Un estudio de taxis bacteriana con las estirpe



*Pseudomonas putida* KT2440R arrojó los primeros resultados en cuanto a taxis positiva en estos microorganismos con GABA (Reyes-Darias y col., 2015). Sin embargo, no se ha descrito anteriormente ninguna respuesta positiva tan significativa en otras especies como la mostrada por *P. putida* G7. Aunque la función bacteriana del GABA sigue siendo bastante desconocida, ha sido propuesta como una molécula importante en la interacción planta-bacteria mediando como señal en la comunicación bacteriana en la colonización de las raíces vegetales (Shelp y col., 1999; Allan y col., 2008), entre otras funciones. Su papel como inductor de la respuesta táctica podría aumentar la eficacia en la colonización bacteriana de las raíces y, con ello, la mejora de los procesos de biorremediación y fitoremediación. En cuanto al citrato, algunas investigaciones lo han descrito como un potente inductor de la señal táctica positiva en *P. putida* F1 (Parales y col., 2013) coincidiendo con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, donde *P. putida* G7 mostró un número significativo de células en los capilares como consecuencia de la atracción a este ácido orgánico.

La respuesta quimiotáctica múltiple a partir de la mezcla de varios de los compuestos estudiados como parte de un exudado artificial (AREs) también se tradujo en una mayor respuesta positiva por parte de *P. putida* G7. La mezcla en solución de GABA, citrato y fructosa, detectados en exudados naturales de raíces de girasol (Bowsher y col., 2015) supuso un aspecto muy novedoso con respecto a los estudios previos de la respuesta táctica de la estirpe empleada (Jimenez-Sanchez y col., 2015). Los resultados obtenidos mostraron un aumento de las concentraciones celulares en los capilares si los comparamos con los datos obtenidos por las sustancias como quimioefectores individuales, lo que significó una mayor respuesta táctica bacteriana, aunque ésta no ocurrió de forma sinérgica. El empleo de AREs, a modo de exudado vegetal natural, puede facilitar la comprensión del papel que juega la movilidad celular en el proceso de biodegradación planta-bacteria de muchos de los contaminantes orgánicos (Ortega-Calvo y col., 2003; Zhang, Wang, y col., 2013; Liao y col., 2021) sin necesidad de producir exudados reales con las dificultades y el tiempo necesarios que ello conlleva.



### 5.2.2. RESPUESTA DE REPELENCIA E HIPERMOVILIDAD

La respuesta táctica negativa de la estirpe *P. putida* G7 frente a nanopartículas de Fe (nZVIs) fue variable según la concentración utilizada. El mayor número de células dentro de los capilares se dió a bajas concentraciones de nanopartículas (5  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). La causa probable de estos resultados puede deberse a que las nanopartículas a elevadas concentraciones (50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pueden afectar negativamente a la viabilidad celular (Fajardo y col., 2012), lo que conllevaría a disminución del número de células viables en los ensayos capilares (Ortega-Calvo y col., 2016).

En estudios previos ya se describieron respuestas de repelencia a nanopartículas de plata para *P. putida* G7 (Ortega-Calvo y col., 2011), así como a otros compuestos contaminantes a concentraciones altas de hexano, naftaleno y fenol para *Halomonas anticariensis* FP35 (Tena-Garitaonaindia y col., 2019), todos ellos bajo condiciones de cultivo previo de las estirpes en medio rico. El empleo de salicilato sódico como fuente de carbono ha permitido describir una respuesta de repelencia con mayores restricciones, permitiendo un acercamiento a las condiciones desfavorables presentes en el medio natural, relevantes en escenarios de biorremediación de suelos contaminados por HAPs.

La hipermovilidad observada en *P. putida* G7 fue documentada por primera vez en trabajos previos del grupo de investigación (Jimenez-Sanchez, 2013). Este movimiento causado en presencia de glucosa se caracterizó por un mayor número de células en los capilares cuando el compuesto se encontraba junto con la bacteria en la cámara del ensayo capilar. En cambio, cuando la glucosa fue introducida dentro del capilar, los resultados no mostraron la entrada de células por una respuesta positiva de atracción. A pesar de que estudios con otras especies bacterianas como *E. coli* (Adler y col., 1973), *Spirochaeta aurantia* M1 (Greenberg y Canale-Parola, 1977) y *Bacillus subtilis* (Ordal y col., 1979) identificaron el efecto atrayente de la glucosa, la taxis positiva frente a este compuesto no ha sido documentada para la estirpe de estudio.





### 5.3. PAPEL DE LA RESPUESTA TÁCTICA BACTERIANA EN LA ADHESIÓN

La presencia de los distintos quimioefectores resultó en una diferencia de adhesión a los materiales de estudio, debida a cambios en la movilidad celular. Las células móviles presentan, de forma intrínseca, mayores tasas de adhesión en comparación con las células inmóviles. Esto es debido fundamentalmente a que el coeficiente de difusión de las bacterias móviles es 3 veces superior al de las inmóviles, además de que los flagelos pueden actuar como un anclaje al material de adhesión por atracción electrostática (Zheng y col., 2021). Algunos estudios han corroborado este hecho, comparando la adhesión de *E. coli* con un mutante carente de flagelos sobre un modelo poroso a microescala. El mutante sin flagelo mostró una adhesión reducida al material frente a la estirpe salvaje, sugiriendo el papel de los mismos en el proceso de adhesión bacteriana (Friedlander y col., 2013).

En nuestros experimentos se observó que existe una mayor adhesión a la arena en los experimentos controles en comparación con los tratamientos con GABA y exudados artificiales, respectivamente. Este fenómeno probablemente se deba a que, en presencia de los efectores químicos, la bacteria adopte un movimiento más “smooth” y, por tanto, menos caóticos que provoque una disminución de la adhesión bacteriana. Esta teoría ya fue descrita por Jimenez-Sanchez y col., donde se observó una menor adhesión a anillas de silicona en presencia de exudados vegetales, siendo mayor en el caso de nanopartículas de plata debido a su efecto de repelencia (Jimenez-Sanchez y col., 2012, 2018). La modificación de las propiedades físico-químicas del material arenoso y de la estirpe por los efectores químicos también podría haber provocado cambios en las interacciones electrostáticas entre ambas superficies, afectando a la adhesión bacteriana al material poroso. Algunos estudios han demostrado como sustratos hidrofílicos con potenciales zeta negativos (-47,6 mV) favorecen significativamente la reducción de la adhesión bacteriana de estirpes como *Staphylococcus aureus* (potencial zeta = -37,1 mV) por fenómenos de repulsión (Oh y col., 2018). No obstante, según los resultados ya descritos por Velasco-Casal y col., indican que los potenciales de la arena (-33 mV) y la superficie celular de la bacteria *P. putida*



G7 (-39 mV) permanecen inalterados durante la exposición al rango de quimioefectores utilizados en esta tesis (Velasco-Casal y col., 2008).

Los resultados obtenidos con biocarbón como material adherente parecen reforzar esta teoría. Debido a sus características físico-químicas, el biocarbón presenta una superficie específica muy elevada, lo que favorecería la adhesión bacteriana. Varios autores determinaron que algunas especies del género *Bacillus*, entre ellas *Bacillus salmalaya* 139SI y *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535, alcanzaron valores de equilibrio de adhesión a biocarbón en apenas 80 min, empleando altas concentraciones celulares ( $10^8$  UFC/g) (Ajeng y col., 2022). Comparando los resultados con los obtenidos en el caso de la arena, la capacidad de adhesión se incrementó significativamente. Sin embargo, la presencia de AREs ocasionó una disminución importante de estos valores de adhesión al biocarbón comparado con los viales control sin efector químico. Probablemente, de nuevo, este cambio de movilidad más “smooth” de *P. putida* G7 haya provocado una disminución del porcentaje de adhesión al material.

## 5.4. PAPEL DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE Y BIODEGRADACIÓN DE HAPs A TRAVÉS DE POROS MICROMÉTRICOS

### 5.4.1. EFECTO DEL TAMAÑO DE LOS POROS Y DE LOS QUIMIOEFECTORES EN EL TRANSPORTE BACTERIANO EN BIORREACTORES DE MEMBRANA

Los resultados obtenidos con salicilato como efector químico indican que los mayores tamaños de poro utilizados (12  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ ) aún seguían siendo restrictivos en el paso de la bacteria a través de la membrana porosa. Sin embargo, permitían la completa homogeneización de la suspensión bacteriana en las cámaras del reactor como resultado de la taxis positiva hacia el compuesto, a diferencia de las membranas de 3  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$  donde no se produjo esta homogeneización. La diferencia de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro entre las membranas de 5  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$  provocó un impacto significativo en la movilización táctica mediada por el salicilato, que sugirió una influencia del tamaño de los poros en el comportamiento móvil de las células individuales. Teóricamente, la bacteria



podría atravesar la membrana de 3  $\mu\text{m}$ , de acuerdo con sus dimensiones celulares. Esta posibilidad está respaldada por los resultados con *Escherichia coli* (Mannik y col., 2009) que demostraron que las células bacterianas pueden mantener su movilidad incluso en espacios confinados de tamaño micrométrico atravesando rápidamente (en pocos segundos), poros de hasta 50  $\mu\text{m}$  y con una anchura apenas un 30% mayor que la de una célula. Una de las teorías planteadas para explicar la disminución del transporte celular en membranas de 3  $\mu\text{m}$  se basó en que probablemente, este tamaño de poro fuera más propenso a causar una deposición celular durante el paso de la bacteria que las membranas de 5  $\mu\text{m}$  y 12  $\mu\text{m}$ . De esta forma, el bloqueo habría impedido el aumento de la respuesta táctica a través de las cámaras del biorreactor. Sin embargo, las observaciones sobre la membrana a tiempo final del experimento descartaron este fenómeno, no existiendo evidencia de oclusión de los poros de la membrana. La completa homogeneización observada para los tamaños de poro mayores, los valores de D determinados en los controles de la membrana de 12  $\mu\text{m}$  y los controles de adhesión a la membrana, sugirieron una baja tendencia de las células a depositarse en el material de la membrana.

Estudios recientes han mostrado como las células bacterianas se mueven en medios porosos mediante una movilidad distinta denominada “hopping-and-trapping”, influida por el confinamiento a escala de poro y la actividad celular (Bhattacharjee y Datta, 2019a). De acuerdo con esta explicación se habría impuesto una restricción del movimiento celular en los poros individuales de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que dio lugar a que las células tuvieran dificultades para detectar el gradiente y, por tanto, se comportaran como si hubiera poco o ningún quimioefector presente. En consecuencia, para las membranas con tamaños de poro de 5  $\mu\text{m}$  y 12  $\mu\text{m}$ , la bacteria fue capaz de detectar el gradiente por mayor tamaño de poro permitiendo la respuesta táctica y el paso libre a través de la membrana. El aumento moderado de los valores de C/Co en presencia de salicilato en los reactores con 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro en comparación con los ensayos control pudo deberse a la superposición de poros en la membrana. La existencia de poros superpuestos (por ampliación del rango de tamaño de poro real en



comparación con el valor nominal,  $2,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) podría haber favorecido la detección del gradiente. No sucedió así en el caso de  $5 \mu\text{m}$  y  $12 \mu\text{m}$  donde los poros superpuestos no diferían significativamente entre las diferentes membranas, representando aproximadamente el 20 % de la superficie de los poros.

Un estudio reciente sobre *E. coli* concuerda con las explicaciones propuestas anteriormente donde se descubrió que, en ausencia de un gradiente químico, las células bacterianas cambiaban su modo de movilidad en espacios confinados. Estas células pasarían de una movilidad activa denominada “run and tumble” a quedar atrapadas de forma intermitente y transitoria en dichos espacios, mostrando un comportamiento difuso (Bhattacharjee y Datta, 2019b). Esto es debido a que las células no muestran el mismo mecanismo de movimiento en poros restringidos de tamaño micrométrico que un líquido libre, a consecuencia de las colisiones que surgen con mayor frecuencia en las microporosidades y que por tanto, regulan la migración táctica (Bhattacharjee y col., 2021). De hecho, los valores de difusión celular mostrados en este estudio ( $0,023 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  en poros de  $2,2 \mu\text{m}$ ) son muy similares a nuestros resultados (ver sección resultados), lo que sugiere tendencias muy parecidas a pesar de las diferencias de tamaño celular y flagelación entre *P. putida* y *E.coli*.

Otra explicación alternativa para estos resultados es que la orientación de las bacterias al acercarse a la boca del poro de la membrana fue el principal factor que determina el paso celular. De esta forma, tras alcanzar un ángulo determinado, la célula lograría entrar y pasar a través del poro después de varios intentos, siendo la probabilidad de alineación mucho menor para  $3 \mu\text{m}$  que para  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Cuanto mayor es el diámetro del poro, la alineación de vuelve menos restrictiva (mayor relación diámetro/tamaño celular) y las bacterias son capaces de pasar a través de él. Por tanto, incluso después de un tiempo (y varios intentos), las bacterias no lograrían alinearse con la boca de entrada de los poros de  $3 \mu\text{m}$ . Además, la adición de un atrayente probablemente también influyó en el proceso aumentando las concentraciones celulares cerca de la membrana. Un mayor número de bacterias suponía una mayor probabilidad de



que los individuos adoptasen una orientación adecuada, entraran en un poro y se moviesen a través de él. Esta explicación concuerda con los datos obtenidos para GABA, citrato y AREs con las distintas concentraciones empleadas, donde hubo una relación entre el aumento del transporte a través de las membranas de 3  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$  y el incremento de las concentraciones de quimioefector. Sin embargo, las reacciones tácticas positivas al salicilato y a GABA que dieron intensidades muy diferentes (hasta diez veces superior en el caso de GABA), no se tradujeron en flujos celulares diferentes a través de la membrana de 5  $\mu\text{m}$ . No fue así para el caso de AREs donde los valores de flujo celular fueron diferentes para las distintas concentraciones. Además, se detectaron flujos celulares y valores finales de  $C/Co$  muy similares con las diferentes concentraciones de citrato y GABA empleadas. Estos resultados sugieren que la detección del gradiente seguía siendo limitada en los poros de 5  $\mu\text{m}$ , lo que habría llevado a uniformizar los valores de respuesta táctica que, a priori, debían ser diferentes en función de la mayor o menor respuesta producida por el efector químico empleado. Esta observación indica que el mecanismo espacial de detección del gradiente, es decir, el volumen del gradiente presente en los poros individuales de las membranas de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro x 9  $\mu\text{m}$  de grosor, limitó el alcance de la reacción táctica, independientemente de la fuerza o concentración del quimioefector. A pesar de ello, atendiendo a los valores de  $D$  obtenidos para 12  $\mu\text{m}$  con salicilato ( $6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) fue 10 veces menor que el coeficiente quimiotáctico en un líquido para esta cepa en el caso de naftaleno (menos soluble en agua) ( $72 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) (Marx y Aitken, 1999), mientras que el valor  $D$  en el control a este tamaño de poro se ajustaba bien al coeficiente de movilidad ( $0,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Estos datos nos hacen pensar que, incluso al mayor tamaño de membrana, la detección táctica seguía estando restringida.

En el caso de las nanopartículas, las dos concentraciones utilizadas no revelaron diferencias significativas ni en el flujo celular ni en los valores de  $C/Co$  para los dos tamaños de poro empleados. El efecto de barrera en la dispersión celular causado por la membrana se acentuó en presencia de glucosa. Estos resultados pueden explicarse por la hipermovilidad causada por el compuesto (Jimenez-Sanchez y



col., 2018) dando lugar a trayectorias que, posiblemente, disminuían la probabilidad de que las células entraran en los poros de la membrana y, por tanto, accedieran a la cámara superior del reactor.

## 5.4.2. EFECTO DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs A TRAVÉS DE MICROPOROSIDADES

### 5.4.2.1. Mineralización de naftaleno en sistemas de membrana

El proceso de taxis bacteriana tuvo una fuerte influencia sobre las tasas de biodegradación del contaminante. La propia capacidad de atracción que ejerce el naftaleno sobre la estirpe *P. putida* G7 (Grimm y Harwood, 1997, 1999; Marx y Aitken, 1999) provocó que en apenas 120 h, las tasas de degradación del compuesto alcanzaran valores del 40 % de mineralización en el caso de las membranas de 5  $\mu\text{m}$  y del 25 % para 3  $\mu\text{m}$ . Estos datos parecen estar en consonancia con estudios previos en los que se ha documentado el aumento de la biodegradación de naftaleno como consecuencia de la respuesta táctica bacteriana en distintos medios (Marx y Aitken, 2000; Law y Aitken, 2003). Sin embargo, no existen muchos estudios sobre la influencia de la respuesta táctica en los procesos de biodegradación de los contaminantes orgánicos en microporosidades, a pesar de que parte de las partículas de carbono orgánico y los HAPs asociados a estas, se encuentran en poros con tamaños comprendidos entre 2-5  $\mu\text{m}$  (Chenu y col., 2001; Kinyangi y col., 2006; Totsche y col., 2018). De esta forma se comprobó como la adición de los efectores químicos GABA y en mayor medida ARES en la cámara superior del reactor para potenciar la respuesta táctica de la especie, provocaron aumentos en las tasas de biodegradación empleando membranas de 5  $\mu\text{m}$  hasta valores entre el 50-60 %. Tanto es así, que estos datos de biodegradación alcanzaron valores muy similares a los obtenidos en los ensayos sin la presencia de una restricción física, demostrándose el potente efecto de los quimioefectores en el proceso de biodegradación en microporosidades restringidas. En un estudio sobre el efecto de diferentes tamaños de poro en la degradación del n-hexadecano por la cepa inmóvil *Dietzia maris*, Akbari y Ghoshal demostraron que más del 10 % del hexadecano fue



mineralizado por la estirpe en 40 días utilizando tamaños de poro comprendidos entre 12  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, no se detectó mineralización para los tamaños de poro de 3  $\mu\text{m}$  e inferiores (Akbari y Ghoshal, 2015). Aunque en nuestro estudio la adición de los efectores tácticos no tuvo un efecto significativo sobre las tasas de biodegradación de naftaleno para la membrana de 3  $\mu\text{m}$ , la propia capacidad de movilización de la estirpe y la influencia de los taxis positiva ejercida por el contaminante en el transporte bacteriano, permitieron obtener valores de biodegradación considerables para un tamaño de poro tan restringido. Así, se demostró las enormes ventajas del empleo de estirpes móviles en la biodegradación de compuestos aromáticos en porosidades restringidas, aumentando la accesibilidad de las bacterias a las fuentes de contaminación modulando su transporte mediante el empleo de efectores tácticos.

#### 5.4.2.2. Efecto del transporte en el cometabolismo de pireno en biorreactores

La presencia de pireno como agente contaminante evidenció aún más el efecto de los quimioefectores en el proceso de biodegradación. La diferencia de estos experimentos con respecto a los de mineralización de naftaleno radica en la ausencia documentada del pireno como compuesto táctico a *P. putida* G7, y a la ausencia de beneficio nutricional y energético derivado del proceso de cometabolismo. Los primeros estudios sobre cometabolismo de pireno en la estirpe se llevaron a cabo en nuestro grupo de investigación, donde se determinó que este fenómeno se producía en ausencia de salicilato (Rolando y col., 2020). De esta forma, ante la presencia de AREs y GABA se detectaron concentraciones de pireno por fluorimetría en la cámara superior de los biorreactores menores que los controles para ambos casos en membranas de 5  $\mu\text{m}$ , señal inequívoca de un efecto cometabólico por parte de la bacteria. Estos resultados se sostienen con otras investigaciones ya publicadas sobre el proceso de cometabolismo de compuestos nitro-aromáticos facilitado por mecanismos tácticos en la bacteria *Ralstonia* sp. SJ98 (Pandey y Jain, 2002). Pankaj y Hanhong también relacionaron el cometabolismo del 4-cloro-2-nitrofenol (4C<sub>2</sub>NP) y la respuesta táctica hacia el compuesto por *Pseudomonas* sp. JHN (Arora y Bae, 2014). De esta forma, este novedoso sistema ha permitido comprobar que el efecto de los quimioefectores



puede dirigir la respuesta móvil bacteriana hacia focos contaminantes restringidos que, en un principio, no serían preferentes para la bacteria por no ser fuente metabólica directa o no presentar respuesta de atracción a la misma favoreciendo así, la biodegradación de los contaminantes más recalcitrantes.

## 5.5 PAPEL DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE Y COMETABOLISMO DE PIRENO EN SISTEMAS POROSOS ISOCRÁTICOS

### 5.5.1. INFLUENCIA DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE

El empleo de GABA y AREs por primera vez como efectores tácticos en los sistemas de columnas provocó aumentos significativos del transporte en referencia a los resultados que habían sido obtenidos con anterioridad por Jiménez y col. (Jimenez-Sanchez y col., 2012). En los ensayos realizados ya en las primeras tomas de muestreo, pudo observarse la aparición del frente bacteriano en los efluentes de salida de la columna, presentando diferencias significativas con los controles en los que no se había añadido quimioefector, siendo más evidente a partir de los 2 VP. Comparando estos resultados con los obtenidos en el caso de los biorreactores de membrana observamos que, en ambos sistemas, existió un aumento considerable del transporte, independientemente de si el quimioefector se aplicó junto con el inóculo bacteriano (sistemas saturados) o separado de él mediante una membrana (biorreactores). La existencia de un flujo continuo de células, en el caso del sistema de columnas, no influyó de forma significativa en los valores de C/Co ya que solo mediante la aplicación de un efector químico, se consiguió un transporte celular considerable comparado con las columnas control a lo largo del experimento. Sin embargo, atendiendo a la barrera física impuesta en cada uno de los sistemas empleados, ya sea arena en las columnas o una membrana en biorreactores, la bacteria fue capaz de atravesar y transportarse de una cámara a otra del reactor por poros de tamaño 100 veces menor (3-5  $\mu\text{m}$ ) a los existentes en el caso de las columnas empaquetadas (250-400  $\mu\text{m}$ ) bajo la influencia de un efector químico, demostrándose su importancia en la modulación del transporte celular en medios porosos.





Estos resultados concuerdan con las observaciones que se realizaron sobre la movilidad de la estirpe en el influente, donde se apreció un menor número de cambios de dirección en aquellas soluciones con presencia de GABA y AREs respectivamente. Esta conversión del movimiento celular hacia un patrón más “smooth” fue constante a lo largo del tiempo, lo que dio también lugar a un aumento en el transporte a través de la arena en las columnas en comparación con los ensayos controles, donde la movilidad permaneció con un número constante de cambios de dirección a lo largo del experimento. Estos datos vienen a reforzar algunos estudios ya publicados sobre la importancia de la respuesta táctica en el proceso de transporte en sistemas porosos, donde se comprobaron que cepas quimiotácticas como *Escherichia coli* HCB1 y *Pseudomonas putida* F1, alteraban sus comportamientos de transporte bajo la influencia de una sustancia química atrayente, obteniéndose mayores datos de movilización bacteriana en efluentes en comparación con columnas control (Wang y Ford, 2009). El desarrollo de modelos matemáticos bidimensionales también ha permitido constatar este hecho, comprobándose una mejor migración bacteriana transversal a través de columnas de arena en experimentos quimiotácticos, en comparación con controles no quimiotácticos (Wang y Ford, 2010).

### 5.5.2. ESTUDIO DEL COMETABOLISMO DE PIRENO EN COLUMNAS DE TRANSPORTE BACTERIANO

El estudio de la biodegradación en sistemas de columnas nos permite hacer una aproximación directa de la influencia de la respuesta táctica en el proceso de transporte hacia una fuente de contaminación distante, de forma análoga a lo que sucedería en una situación real de suelo contaminado. Aunque existen multitud de modelos que permiten hacer estimaciones sobre el efecto de un gradiente químico en el transporte bacteriano, pocos estudios han aplicado esta teoría (Nelson y Ginn, 2001; Sen y col., 2005; Ford y Harvey, 2007).

Atendiendo a los resultados obtenidos con los efectores químicos GABA y AREs como agentes de movilización de *P. putida* G7 en columnas debido a una respuesta táctica positiva, el mayor paso de la bacteria a través del material poroso supuso



una mayor tasa de cometabolismo de pireno medido en los flujos de salida de las columnas comparado con los ensayos controles. La importancia del fenómeno táctico y movilidad de la estirpe se hizo de nuevo patente en los procesos de biodegradación, evidenciando las enormes ventajas del empleo de estas bacterias frente a aquellas que carecen de movilidad. Un estudio sobre taxis bacteriana en la especie *Ralstonia* sp. hacia *p*-nitrofenol en comparación con una estirpe que no presentaba taxis frente al compuesto, pero que también utilizaba *p*-nitrofenol (*Burkholderia cepacia* RKJ200), confirmó el aumento de la biodegradación de la estirpe móvil en un ensayo en microcosmos en suelo (Paul y col., 2006). Otro estudio sobre la mayor biodegradación *in situ* del pesticida metil-paratión (MP) por la estirpe táctica *Pseudomonas putida* DLL-1 comparada con mutantes sin movilidad, evidenció la importancia del fenómeno de transporte bacteriano sobre la biodegradación de contaminantes (Guo y col., 2009).

Las observaciones en los patrones de movilidad de la estirpe antes y después de la entrada de las bacterias en las columnas de percolación reforzaron la idea de que la presencia de que los efectores químicos permitieron un transporte más activo y, por tanto, una mayor biodegradación de pireno. La adición de GABA y AREs provocó un movimiento celular menos caótico, con trayectorias más lineales que permitieron un mayor acceso a la fuente de contaminación, en comparación con las columnas control en las que no se añadió ningún efector químico. Ensayos previos sobre la influencia de la taxis positiva del salicilato, acetato o fumarato en el transporte en columnas con arena en la estirpe *P. putida* G7, demostró que el aumento de la distancia recorrida por las bacterias en las columnas como consecuencia de la influencia en los patrones de movilidad de *Pseudomonas*, supuso un aumento de la biodegradación de naftaleno (Velasco-Casal y col., 2008). De igual forma, para los exudados de girasol, que promovieron un movimiento suave y una taxis positiva en PPG7, favoreciendo el transporte bacteriano en columnas de percolación y promoviendo las tasas de mineralización de naftaleno (Jimenez-Sanchez y col., 2018).

De esta forma, además de comprobarse un aumento del cometabolismo del contaminante por el transporte inducido, la utilización del colector de fracciones



asociado al HPLC permitió constatar el hecho de la existencia de metabolitos secundarios derivados del proceso de cometabolismo por la bacteria. Los resultados mostraron como la mayoría de estos compuestos aparecían asociados a las células (existiendo un porcentaje menor presente en la fase acuosa) en un fenómeno quizás diferente a la bioadsorción del compuesto parental, ya descrita anteriormente (Liao y col., 2015; Xu y col., 2016; Rolando y col., 2020), y probablemente derivada de la transformación cometabólica intracelular. De esta forma, el análisis realizado en esta tesis doctoral nos permite examinar no solo cómo la bacteria puede contribuir a la movilización de los contaminantes y los metabolitos producidos durante su biodegradación en los medios porosos, sino a evaluar el posible riesgo producido por los compuestos derivados de la transformación biológica de los HAPs. En varios estudios ya han identificado algunos de estos compuestos derivados de la transformación del pireno por otras especies bacterianas mediante colector de fracciones, como *Pseudomonas stutzeri* P16 que transforma el pireno en tix-4,5-dihidro-4,5-dihidroxipireno (PYRdHD) (Kazunga y Aitken, 2000) o *Leclercia adecarboxylata* PS4040 que produce 1-hidroxipireno o el fenantrenodicarboxílico entre otros metabolitos (Sarma y col., 2010), siendo considerados la gran mayoría de ellos, como tóxicos y peligrosos tanto para el medio ambiente como para el ser humano. Así, las concentraciones de estos compuestos obtenidas en los efluentes de las columnas con quimioefectores fueron muy superiores a las mostradas en los controles y aunque el método no permitió identificar la gran mayoría de estas sustancias, el estudio abre un campo amplio de posibilidades para la caracterización de las mismas en la especie *Pseudomonas putida* G7, lo que supone un paso importante para poder determinar su toxicidad y poder controlar el riesgo que puedan producir en los ecosistemas.



## 5.6. REDUCCIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS A LA TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA DE PIRENO

### 5.6.1. EMPLEO DEL SISTEMA PLANTA-BACTERIA-BIOCARBÓN EN LA REDUCCIÓN DEL RIESGO

Nuestro sistema experimental fue óptimo para evaluar y controlar los riesgos derivados de los procesos de biodegradación, debido a la elevada capacidad de resistencia de las plantas de girasol a la contaminación provocada por los HAPs, su posible facilidad para la transformación del contaminante y la movilidad y capacidad cometabolizadora de pireno por parte de *P. putida* G7. Los resultados obtenidos indican que los mecanismos de reducción de riesgos asociados a la lixiviación de metabolitos del pireno residía, por un lado, en las interacciones planta-microorganismo y, por otro lado, en la capacidad de adsorción del biocarbón. Gracias a la influencia táctica de los exudados del girasol sobre la estirpe, fue posible una dispersión más eficiente de los microorganismos hacia la fuente de contaminación. Teniendo en cuenta la peligrosidad de muchas de las sustancias producidas durante el proceso de biodegradación de los contaminantes, la adición de biocarbón como agente secuestrante supuso una reducción de los riesgos asociados a esta descontaminación, creando un sistema medioambientalmente sostenible. La mayor concentración de  $Pir_{eq}$  observada en los lixiviados de las macetas plantadas después de la inoculación pudo reflejar la actividad cometabólica de la estirpe una vez que alcanzó la fuente distante de pireno, facilitado por el sistema radicular de la planta. Este efecto promotor de las plantas de girasol sobre el transporte y la actividad cometabólica de pireno en *P. putida* G7 ya fue constatado en experiencias previas de invernadero llevadas a cabo en el grupo (Fernández-López y col., 2021). Los resultados mostrados en esta tesis doctoral amplían estos hallazgos, mostrando una reducción significativa de las concentraciones de  $Pir_{eq}$  en los lixiviados de las macetas plantas e inoculadas y que, además, fueron equipadas con una capa de biocarbón, quedando los metabolitos retenidos de forma eficiente en las macetas.

No es sorprendente hablar de la posible capacidad de las plantas de girasol para transformar directamente pireno, dada la habilidad de las plantas superiores para



oxidar los HAPs a través de las enzimas del citocromo P-450 (Alagí y col., 2015). De hecho, se produjeron metabolitos hidrosolubles del pireno en cultivos celulares de dedalera y trigo expuesto al contaminante (Hückelhoven y col., 1997) y en esquejes de álamo cultivados en arena (Kuhn y col., 2004), siendo también detectados en hojas de varias plantas leñosas expuestas a atmósferas urbanas (Nakajima y col., 1996). Hasta donde sabemos este es el primer estudio sobre la transformación directa del pireno por parte de la planta de girasol (Kathi y Khan, 2011). En cuanto al metabolito identificado en este estudio, P-4-C, es un compuesto que ha sido descrito con anterioridad en distintas vías de degradación bacteriana del pireno (Haritash y Kaushik, 2009; Hadibarata y Kristanti, 2013; Jamal y Al-Shaikh, 2020) y que junto con la presencia de otros compuestos polares derivados del fenantreno (diferentes de P-4-C) observados en un estudio sobre producción vegetal de metabolitos de pireno, apoyan la idea de que ha habido una degradación del pireno en estos tratamientos con planta.

Posiblemente debido a la transparencia del sistema modelo empleado, que implica el cultivo de la planta en arena y el empleo de una solución de nutrientes inorgánicos, pudo constatarse dicha transformación directa del contaminante, a diferencia de los estudios anteriores. Además, la inhibición de la transformación del contaminante por el girasol debida a la inoculación con *P. putida* G7 sugiere que la planta era muy sensible a la presencia de este microorganismo en la rizosfera. Esta reacción puede explicarse postulando que la transformación directa del pireno por planta fue el resultado de una respuesta de estrés a las condiciones de cultivo (incluyendo la exposición al pireno). Estas condiciones desfavorables activaron la producción de enzimas relacionadas con los sistemas de desintoxicación y anti-oxidativos y, por tanto, el almacenamiento y transformación del pireno y sus metabolitos en los tejidos de la planta. Esta respuesta no se observó en presencia del inoculante microbiano, lo que refleja una interacción positiva planta-microbio y una reducción del estrés oxidativo producido por el contaminante. Algunos microorganismos poseen capacidades promotoras del crecimiento vegetal que pueden, entre otros efectos positivos, reducir la producción de enzimas anti-oxidativas como consecuencia de una



reducción de los efectos adversos provocados por el contaminante (por ejemplo, degradando y/o cometabolizando los contaminantes) y/o la mejora de las capacidades de la planta (por ejemplo, la liberación de fitohormonas, la producción de biosurfactantes o la mejora de la disponibilidad de nutrientes, entre otros) (Balseiro-Romero y col., 2017; Posada-Baquero y col., 2020).

El aumento de las concentraciones de estos compuestos también se observó en las macetas inoculadas que no tenían planta en las etapas finales del experimento. Esto puede explicarse por la actividad de las bacterias que se transportaron a la zona contaminada, aunque de una forma más limitada. Este incremento también se observó en las macetas inoculadas con una capa de biocarbón lo que puede explicarse por varias razones. El hecho de que este material sólo era estable, y por tanto conservaba su capacidad de sorción durante los primeros meses de experimentación, puede ser una opción ambientalmente sostenible debido a la biodegradabilidad del producto.

Estudios sobre degradación de biocarbón, han constatado cambios en las propiedades superficiales del material y del volumen de microporos en condiciones ambientales a lo largo del tiempo, aunque presentan controversia en la escala temporal de durabilidad del material que va desde decenas a centenares de años (Wang y col., 2016; de la Rosa y col., 2018). Además, también podría proporcionar un nicho ecológico que permita la deposición bacteriana controlada en la fuente de contaminación. El biocarbón no solo retendría los productos metabolizados del pireno, sino que es capaz de absorber multitud de nutrientes que pueden favorecer la actividad biodegradadora de estos microorganismos. Algunos estudios sostienen esta idea, demostrándose un crecimiento más eficiente de la bacteria *Escherichia coli* en presencia de biocarbón en comparación con otros adsorbentes como el carbón activo. Igualmente, como indica este trabajo, existió una menor alteración de la capacidad metabólica de la estirpe en presencia de biocarbón, lo que avala la idea de la utilización de este producto en la biorremediación. Min y colaboradores, también observaron una aceleración en la biodegradación del pireno por parte de un consorcio bacteriano (QY1) en presencia del biocarbón (Li, Yin, y col., 2021). Sin embargo, las determinaciones



microbianas y bioquímicas realizadas al final del experimento indican que, sin plantas, la mayor parte del inóculo bacteriano quedó retenido en las capas superiores de las macetas. El transporte limitado de esta cepa a través del material poroso y la mayor movilización y actividad como resultado de las reacciones tácticas, se ha examinado en una amplia variedad de escenarios incluyendo las columnas de transporte (Abhilash y col., 2009; Rolando y col., 2020) y suelo plantado con girasol (Fernández-López y col., 2021). Los resultados mostrados amplían estos hallazgos al demostrar que las bacterias movilizadas y los metabolitos, pueden ser controlados eficazmente a través de la combinación de planta y material adsorbente.

### 5.6.2. EFECTIVIDAD DEL MÉTODO MEDIANTE ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADO A LA BIORREMEDIACIÓN

El uso de los factores de riesgo se ha venido utilizando ampliamente en los últimos años para la evaluación del impacto de enmiendas no solo a nivel medioambiental, sino también humano. De esta forma, el enfoque aportado en esta tesis abarca la conjunción de dos tipos fundamentales de riesgos asociados a la biorremediación que nos permiten comprender, de una manera global, la peligrosidad ocasionada durante el proceso: la transferencia del contaminante a la planta mediante el estudio de los valores de BCF y TF, y el riesgo asociado a los lixiviados producidos durante el proceso (valores de HQ).

Los organismos vegetales se pueden considerar fitoestabilizadores (permiten inmovilizar los contaminantes en el suelo disminuyendo su movilidad y biodisponibilidad) si presentan alguna de las siguientes combinaciones de valores:  $BCF < 1$  y  $TF < 1$ ;  $BCF < 1$  y  $TF > 1$  o  $BCF > 1$  y  $TF < 1$ , siendo fitoextractores (capaces de absorber contaminantes y acumularlos en los distintos órganos de la planta) cuando los valores de BCF y  $TF > 1$  (Bolan y col., 2011; Alagić y col., 2015; Gajić y col., 2020). En los tratamientos con macetas plantadas los datos de BFC y TF fueron superiores a 1 (Mellem y col., 2009), lo que indica que el girasol por sí solo, es capaz de bioacumular  $Pir_{eq}$ , en particular, en tallos y hojas. De esta forma, aunque existe una cierta retirada del medio del contaminante por absorción de la planta,



los tratamientos con girasol sin inoculación supondrían un riesgo derivado de la peligrosidad de los lixiviados y de la masa vegetal que tendría que ser considerada para su revalorización y tratamiento posterior. Algunas revisiones han propuesto la utilización de la materia vegetal contaminada para multitud de aplicaciones entre ellas, su conversión en compost como el caso de *Paulownia fortunei* utilizada en biorremediación de suelos contaminados con elementos traza (Madejón y col., 2016) o el cáñamo (*Cannabis sativa* L.) para producción de bioenergía en suelos con contaminantes orgánicos (Rheay y col., 2021). Sin embargo, sigue existiendo mucha controversia en este tipo de revalorizaciones que siguen sin ser ambientalmente sostenibles. En ninguno de los tratamientos los valores de BCF fueron menores a 1 y TF mayores a 1, lo que indica que la fitoextracción no es relevante en este estudio. Solo el tratamiento con planta e inoculación bacteriana unida a la adición del biocarbón presentó los valores idóneos para fitoestabilización, lo que indica que el modelo planta-bacteria-biocarbón proporciona un sistema sostenible para reducir los riesgos durante la biotransformación y movilización del pireno en suelo. Seguido muy de cerca, se encuentran las macetas en las que se plantaron girasoles y se inoculó la estirpe G7, reafirmando la idea la cooperación entre ambos organismos en el proceso de disminución de la biodisponibilidad del contaminante. Los altos valores de BCF alcanzados en la práctica totalidad de los tratamientos en raíces (superiores a 2 y considerados muy elevados) (Usman y col., 2013), pueden explicarse por la alta capacidad de este tejido vegetal de interactuar con el contaminante, ya que el sistema radicular se extendió por toda la superficie de la maceta. En un estudio sobre suelos contaminados con PAHs en la costa oriental del Mar Rojo en Arabia Saudí se detectaron, para todos los casos, valores de BCF superiores a 1 en raíces de manglares (El-Maradny y col., 2021). Y no es de extrañar ya que la eliminación de los HAPs de suelo se asocia con valores altos de BCF debidos a la presencia de plantas con raíces fibrosas, que se caracterizan por una mayor superficie y una mayor producción de exudados (Ma y col., 2021). Esto se debe a que muchos de estos componentes de exudados facilitan la desorción de los contaminantes del suelo y aumentan la biodisponibilidad para la transformación de los





contaminantes por parte de las raíces de las plantas (Cook y Hesterberg, 2013), reforzándose la enorme capacidad del girasol en este proceso.

En cuanto al riesgo derivado de los lixiviados encontramos de nuevo, que el sistema planta-bacteria-biocarbón obtuvo los valores más bajos de peligrosidad mientras que el girasol obtuvo los valores más altos. La importancia del estudio de este parámetro radica en la necesidad de compresión de gran parte de estos lixiviados, en un medio natural real, acabarían filtrándose a los acuíferos existentes en las capas más profundas del suelo. Y es que, esto no solo supone un gran problema ambiental si no también humano derivado de la explotación de estos reservorios para diversas actividades económicas. Este hecho no viene más que a comprobar la eficacia no solo de la cooperación entre ambos organismos, si no de la capacidad adsorbente del material que juega un papel muy importante en la movilización de los metabolitos secundarios del pireno.

Los resultados obtenidos de la experiencia de invernadero indican que los mecanismos en la reducción de los riesgos asociados a la biorremediación de suelos, se encuentran en el empleo combinado de las interacciones planta-microorganismos y la capacidad de adsorción de bacterias y metabolitos por parte del biocarbón. La capacidad de transformación del pireno por la planta unida a la capacidad cometabólica de *P. putida* G7 crearon un escenario perfecto para la biodegradación, así como que la planta proporcionaba una dispersión más eficiente de los microorganismos móviles mediante taxis positiva a los exudados vegetales. Teniendo en cuenta la peligrosidad de muchos de los compuestos producidos durante la transformación del pireno, la adición del biocarbón como agente secuestrante redujo los riesgos asociados al proceso de descontaminación, creando un sistema ambientalmente sostenible.



Los datos más importantes recogidos en esta tesis doctoral se basan en el análisis de las tecnologías empleadas en la biorremediación de suelos contaminados basadas en la movilización, tanto de los microorganismos como de los xenobióticos. De esta forma, la electroquímica se ha postulado como una herramienta muy útil en el transporte controlado de microorganismos ausentes de capacidad móvil. Esta movilización dirigida de los microorganismos degradadores a zonas contaminadas específicas no solo supone una enorme ventaja para la difusión de aquellas bacterias que carecen de una movilidad activa, sino que puede permitir una disminución de los riesgos biológicos asociados a los procesos de dispersión bacteriana que pueden llegar a producir cambios en las poblaciones de los hábitats donde se aplican estas enmiendas. Además, se produjo una estimulación de la biodegradación y movilización de los contaminantes gracias al efecto de la electroósmosis, produciéndose una relación positiva entre la biorremediación y la aplicación de un campo eléctrico en la descontaminación de suelos. Así, la aplicación conjunta de los procesos electrocinéticos y de biodegradación puede tener enormes ventajas en los suelos donde existe una baja permeabilidad y donde otras técnicas no pueden acceder, sin olvidarnos de que su posible aplicación en un suelo contaminado presenta un bajo coste económico y un sistema ambientalmente sostenible.

Por su parte, el estudio de la movilidad bacteriana ha permitido identificar nuevos quimioefectores en el control del transporte bacteriano a través de distintos sistemas porosos, tanto en microporosidades como en sistemas porosos isocráticos. La incorporación en el proceso de biorremediación de sustancias como las empleadas en este estudio que activan la respuesta táctica de muchas de las bacterias degradadoras de contaminantes, solubles en agua y polares, y su difusión a través de los microporos, permitiría la formación de gradientes químicos intra-agregados, facilitando la dispersión mediada por taxis de inoculantes microbianos y/o actuar como bioestimulantes para que las poblaciones autóctonas operen en estos poros de difícil acceso. La mayor transformación de los contaminantes naftaleno y pireno, reflejadas en este trabajo, debida a un mayor transporte bacteriano, está directamente relacionada con la accesibilidad



bacteriana a los poros donde se encuentran estos contaminantes. Aunque hablamos de sistemas modelo de estudio donde se utilizó un medio acuoso saturado y la movilidad flagelar parece estar restringida a condiciones muy húmedas, la rápida colonización de la superficie porosa durante periodos favorables de humedad puede reanudar rápidamente la movilidad bacteriana. Así, se puede justificar la presencia de bacterias flageladas sostenida en el tiempo en un hábitat parcialmente saturado como el suelo. De esta forma, además de proporcionar información básica sobre la movilidad y la capacidad de detección de gradientes químicos por parte de las bacterias degradadoras en los sistemas porosos, los resultados obtenidos en esta tesis pueden aportar un nuevo enfoque innovador para los procesos de remediación ambiental de los compuestos orgánicos más recalcitrantes. Por ejemplo, pueden plantear una solución a los problemas que comúnmente se producen en los suelos arcillosos o a los problemas debidos a los contaminantes en los que existe una baja biodisponibilidad de los mismos y donde la conductividad hidráulica puede limitar los procesos de biodegradación.

En esta tesis doctoral, se han analizado los riesgos derivados del proceso biológico de descontaminación, demostrándose la eficacia del sistema planta-bacteria-biocarbón en la reducción de los riesgos asociados a la biorremediación, constituyéndose como una alternativa válida para controlar el riesgo de dicha contaminación. Estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre la biorremediación en suelos contaminados con HAPs, en las que el riesgo ambiental causado por la actividad biológica se considera fundamental en el proceso. Además, la viabilidad de este experimento de invernadero en condiciones de campo reales se puede hacer efectiva debido al bajo coste de los materiales empleados en el proceso, proporcionando nuevas herramientas para su futura aplicación en el sector de la remediación.



## 6. CONCLUSIONES

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



Las conclusiones derivadas del estudio realizado en esta Tesis doctoral son:

1. La aplicación de un campo eléctrico favoreció la interacción bacteriana de la estirpe *P. fluorescens* LP6a con el contaminante en las columnas electroquímicas, aumentando la biodisponibilidad y biodegradación del naftaleno a través de la movilización por electroósmosis.
2. Los componentes de exudados de girasol, GABA y citrato, y el intermediario salicilato, provocaron una fuerte respuesta quimiotáctica positiva en *Pseudomonas putida* G7.
3. Las nanopartículas de Fe (nZVIs) y glucosa mostraron respectivamente, respuestas de repelencia e hipermovilidad.
4. La respuesta táctica de las sustancias quimioatrayentes, provocó un aumento del transporte celular para todas las sustancias estudiadas tanto en los ensayos a través de microporosidades como en sistemas porosos isocráticos.
5. La utilización de una mezcla de exudados artificiales (AREs) potenció en forma aditiva el efecto de atracción celular sobre *P. putida* G7, en comparación con el empleo de los compuestos de forma individualizada.
6. El transporte inducido por quimiorepelencia fue menos acusado que el caso de los efectores positivos, aunque también se produjo una respuesta significativa en los biorreactores.
7. La respuesta quimiotáctica de la estirpe *P. putida* G7 indujo una movilización celular significativa comparada con los ensayos control (en ausencia de efectores químicos) en los sistemas de membrana, empleando tamaños de poro de 5  $\mu\text{m}$ . Los valores de transporte celular fueron moderados para 12  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
8. El aumento del transporte por quimiotaxis positiva se tradujo en una mayor biodegradación de los contaminantes naftaleno y pireno en los biorreactores de membrana.



9. El mayor transporte celular, debido a la fuerte respuesta táctica inducida por GABA y ARES, obtenido en las columnas de percolación donde se aplicaron los efectores tácticos, provocó un mayor cometabolismo de pireno por *P. putida* G7. Los análisis por colector de fracciones asociados a HPLC demostraron la formación de metabolitos secundarios derivados del proceso de biodegradación.
10. El empleo del sistema planta-bacteria-biocarbón produjo una disminución del riesgo asociado al proceso de cometabolismo de pireno por parte de *P. putida* G7.
11. El biocarbón se constituyó como un material adsorbente eficiente y ambientalmente sostenible, que puede ser empleado como elemento fundamental para la disminución del riesgo asociado al proceso de biorremediación de suelos contaminados.



The conclusions resulting from this doctoral thesis are follows:

1. The application of an electric field promoted the bacterial interaction of the *P. fluorescens* LP6a strain with the pollutant in the electrochemical columns, increasing the naphthalene bioavailability and biodegradation through mobilisation by electroosmosis.
2. The sunflower exudate components GABA, citrate and the intermediate salicylate, caused a higher positive chemotactic response in *Pseudomonas putida* G7.
3. The Fe nanoparticles (nZVIs) and glucose showed, respectively, repellency and hypermobility responses.
4. The tactical response by the chemoattractants resulted in an increased cellular transport for all the substances studied in microporosity and isocratic porous systems.
5. The use of an artificial root exudates (AREs) additively enhance the cell attraction effect on *P. putida* G7 compared to using the compounds individually.
6. Chemorepellency-induced transport was less pronounced than in the case of positive effectors, although there was also a significant response in the bioreactors.
7. The chemotactic response of *P. putida* G7 induced significant cell mobilisation compared to control assays (in the absence of chemical effectors) in membrane systems using 5 µm pore size. Cell transport values were moderated for 12 µm and 3 µm pore sizes.
8. The increased transport by positive chemotaxis resulted in an increased biodegradation of naphthalene and pyrene in the membrane bioreactors.
9. The enhanced cellular transport, due to the strong GABA and AREs induced tactic response, obtained in the percolation columns where the tactic effectors were applied, resulted in increased pyrene cometabolism by *P. putida* G7. HPLC-associated fraction collector



analyses demonstrated the formation of the secondary metabolites derived from the biodegradation process.

10. The use of the plant-bacteria-biochar system resulted in a decrease in the risk associated with the pyrene cometabolism process by *P. putida* G7.
11. The biochar was constituted as an efficient and environmentally sustainable adsorbent material, which can be used as a fundamental element for the reduction of the risk associated with the bioremediation of contaminated soils process.

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**





## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



- Abbasnezhad, H., Gray, M., Foght, J. M. 2011. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92: 653-75.
- Abhilash, P. C., Jamil, S., Singh, N. 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology Advances*, 27: 474-88.
- Adler, J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Microbiology*, 74: 77-91.
- Adler, J., Hazelbauer, G. L., Dahl, M. M. 1973. Chemotaxis toward sugars in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 115: 824-47.
- Afegbua, S. L., Batty, L. C. 2018. Effect of single and mixed polycyclic aromatic hydrocarbon contamination on plant biomass yield and PAH dissipation during phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 18596-603.
- Ahmad, F., Zhu, D., Sun, J. 2020. Bacterial chemotaxis: a way forward to aromatic compounds biodegradation. *Environmental Sciences Europe*, 32: 52.
- Ajeng, A. A., Abdullah, R., Ling, T. C., Ismail, S. 2022. Adhesion of *Bacillus salmalaya* and *Bacillus amyloliquefaciens* on oil palm kernel shell biochar: A physicochemical approach. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10: 107115.
- Akbari, A., Ghoshal, S. 2015. Bioaccessible porosity in soil aggregates and implications for biodegradation of high molecular weight petroleum compounds. *Environmental Science & Technology*, 49: 14368-75.
- Akbari, A., Rahim, A. A., Ehrlicher, A. J., Ghoshal, S. 2016. Growth and attachment-facilitated entry of bacteria into submicrometer pores can enhance bioremediation and oil recovery in low-permeability and microporous media. *Environmental Science & Technology Letters*, 3: 399-403.
- Alagić, S. Č., Maluckov, B. S., Radojičić, V. B. 2015. How can plants manage polycyclic aromatic hydrocarbons? May these effects represent a useful tool for an effective soil remediation? A review. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 17: 597-614.
- Alcántara, M. T., Gómez, J., Pazos, M., Sanromán, M. A. 2010. Electrokinetic remediation of PAH mixtures from kaolin. *Journal of Hazardous Materials*, 179: 1156-60.
- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and bioremediation* (Gulf Professional Publishing).
- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*, 34: 4259-65.
- Alexander, R. P., Lowenthal, A. C., Harshey, R. M., Ottemann, K. M. 2010. CheV: CheW-like coupling proteins at the core of the chemotaxis signaling network. *Trends in Microbiology*, 18: 494-503.
- Allan, W. L., Simpson, J. P., Clark, S. M., Shelp, B. J. 2008. Gamma-hydroxybutyrate accumulation in *Arabidopsis* and tobacco plants is a general response to abiotic stress: putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2555-64.
- Arora, P. K., Bae, H. 2014. Biotransformation and chemotaxis of 4-chloro-2-nitrophenol by *Pseudomonas* sp. JHN. *Microbial Cell Factories*, 13: 110.
- Auffan, M., Achouak, W., Rose, J., Roncato, M. A., Chaneac, C., Waite, D. T., Masion, A., Woicik, J. C., Wiesner, M. R., Bottero, J. Y. 2008. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology*, 42: 6730-5.
- Baboshin, M. A., Golovleva, L. A. 2012. Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. *Microbiology*, 81: 639-50.
- Balseiro-Romero, M., Gkorezis, P., Kidd, P. S., Van Hamme, J., Weyens, N., Monterroso, C., Vangronsveld, J. 2017. Use of plant growth promoting bacterial strains to improve



- Cytisus striatus* and *Lupinus luteus* development for potential application in phytoremediation. *Science of The Total Environment*, 581-582: 676-88.
- Banitz, T., Johst, K., Wick, L. Y., Fetzer, I., Harms, H., Frank, K. 2012. The relevance of conditional dispersal for bacterial colony growth and biodegradation. *Microbial Ecology*, 63: 339-47.
- Barnett, F, Lynn, S, Reisman, D. 2009. Technology performance review: selecting and using solidification/stabilization treatment for site remediation. *Environmental Protection Agency, Cincinnati, US*.
- Becker, M. W., Collins, S. A., Metge, D. W., Harvey, R. W., Shapiro, A. M. 2004. Effect of cell physicochemical characteristics and motility on bacterial transport in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*, 69: 195-213.
- Bengtsson, G., Törneman, N. 2009. A spatial approach to environmental risk assessment of PAH contamination. *Risk Analysis*, 29: 48-61.
- Bhattacharjee, T., Amchin, D. B., Ott, J. A., Kratz, F., Datta, S. S. 2021. Chemotactic migration of bacteria in porous media. *Biophysical Journal*, 120: 3483-97.
- Bhattacharjee, T., Datta, S. S. 2019a. Bacterial hopping and trapping in porous media. *Nature Communications*, 10: 2075.
- Bhattacharjee, T., Datta, S. S. 2019b. Confinement and activity regulate bacterial motion in porous media. *Soft Matter Journal*, 15: 9920-30.
- Bi, S., Sourjik, V. 2018. Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Microbiology*, 45: 22-29.
- Bianco, F., Race, M., Papirio, S., Oleszczuk, P., Esposito, G. 2021. The addition of biochar as a sustainable strategy for the remediation of PAH-contaminated sediments. *Chemosphere*, 263: 128274.
- Bojes, H. K., Pope, P. G. 2007. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47: 288-95.
- Bolan, N. S., Park, J. H., Robinson, B., Naidu, R., Huh, K. Y. 2011. 'Chapter four - Phytostabilization: A green approach to contaminant containment.' in Donald L. Sparks (ed.), *Advances in Agronomy* (Academic Press), 145-204.
- Bosma, T. N. , Middeldorp, P. J., Schraa, G., Zehnder, A. J. 1997. Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environmental Science & Technology*, 31: 248-52.
- Boulakradeche, M. O., Akretche, D. E., Cameselle, C., Hamidi, N. 2015. Enhanced electrokinetic remediation of hydrophobic organics contaminated soils by the combination of non-ionic and ionic surfactants. *Electrochimica Acta*, 174: 1057-66.
- Bowra, B. J., Dilworth, M. J. 1981. Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 126: 231-35.
- Bowsher, A. W., Ali, R., Harding, S. A., Tsai, C., Donovan, L. A. 2015. Analysis of wild sunflower (*Helianthus annuus* L.) root exudates using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178: 776-86.
- Breitenbeck, G. A., Yang, H., Dunigan, E. P. 1988. Water-facilitated dispersal of inoculant *Bradyrhizobium japonicum* in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 7: 58-62.
- Brumley, D. R., Carrara, F., Hein, A. M., Yawata, Y., Levin, S. A., Stocker, R. 2019. Bacteria push the limits of chemotactic precision to navigate dynamic chemical gradients. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 116: 10792-97.
- Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Cecilian, F., Galizzi, A., Senesi, S. 2005. Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *Journal of Bacteriology*, 187: 5356-66.
- Cameselle, C., Reddy, K. R. 2012. Development and enhancement of electro-osmotic flow for the removal of contaminants from soils. *Electrochimica Acta*, 86: 10-22.



- Chakraborty, S., Mukherji, S., Mukherji, S. 2010. Surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degrading *Burkholderia* strains and their interactions with NAPLs and surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 78: 101-8.
- Chen, F., Tan, M., Ma, J., Zhang, S., Li, G., Qu, J. 2016. Efficient remediation of PAH-metal co-contaminated soil using microbial-plant combination: A greenhouse study. *Journal of Hazardous Materials*, 302: 250-61.
- Chen, F., Zhang, Q., Ma, J., Zhu, Q., Wang, Y., Liang, H. 2021. Effective remediation of organic-metal co-contaminated soil by enhanced electrokinetic-bioremediation process. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 15: 113.
- Cheng, F., Guo, S., Wang, S., Guo, P., Lu, W. 2021. Transportation and augmentation of the deposited soil bacteria in the electrokinetic process: Interactions between soil particles and bacteria. *Geoderma*, 404: 115260.
- Chenu, C., Hassink, J., Bloem, J. 2001. Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 349-56.
- Chu, L., Cang, L., Fang, G., Sun, Z., Wang, X., Zhou, D., Gao, J. 2022. A novel electrokinetic remediation with in-situ generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for soil PAHs removal. *Journal of Hazardous Materials*, 428: 128273.
- Chung, N., Alexander, M. 2002. Effect of soil properties on bioavailability and extractability of phenanthrene and atrazine sequestered in soil. *Chemosphere*, 48: 109-15.
- Colin, R., Ni, B., Laganenka, L., Sourjik, V. 2021. Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 45.
- Cook, R. L., Hesterberg, D. 2013. Comparison of trees and grasses for rhizoremediation of petroleum hydrocarbons. *International Journal of Phytoremediation*, 15: 844-60.
- Covelli, J. M., Althabegoiti, M. J., López, M. F., Lodeiro, A. R. 2013. Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*. *Research in Microbiology*, 164: 136-44.
- Crawford, R. L. 2011. 'Biodegradation: Principles, Scope, and Technologies.' in Murray Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (Academic Press: Burlington), 3-13.
- Cussler, E. L. 2009. *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems* (Cambridge University Press: Cambridge).
- de Anna, P., Jimenez-Martinez, J., Tabuteau, H., Turuban, R., Le Borgne, T., Derrien, M., Méheust, Y. 2014. Mixing and reaction kinetics in porous media: an experimental pore scale quantification. *Environmental Science & Technology*, 48: 508-16.
- de Carvalho, Carla C. C. R., Wick, Lukas Y., Heipieper, Hermann J. 2009. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 311-20.
- de la Rosa, J. M., Rosado, M., Paneque, M., Miller, A. Z., Knicker, H. 2018. Effects of aging under field conditions on biochar structure and composition: Implications for biochar stability in soils. *Science of The Total Environment*, 613-614: 969-76.
- Dell'Anno, F., Sansone, C., Ianora, A., Dell'Anno, A. 2018. Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. *Marine Environmental Research*, 137: 196-205.
- Dentz, M., Creppy, A., Douarche, C., Clément, E., Auradou, H. 2022. Dispersion of motile bacteria in a porous medium. *Journal of Fluid Mechanics*, 946: A33.
- Division, United States. Environmental Protection Agency. Office of Wastewater Management. Municipal Support, Transfer, National Risk Management Research Laboratory . Technology, Division, Support. 2004. *Guidelines for water reuse* (US Environmental Protection Agency).
- Doong, R. A., Lei, W. G. 2003. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. *Journal of Hazardous Materials*, 96: 15-27.



- Doucette, W. J., Shunthirasingham, C., Dettenmaier, E. M., Zaleski, R. T., Fantke, P., Arnot, J. A. 2018. A review of measured bioaccumulation data on terrestrial plants for organic chemicals: Metrics, variability, and the need for standardized measurement protocols. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37: 21-33.
- Dupuy, L. X., Silk, W. K. 2016. Mechanisms of early microbial establishment on growing root surfaces. *Vadose Zone Journal*, 15: 1-13.
- Egli, T. 2002. 'Microbial degradation of pollutants at low concentrations and in the presence of alternative carbon substrates: emerging patterns.' in, *Biotechnology for the environment: strategy and fundamentals* (Springer), 131-39.
- El-Maradny, A., El-Sherbiny, M. M., Ghandourah, M., El-Amin Bashir, M., Orif, M. 2021. PAH bioaccumulation in two polluted sites along the eastern coast of the Red Sea, Saudi Arabia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18: 1335-48.
- Fajardo, C., Ortíz, L. T., Rodríguez-Membibre, M. L., Nande, M., Lobo, M. C., Martín, M. 2012. Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: a molecular approach. *Chemosphere*, 86: 802-8.
- Fernández-López, C., Posada-Baquero, R., García, J. L., Castilla-Alcantara, J. C., Cantos, M., Ortega-Calvo, J. J. 2021. Root-mediated bacterial accessibility and cometabolism of pyrene in soil. *Science of The Total Environment*, 760: 143408.
- Fernández-Sanromán, A., Pazos, M., Rosales, E., Sanromán, M. A. 2021. Prospects on integrated electrokinetic systems for decontamination of soil polluted with organic contaminants. *Current Opinion in Electrochemistry*, 27: 100692.
- Filonov, A. E., Puntus, I. F., Karpov, A. V., Kosheleva, I. A., Kashparov, K. I., Slepkin, A. V., Boronin, A. M. 2004. Efficiency of naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 in soil. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79: 562-69.
- Ford, R. M., Harvey, R. W. 2007. Role of chemotaxis in the transport of bacteria through saturated porous media. *Advances in Water Resources*, 30: 1608-17.
- Friedlander, R. S., Vlamakis, H., Kim, P., Khan, M., Kolter, R., Aizenberg, J. 2013. Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 5624-29.
- Gajić, G., Mitrović, M., Pavlović, P. 2020. '6 - Feasibility of *Festuca rubra* L. native grass in phytoremediation.' in Vimal Chandra Pandey and D. P. Singh (eds.), *Phytoremediation Potential of Perennial Grasses* (Elsevier), 115-64.
- Gargiulo, G., Bradford, S., Šimůnek, J., Ustohal, P., Vereecken, H., Klumpp, E. 2007. Bacteria transport and deposition under unsaturated conditions: The role of the matrix grain size and the bacteria surface protein. *Journal of Contaminant Hydrology*, 92: 255-73.
- Garon, D., Sage, L., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F. 2004. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. *Chemosphere*, 56: 159-66.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., Ahn, Y. 2016. Corrigendum: Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1837.
- Gill, R. T., Harbottle, M. J., Smith, J. W. N., Thornton, S. F. 2014. Electrokinetic-enhanced bioremediation of organic contaminants: A review of processes and environmental applications. *Chemosphere*, 107: 31-42.
- Gong, Ping. 1997. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 211-14.
- González-García, M., Fernández-López, C., Polesel, F., Trapp, S. 2019. Predicting the uptake of emerging organic contaminants in vegetables irrigated with treated wastewater – Implications for food safety assessment. *Environmental Research*, 172: 175-81.
- Greenberg, E. P., Canale-Parola, E. 1977. Chemotaxis in *Spirochaeta aurantia*. *Journal of Bacteriology*, 130: 485-94.



- Grimm, A. C., Harwood, C. S. 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4111-5.
- Grimm, A. C., Harwood, C. S. 1999. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of Bacteriology*, 181: 3310-6.
- Guo, X., Chen, K., Wen, Y., Li, R., Li, S., Jiang, J. 2009. Comparison of in-situ biodegrading abilities of *Pseudomonas putida* mutants: leuB- auxotroph, fliC- non-motility, and cheA- non-chemotaxis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 576-81.
- Hadibarata, T., Kristanti, R. A. 2013. Biodegradation and metabolite transformation of pyrene by basidiomycetes fungal isolate *Armillaria* sp. F022. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36: 461-68.
- Haritash, A. K., Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 1-15.
- Harms, H., Smith, K. E. C., Wick, L. Y. 2010. 'Microorganism-Hydrophobic Compound Interactions.' in Kenneth N. Timmis (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), 1479-90.
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D., Berg, G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321: 235-57.
- Hazrin-Chong, N. H., Marjo, C. E., Das, T., Rich, A. M., Manefield, M. 2014. Surface analysis reveals biogenic oxidation of sub-bituminous coal by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 6443-52.
- Hekman, W. E., Heijnen, C. E., Burgers, S. L. G. E., van Veen, J. A., van Elsas, J. D. 1995. Transport of bacterial inoculants through intact cores of two different soils as affected by water percolation and the presence of wheat plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 16: 143-57.
- Holzner, M., Morales, V. L., Willmann, M., Dentz, M. 2015. Intermittent Lagrangian velocities and accelerations in three-dimensional porous medium flow. *Physical Review E*, 92: 013015.
- Hori, K., Matsumoto, S. 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 424-34.
- Hückelhoven, R., Schuphan, I., Thiede, B., Schmidt, B. 1997. Biotransformation of Pyrene by Cell Cultures of Soybean (*Glycine max* L.), Wheat (*Triticum aestivum* L.), Jimsonweed (*Datura stramonium* L.), and Purple Foxglove (*Digitalis purpurea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 263-69.
- Ike, P. T. L., Birolli, W. G., Dos Santos, D. M., Porto, A. L. M., Souza, D. H. F. 2019. Biodegradation of anthracene and different PAHs by a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 8675-84.
- Jacobs, A., Lafolie, F., Herry, J. M., Debroux, M. 2007. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: cell surface properties and adhesion rate. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 59: 35-45.
- Jamal, M., Al-Shaikh, A. 2020. Bioaugmentation of halophilic consortia for the degradation of petroleum hydrocarbons and petroleum wastewater treatment.
- Jiang, G., Noonan, M., Buchan, G., Smith, N. 2007. Transport of *Escherichia coli* through variably saturated sand columns and modeling approaches. *Journal of Contaminant Hydrology*, 93: 2-20.
- Jimenez-Sanchez, C. 2013. 'Papel de la respuesta táctica en el transporte bacteriano a través del suelo y su implicación en la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno', Universidad de Sevilla.
- Jimenez-Sanchez, C., Wick, L. Y., Cantos, M., Ortega-Calvo, J. J. 2015. Impact of dissolved organic matter on bacterial tactic motility, attachment, and transport. *Environmental Science & Technology*, 49: 4498-505.
- Jimenez-Sanchez, C., Wick, L. Y., Ortega-Calvo, J. J. 2012. Chemical effectors cause different motile behavior and deposition of bacteria in porous media. *Environmental Science & Technology*, 46: 6790-7.



- Jimenez-Sanchez, C., Wick, L. Y., Ortega-Calvo, J. J. 2018. Impact of chemoeffectors on bacterial motility, transport, and contaminant degradation in sand-filled percolation columns. *Environmental Science & Technology*, 52: 10673-79.
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133: 71-84.
- Jones, K. C., de Voogt, P. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*, 100: 209-21.
- Jonker, M. T., van der Heijden, S. A. 2007. Bioconcentration factor hydrophobicity cutoff: An artificial phenomenon reconstructed. *Environmental Science & Technology*, 41: 7363-69.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., Lugtenberg, B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*, 7: 1809-17.
- Karmakar, R. 2021. State of the art of bacterial chemotaxis. *Journal of Basic Microbiology*, 61: 366-79.
- Kästner, M., Nowak, K. M., Miltner, A., Trapp, S., Schäffer, A. 2014. Classification and modelling of nonextractable residue (NER) formation of xenobiotics in soil – A synthesis. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44: 2107-71.
- Kathi, S., Khan, A. B. 2011. Phytoremediation approaches to PAH contaminated soil. *Indian Journal of Science and Technology*, 4: 56-63.
- Kazunga, C., Aitken, M. D. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1917-22.
- Kinyangi, J., Solomon, D., Liang, B., Lerotic, M., Wirick, S., Lehmann, J. 2006. Nanoscale biogeocomplexity of the organomineral assemblage in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 70: 1708-18.
- Kirby, B. J., Hasselbrink Jr., E. F. 2004. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *ELECTROPHORESIS*, 25: 187-202.
- Kong, L., Gao, Y., Zhou, Q., Zhao, X., Sun, Z. 2018. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. *Journal of Hazardous Materials*, 343: 276-84.
- Košňář, Z., Mercl, F., Tlustoš, P. 2018. Ability of natural attenuation and phytoremediation using maize (*Zea mays* L.) to decrease soil contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derived from biomass fly ash in comparison with PAHs-spiked soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153: 16-22.
- Kotoky, R., Rajkumari, J., Pandey, P. 2018. The rhizosphere microbiome: Significance in rhizoremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 217: 858-70.
- Krell, T., Lacal, J., Reyes-Darias, J. A., Jimenez-Sanchez, C., Sungthong, R., Ortega-Calvo, J. J. 2013. Bioavailability of pollutants and chemotaxis. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 451-56.
- Kristian-Stevik, T., Kari, A., Ausland, G., Fredrik Hanssen, J. 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Research*, 38: 1355-67.
- Kuhn, A., Ballach, H. J., Wittig, R. 2004. Studies in the biodegradation of 5 PAHs (phenanthrene, pyrene, fluoranthene, chrysene und benzo(a)pyrene) in the presence of rooted poplar cuttings. *Environmental Science and Pollution Research* 11: 22-32.
- Kumar, M., Bolan, N., Jasemizad, T., Padhye, L. P., Sridharan, S., Singh, L., Bolan, S., O'Connor, J., Zhao, H., Shaheen, S. M., Song, H., Siddique, K. H., Wang, H., Kirkham, M. B., Rinklebe, J. 2022. Mobilization of contaminants: Potential for soil remediation and unintended consequences. *Science of The Total Environment*, 839: 156373.



- Kumar, M., Bolan, N. S., Hoang, S. A., Sawarkar, A. D., Jasemizad, T., Gao, B., Keerthanan, S., Padhye, L. P., Singh, L., Kumar, S., Vithanage, M., Li, Y., Zhang, M., Kirkham, M. B., Vinu, A., Rinklebe, J. 2021. Remediation of soils and sediments polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons: To immobilize, mobilize, or degrade? *Journal of Hazardous Materials*, 420: 126534.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., Naidu, R., Megharaj, M. 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168: 944-68.
- Lahlou, M., Ortega-Calvo, J. J. 1999. Bioavailability of labile and desorption-resistant phenanthrene sorbed to montmorillonite clay containing humic fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18: 2729-35.
- Lau, E. V., Gan, S., Ng, H. K., Poh, P. E. 2014. Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environmental Pollution*, 184: 640-49.
- Law, A. M., Aitken, M. D. 2003. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5968-73.
- Lee, M., Lohmann, C., Szuttor, K., Auradou, H., Holm, C. 2021. The influence of motility on bacterial accumulation in a microporous channel. *Soft Matter*, 17: 893-902.
- Lee, S. Y., Kwon, J. H. 2020. Enhancement of toxic efficacy of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons transformed by *Sphingobium quisquiliarum*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17.
- Li, F., Guo, S., Wu, B., Wang, S. 2020. Pilot-scale electro-bioremediation of heavily PAH-contaminated soil from an abandoned coking plant site. *Chemosphere*, 244: 125467.
- Li, M., Yin, H., Zhu, M., Yu, Y., Lu, G., Dang, Z. 2021. Co-metabolic and biochar-promoted biodegradation of mixed PAHs by highly efficient microbial consortium QY1. *Journal of Environmental Sciences*, 107: 65-76.
- Li, N., Mozdzeń, K., Zhang, Z., Liu, C., Zandi, P., Sardar, M. F., Zhu, C. 2021. Rhizosphere effect on removal and bioavailability of PAHs in contaminated agricultural soil. *Biologia*, 76: 841-51.
- Li, X., Song, Y., Wang, F., Bian, Y., Jiang, X. 2019. Combined effects of maize straw biochar and oxalic acid on the dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons and microbial community structures in soil: A mechanistic study. *Journal of Hazardous Materials*, 364: 325-31.
- Liao, L., Chen, S., Peng, H., Yin, H., Ye, J., Liu, Z., Dang, Z., Liu, Z. 2015. Biosorption and biodegradation of pyrene by *Brevibacillus brevis* and cellular responses to pyrene treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115: 166-73.
- Liao, Q., Liu, H., Lu, C., Liu, J., Waigi, M. G., Ling, W. 2021. Root exudates enhance the PAH degradation and degrading gene abundance in soils. *Science of The Total Environment*, 764: 144436.
- Lima, A. T., Kleingeld, P. J., Heister, K., Loch, J. P. 2011. Removal of PAHs from contaminated clayey soil by means of electro-osmosis. *Separation and Purification Technology*, 79: 221-29.
- Lin, D., Zhu, L., He, W., Tu, Y. 2006. Tea plant uptake and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons from water and around air. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3658-62.
- Liu, Z., Gao, Z., Lu, X. 2020. An integrated approach to remove pahs from highly contaminated soil: Electro-fenton process and bioslurry treatment. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231.
- López-Vizcaíno, R., Navarro, V., Alonso, J., Yustres, Á, Cañizares, P., Rodrigo, M. A., Sáez, C. 2016. Geotechnical behaviour of low-permeability soils in surfactant-enhanced electrokinetic remediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 51: 44-51.





- Ma, L., Li, Y., Yao, L., Du, H. 2021. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil-turfgrass systems in urban Shanghai: Contamination profiles, in situ bioconcentration and potential health risks. *Journal of Cleaner Production*, 289: 125833.
- Madejón, P., Domínguez, M. T., Díaz, M. J., Madejón, E. 2016. Improving sustainability in the remediation of contaminated soils by the use of compost and energy valorization by *Paulownia fortunei*. *Science of The Total Environment*, 539: 401-09.
- Maletić, S. P., Beljin, J. M., Rončević, S. D., Grgić, M. G., Dalmacija, B. D. 2019. State of the art and future challenges for polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: sources, fate, bioavailability and remediation techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 365: 467-82.
- Maliszewska-Kordybach, B, Smreczak, B. 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-effect on plants. *Environmental Technology*, 21: 1099-110.
- Maliszewska-Kordybach, B. 2005. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly contaminated soils – the effect of soil physicochemical properties and aging. *Water, Air, and Soil Pollution*, 168: 113-28.
- Mallah, M. A., Changxing, L., Mallah, M. A., Noreen, S., Liu, Y., Saeed, M., Xi, H., Ahmed, B., Feng, F., Mirjat, A. A., Wang, W., Jabar, A., Naveed, M., Li, Jian-H., Zhang, Q. 2022. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. *Chemosphere*, 296: 133948.
- Mannik, J., Driessen, R., Galajda, P., Keymer, J. E., Dekker, C. 2009. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106: 14861-6.
- Manzetti, S. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: Environmental fate and transformation. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 33: 311-30.
- Mao, X., Wang, J., Ciblak, A., Cox, E. E., Riis, C., Terkelsen, M., Gent, D. B., Alshawabkeh, A. N. 2012. Electrokinetic-enhanced bioaugmentation for remediation of chlorinated solvents contaminated clay. *Journal of Hazardous Materials*, 213-214: 311-7.
- Marx, R. B., Aitken, M. D. 1999. Quantification of chemotaxis to naphthalene by *Pseudomonas putida* G7. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2847-52.
- Marx, R. B., Aitken, M. D. 2000. Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environmental Science & Technology*, 34: 3379-83.
- Masliyah, J. H., Bhattacharjee, S. 2006. *Electrokinetic and colloid transport phenomena* (John Wiley & Sons).
- Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R. 2014. 'Bioremediation.' in Philip Wexler (ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (Academic Press: Oxford), 485-89.
- Mellem, J. J., Baijnath, H., Odhav, B. 2009. Translocation and accumulation of Cr, Hg, As, Pb, Cu and Ni by *Amaranthus dubius* (Amaranthaceae) from contaminated sites. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 44: 568-75.
- Méndez, E., Pérez-Corona, M., Romero, O., Beltran, E., Castro, S., Corona, J. L., Corona, A., Cuevas, M., Bustos, Erika. 2012. Effects of electrode material on the efficiency of hydrocarbon removal by an electrokinetic remediation process. *Electrochimica Acta*, 86: 148-56.
- Miao, R., Guo, M., Zhao, X., Gong, Z., Jia, C., Li, X., Zhuang, J. 2020. Response of soil bacterial communities to polycyclic aromatic hydrocarbons during the phyto-microbial remediation of a contaminated soil. *Chemosphere*, 261: 127779.
- Mitchell, J. G., Kogure, K. 2006. Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS Microbiology Ecology*, 55: 3-16.
- Moghadam, M. J., Moayedi, H., Sadeghi, M. M., Hajiannia, A. 2016. A review of combinations of electrokinetic applications. *Environmental Geochemistry and Health*, 38: 1217-27.



- Mojiri, A., Zhou, J. L., Ohashi, A., Ozaki, N., Kindaichi, T. 2019. Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of The Total Environment*, 696: 133971.
- Moulton, R. C. , Montie, T. C. 1979. Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 137: 274-80.
- Nakajima, D., Kojima, E., Iwaya, S., Suzuki, J., Suzuki, S. 1996. Presence of 1-hydroxypyrene conjugates in woody plant leaves and seasonal changes in their concentrations. *Environmental Science & Technology*, 30: 1675-79.
- Neal, A. L., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Ton, J. 2012. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLOS ONE*, 7: e35498.
- Neidhardt, F.C., Curtiss, R. 1996. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (ASM Press).
- Nelson, K. E., Ginn, T. R. 2001. Theoretical investigation of bacterial chemotaxis in porous media. *Langmuir*, 17: 5636-45.
- Niqui-Arroyo, J. L., Bueno-Montes, M., Ortega-Calvo, J. J. 2011. 'Biodegradation of Anthropogenic Organic Compounds in Natural Environments.' in, *Biophysico-Chemical Processes of Anthropogenic Organic Compounds in Environmental Systems* (John Wiley & Sons Inc EE.UU.), 483-501.
- Niqui-Arroyo, J. L., Bueno-Montes, M., Posada-Baquero, R., Ortega-Calvo, J. J. 2006. Electrokinetic enhancement of phenanthrene biodegradation in creosote-polluted clay soil. *Environmental Pollution*, 142: 326-32.
- Niqui-Arroyo, J. L., Ortega-Calvo, J. J. 2007. Integrating biodegradation and electroosmosis for the enhanced removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from creosote-polluted soils. *Journal of Environmental Quality*, 36: 1444-51.
- Norman, R. S., Frontera-Suau, R., Morris Pamela, J. 2002. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5096-103.
- Nzila, A. 2013. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution*, 178: 474-82.
- Oh, J. K., Yegin, Y., Yang, F., Zhang, M., Li, J., Huang, S., Verkhoturov, S. V., Schweikert, E. A., Perez-Lewis, K., Scholar, E. A., Taylor, T. M., Castillo, A., Cisneros-Zevallos, L., Min, Y., Akbulut, M. 2018. The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion. *Scientific Reports*, 8: 17247.
- Olu-Owolabi, B. I., Diagboya, P. N., Adebowale, K. O. 2015. Sorption and desorption of fluorene on five tropical soils from different climes. *Geoderma*, 239-240: 179-85.
- Ordal, G. W., Villani, D. P., Rosendahl, M. S. 1979. Chemotaxis towards sugars by *Bacillus subtilis*. *The Journal of General Microbiology*, 115: 167-72.
- Ortega-Calvo, J. J., Gschwend, P. M. 2010. Influence of low oxygen tensions and sorption to sediment black carbon on biodegradation of pyrene. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 4430-37.
- Ortega-Calvo, J. J., Harmsen, J., Parsons, J. R., Semple, K. T., Aitken, M. D., Ajao, C., Eadsforth, C., Galay-Burgos, M., Naidu, R., Oliver, R., Peijnenburg, W. J., Römbke, J., Streck, G., Versonnen, B. 2015. From bioavailability science to regulation of organic chemicals. *Environmental Science & Technology*, 49: 10255-64.
- Ortega-Calvo, J. J., Jimenez-Sanchez, C., Pratarolo, P., Pullin, H., Scott, T. B., Thompson, I. P. 2016. Tactic response of bacteria to zero-valent iron nanoparticles. *Environmental Pollution*, 213: 438-45.
- Ortega-Calvo, J. J., Molina, R., Jimenez-Sanchez, C., Dobson, P. J., Thompson, I. P. 2011. Bacterial tactic response to silver nanoparticles. *Environmental Microbiology Reports*, 3: 526-34.
- Ortega-Calvo, J. J., Stibany, F., Semple, K. T., Schaeffer, A., Parsons, J. R., Smith, K. E. 2020. 'Why biodegradable chemicals persist in the environment? A look at bioavailability.' in Jose



- Julio Ortega-Calvo and John Robert Parsons (eds.), *Bioavailability of Organic Chemicals in Soil and Sediment* (Springer International Publishing: Cham), 243-65.
- Ortega-Calvo, J. J., Tejada-Agredano, M. C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J. L., Cantos, M. 2013. Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation? *Journal of Hazardous Materials*, 261: 733-45.
- Ortega-Calvo, J.J., Marchenko, A.I., Vorobyov, A.V., Borovick, R.V. 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 373-81.
- Ortega-Calvo, Jose Julio, Posada-Baquero, Rosa, Garcia, José Luis, Cantos, Manuel. 2017. "Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil as Affected by Microorganisms and Plants." In *Soil Biological Communities and Ecosystem Resilience*, edited by Martin Lukac, Paola Grenni and Mauro Gamboni, 305-19. Cham: Springer International Publishing.
- Ottemann, K. M., Miller, J. F. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Molecular Microbiology*, 24: 1109-17.
- Otto, S., Bruni, E. P., Harms, H., Wick, L. Y. 2017. Catch me if you can: dispersal and foraging of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J along mycelia. *The ISME Journal*, 11: 386-93.
- Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Pande, V., Samant, M. 2020. Bioremediation: an emerging effective approach towards environment restoration. *Environmental Sustainability*, 3: 91-103.
- Pandey, G., Jain, R. K. 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: Role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5789-95.
- Parales, R. E., Luu, R. A., Chen, G. Y., Liu, X., Wu, V., Lin, P., Hughes, J. G., Nesteryuk, V., Parales, J. V., Ditty, J. L. 2013. *Pseudomonas putida* F1 has multiple chemoreceptors with overlapping specificity for organic acids. *Microbiology (Reading)*, 159: 1086-96.
- Park, D., Park, S. J., Cho, S., Lee, Y., Lee, Y. K., Min, J. J., Park, B. J., Ko, S. Y., Park, J. O., Park, S. 2014. Motility analysis of bacteria-based microrobot (bacteriobot) using chemical gradient microchamber. *Biotechnology & Bioengineering*, 111: 134-43.
- Parkinson, J. S., Hazelbauer, G. L., Falke, J. J. 2015. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in Microbiology*, 23: 257-66.
- Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., Madamwar, D. 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, toxicity, and remediation approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11: 562813.
- Paul, D., Singh, R., Jain, R. K. 2006. Chemotaxis of *Ralstonia sp.* SJ98 towards p-nitrophenol in soil. *Environ Microbiol*, 8: 1797-804.
- Pennathur, S., Santiago, J. G. 2005. Electrokinetic transport in nanochannels. 1. Theory. *Analytical Chemistry*, 77: 6772-81.
- Penner, T. J., Foght, J. M., Budwill, K. 2010. Microbial diversity of western Canadian subsurface coal beds and methanogenic coal enrichment cultures. *International Journal of Coal Geology*, 82: 81-93.
- Pereni, C. I., Zhao, Q., Liu, Y., Abel, E. 2006. Surface free energy effect on bacterial retention. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48: 143-47.
- Pham, T., Sillanpää, M. 2020. 'Ultrasonic and electrokinetic remediation of low permeability soil contaminated with persistent organic pollutants.' in Milka Sillanpää (ed.), *Advance Water Treatment. Electrchemical Methods*, 227-310.
- Pignatello, J. J., Mitch, W. A., Xu, W. 2017. Activity and reactivity of pyrogenic carbonaceous matter toward organic compounds. *Environmental Science & Technology*, 51: 8893-908.
- Pignatello, J. J., Nason, S. L. 2020. 'Importance of soil properties and processes on bioavailability of organic compounds.' in Jose Julio Ortega-Calvo and John Robert Parsons (eds.), *Bioavailability of Organic Chemicals in Soil and Sediment* (Springer International Publishing: Cham), 7-41.



- Polonio, Á, Vida, C., de Vicente, A., Cazorla, F. M. 2017. Impact of motility and chemotaxis features of the rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 on its biocontrol of avocado white root rot. *International Microbiology*, 20: 95-104.
- Poortinga, A. T., Bos, R., Norde, W., Busscher, H. J. 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface science reports*, 47: 1-32.
- Posada-Baquero, R., Grifoll, M., Ortega-Calvo, J. J. 2019. Rhamnolipid-enhanced solubilization and biodegradation of PAHs in soils after conventional bioremediation. *Science of The Total Environment*, 668: 790-96.
- Posada-Baquero, R., Jiménez-Volkerink, S. N., García, J. L., Vila, J., Cantos, M., Grifoll, M., Ortega-Calvo, J. J. 2020. Rhizosphere-enhanced biosurfactant action on slowly desorbing PAHs in contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 720: 137608.
- Posada-Baquero, R., Semple, K. T., Ternero, M., Ortega-Calvo, J. J. 2022. Determining the bioavailability of benzo(a)pyrene through standardized desorption extraction in a certified reference contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 803: 150025.
- Pugazhendi, A., Qari, H., Al-Badry Basahi, J. M., Godon, J. J., Dhavamani, J. 2017. Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and the treatment of petroleum wastewater at extreme conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 121: 44-54.
- Qin, Jinyi, Sun, Xiaohui, Liu, Yang, Berthold, Tom, Harms, Hauke, Wick, Lukas Y. 2015. Electrokinetic Control of Bacterial Deposition and Transport. *Environmental Science & Technology*, 49: 5663-71.
- Rabiei, P., Mohabatkar, H., Behbahani, M. 2019. Studying the effects of several heat-inactivated bacteria on colon and breast cancer cells. *Molecular Biology Resarch Communications*, 8: 91-98.
- Ramadan, B. S., Sari, G. L., Rosmalina, R. T., Effendi, A. J., Hadrah. 2018. An overview of electrokinetic soil flushing and its effect on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 218: 309-21.
- Reichenberg, F., Mayer, P. 2006. Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1239-45.
- Reyes-Darias, J. A., García, V., Rico-Jiménez, M., Corral-Lugo, A., Lesouhaitier, O., Juárez-Hernández, D., Yang, Y., Bi, S., Feuilloley, M., Muñoz-Rojas, J., Sourjik, V., Krell, T. 2015. Specific gamma-aminobutyrate chemotaxis in *Pseudomonas* with different lifestyle. *Molecular Microbiology*, 97: 488-501.
- Rheay, H. T., Omondi, E. C., Brewer, C. E. 2021. Potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) for paired phytoremediation and bioenergy production. *GCB Bioenergy*, 13: 525-36.
- Rhodes, A. H., McAllister, L. E., Chen, R., Semple, K. T. 2010. Impact of activated charcoal on the mineralisation of <sup>14</sup>C-phenanthrene in soils. *Chemosphere*, 79: 463-69.
- Richard, E. S., Krishna, R. R. 2005. Surfactant-enhanced electrokinetic remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heterogeneous subsurface environments. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 4: 327-39.
- Riding, M. J., Doick, K. J., Martin, F. L., Jones, K. C., Semple, K. T. 2013. Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: Fundamentals to application. *Journal of Hazardous Materials*, 261: 687-700.
- Rivas, F. J. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 138: 234-51.
- Rolando, L., Vila, J., Posada-Baquero, R., Castilla-Alcantara, J. C., Barra-Caracciolo, A., Ortega-Calvo, J. J. 2020. Impact of bacterial motility on biosorption and cometabolism of pyrene in a porous medium. *Science of The Total Environment*, 717: 137210.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 29-33.



- Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., Sarkar, J., Chatterjee, A., Saha, A., Sarkar, P., Sar, P., Kazy, S. K. 2018. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource Technology*, 253: 22-32.
- Saba, B., Rafique, U., Hashmi, I. 2011. Adsorption kinetics of anthracene and phenanthrene in different soils of Attock Refinery Limited (ARL) Rawalpindi, Pakistan. *Desalination and Water treatment*, 30: 333-38.
- Saberi, N., Aghababaei, M., Ostovar, M., Mehrnahad, H. 2018. Simultaneous removal of polycyclic aromatic hydrocarbon and heavy metals from an artificial clayey soil by enhanced electrokinetic method. *Journal of Environmental Management*, 217: 897-905.
- Saeedi, M., Li, L. Y., Grace, J. R. 2018. Desorption and mobility mechanisms of co-existing polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in clays and clay minerals. *Journal of Environmental Management*, 214: 204-14.
- Sakshi, Singh, S., Haritash, A. K. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16.
- Sarma, P. M., Duraja, P., Deshpande, S., Lal, B. 2010. Degradation of pyrene by an enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata* PS4040. *Biodegradation*, 21: 59-69.
- Sayara, T., Sánchez, A. 2020. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Process enhancement through composting/compost. *Applied Sciences*, 10: 3684.
- Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M., Imboden, D. M. 2005. 'Air-Organic Solvent and Air-Water Partitioning.' in *Environmental Organic Chemistry* (John Wiley & Sons), 181-212.
- Schweinitzer, T., Josenhans, C. 2010. Bacterial energy taxis: a global strategy? *Archives of Microbiology*, 192: 507-20.
- Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H. 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology*, 38: 228a-31a.
- Sen, T. K., Das, D., Khilar, K. C., Suraishkumar, G. K. 2005. Bacterial transport in porous media: New aspects of the mathematical model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 260: 53-62.
- Sepehrnia, N., Mahboubi, A. A., Mosaddeghi, M. R., Safari Sinejani, A. A., Khodakaramian, G. 2014. *Escherichia coli* transport through intact gypsiferous and calcareous soils during saturated and unsaturated flows. *Geoderma*, 217-218: 83-89.
- Seth, R., Mackay, D., Muncke, J. 1999. Estimating the organic carbon partition coefficient and its variability for hydrophobic chemicals. *Environmental Science & Technology*, 33: 2390-94.
- Shahriari-Moghadam, M., Ebrahimipour, G., Abtahi, B., Ghassempour, A., Hashtroudi, M. S. 2014. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12: 114.
- Shan, Y., Harms, H., Wick, L. Y. 2018. Electric field effects on bacterial deposition and transport in porous media. *Environmental Science & Technology*, 52: 14294-301.
- Shan, Y., Liu, L., Liu, Y., Harms, H., Wick, L. Y. 2020. Effects of electrokinetic phenomena on bacterial deposition monitored by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Environmental Science & Technology*, 54: 14036-45.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., McLean, M. D. 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, 4: 446-52.
- Sijm, D., Kraaij, R., Belfroid, A. 2000. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environmental Pollution*, 108: 113-19.
- Siles, J. A., García-Sánchez, M. 2018. 'Microbial dynamics during the bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils through biostimulation: An overview.' in Ram Prasad and Elisabet Aranda (eds.), *Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology* (Springer International Publishing: Cham), 115-34.



- Singh, R., Olson, M. S. 2008. 'Application of bacterial swimming and chemotaxis for enhanced bioremediation.' in Vishal Shah (ed.), *Emerging Environmental Technologies* (Springer Netherlands: Dordrecht), 149-72.
- Smets, B. F., Grasso, D., Engwall, M. A., Machinist, B. J. 1999. Surface physicochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* and impact on adhesion and transport through porous media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14: 121-39.
- Smith, K. E., Rein, A., Trapp, S., Mayer, P., Karlson, U. G. 2012. Dynamic passive dosing for studying the biotransformation of hydrophobic organic chemicals: microbial degradation as an example. *Environmental Science & Technology*, 46: 4852-60.
- Smułek, W., Sydow, M., Zabielska-Matejuk, J., Kaczorek, E. 2020. Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH – A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187: 109843.
- Song, W., Vidonish, J. E., Kamath, R., Yu, P., Chu, C., Moorthy, B., Gao, B., Zygorakis, K., Alvarez, P. J. . 2019. Pilot-scale pyrolytic remediation of crude-oil-contaminated soil in a continuously-fed reactor: Treatment intensity trade-offs. *Environmental Science & Technology*, 53: 2045-53.
- Sun, S., Wang, J., Zhu, L., Liao, D., Gu, M., Ren, L., Kapulnik, Y., Xu, G. 2012. An active factor from tomato root exudates plays an important role in efficient establishment of mycorrhizal symbiosis. *PLOS ONE*, 7: e43385.
- Sun, Z., Wang, L., Yang, S., Xun, Y., Zhang, T., Wei, W. 2022. Thermally enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a highly contaminated aged soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10: 107236.
- Tang, X., Li, R., Han, D., Wu, X. 2020. Impacts of electrokinetic isolation of phosphorus through pore water drainage on sediment phosphorus storage dynamics. *Environmental Pollution*, 266: 115210.
- Tao, Y., Zhang, S., Wang, Z., Christie, P. 2008. Predicting bioavailability of pahs in soils to wheat roots with triolein-embedded cellulose acetate membranes and comparison with chemical extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10817-23.
- Tauler, M., Vila, J., Nieto, J. M., Grifoll, M. 2016. Key high molecular weight PAH-degrading bacteria in a soil consortium enriched using a sand-in-liquid microcosm system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 3321-36.
- Tena-Garitaonandia, M., Llamas, I., Toral, L., Sampedro, I. 2019. Chemotaxis of halophilic bacterium *Halomonas anticariensis* FP35 towards the environmental pollutants phenol and naphthalene. *Science of The Total Environment*, 669: 631-36.
- Tian, Z., Gold, A., Nakamura, J., Zhang, Z., Vila, J., Singleton, D. R., Collins, L. B., Aitken, M. D. 2017. Nontarget analysis reveals a bacterial metabolite of pyrene implicated in the genotoxicity of contaminated soil after bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 51: 7091-100.
- Tohidifar, P., Bodhankar, G. A., Pei, S., Cassidy, C. K., Walukiewicz, H. E., Ordal, G. W., Stansfeld, P. J., Rao, C. V. 2020. The unconventional cytoplasmic sensing mechanism for ethanol chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *mBio*, 11.
- Torkzaban, S., Tazehkand, S. S., Walker, S. L., Bradford, S. A. 2008. Transport and fate of bacteria in porous media: Coupled effects of chemical conditions and pore space geometry. *Water Resources Research*, 44.
- Totsche, K. U., Amelung, W., Gerzabek, M. H., Guggenberger, G., Klumpp, E., Knief, C., Lehndorff, E., Mikutta, R., Peth, S., Prechtel, A., Ray, N., Kögel-Knabner, I. 2018. Microaggregates in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 181: 104-36.
- Trapido, M. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. *Environmental Pollution*, 105: 67-74.
- Tsibart, A. S., Gennadiev, A. N. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Sources, behavior, and indication significance (a review). *Eurasian Soil Science*, 46: 728-41.



Upadhyay, P., Chakma, S. 2022. 'Remedial technologies for future waste management.' in Deepak Yadav, Pradeep Kumar, Pardeep Singh and Daniel A. Vallero (eds.), *Hazardous Waste Management* (Elsevier), 305-22.

USEPA-IRIS. 1990. 'Quantitative Estimate of Carcinogenic from Oral Exposure. Pyrene (CASRN 129-00-0)'. [https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance\\_nmbr=445](https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=445).

Usman, A. R. , Alkredaa, R. S., Al-Wabel, M. I. 2013. Heavy metal contamination in sediments and mangroves from the coast of Red Sea: *Avicennia marina* as potential metal bioaccumulator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97: 263-70.

Velasco-Casal, P. 2007. 'Papel de la quimiotaxis en el transporte bacteriano y la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos', Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Universidad de Sevilla.

Velasco-Casal, P., Wick, L. Y., Ortega-Calvo, J. J. 2008. Chemoeffectors decrease the deposition of chemotactic bacteria during transport in porous media. *Environmental Science & Technology*, 42: 1131-7.

Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B., Brözel, V. S. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4970-7.

Wang, M., Ford, R. M. 2009. Transverse bacterial migration induced by chemotaxis in a packed column with structured physical heterogeneity. *Environmental Science & Technology*, 43: 5921-27.

Wang, M., Ford, R. M. 2010. Quantitative analysis of transverse bacterial migration induced by chemotaxis in a packed column with structured physical heterogeneity. *Environmental Science & Technology*, 44: 780-86.

Wang, X., Lanning, L. M., Ford, R. M. 2016. Enhanced retention of chemotactic bacteria in a pore network with residual NAPL contamination. *Environmental Science & Technology*, 50: 165-72.

Weiss, T. H., Mills, A. L., Hornberger, G. M., Herman, J. S. 1995. Effect of bacterial cell shape on transport of bacteria in porous media. *Environmental Science & Technology*, 29: 1737-40.

Wick, L. Y., Mattle, P. A., Wattiau, P., Harms, H. 2004. Electrokinetic transport of PAH-degrading bacteria in model aquifers and soil. *Environmental Science & Technology*, 38: 4596-602.

Wick, L. Y., Springael, D., Harms, H. 2001. 'Bacterial Strategies to Improve the Bioavailability of Hydrophobic Organic Pollutants.' in Rainer Stegmann, Gerd Brunner, Wolfgang Calmano and Gerhard Matz (eds.), *Treatment of Contaminated Soil: Fundamentals, Analysis, Applications* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), 203-17.

Worrich, A., König, S., Miltner, A., Banitz, T., Centler, F., Frank, K., Thullner, M., Harms, H., Kästner, M., Wick Lukas, Y., Stams, A. J. 2016. Mycelium-like networks increase bacterial dispersal, growth, and biodegradation in a model ecosystem at various water potentials. *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 2902-08.

Xu, H., Li, X., Sun, Y., Shi, X., Wu, J. 2016. Biodegradation of pyrene by free and immobilized cells of *Herbaspirillum chlorophenicum* strain FA1. *Water, Air & Soil Pollution*, 227: 120.

Yang, P., van Elsas, J. D. 2018. Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil. *Applied Soil Ecology*, 129: 112-20.

Yang, Y., Ratté, D., Smets, B. F., Pignatello, J. J., Grasso, D. 2001. Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. *Chemosphere*, 43: 1013-21.

Yang, Z., Zhu, L. 2007. Performance of the partition-limited model on predicting ryegrass uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, 67: 402-09.

Yen, K. M., Gunsalus, I. C. 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *Journal of Bacteriology*, 162: 1008-13.

Yi, H., Crowley, D. E. 2007. Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentrations of linoleic acid. *Environmental Science & Technology*, 41: 4382-8.



- Yuan, Y., Guo, S-H., Li, F-M., Li, T-T. 2013. Effect of an electric field on n-hexadecane microbial degradation in contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77: 78-84.
- Yustres, A., López-Vizcaíno, R., Sáez, C., Cañizares, P., Rodrigo, M. A., Navarro, V. 2018. Water transport in electrokinetic remediation of unsaturated kaolinite. Experimental and numerical study. *Separation and Purification Technology*, 192: 196-204.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., Li, X. 2010. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 183: 718-23.
- Zhang, D., Zhu, L., Li, F. 2013. Influences and mechanisms of surfactants on pyrene biodegradation based on interactions of surfactant with a *Klebsiella oxytoca* strain. *Bioresource Technology*, 142: 454-61.
- Zhang, H., Ulrich, A. C., Liu, Y. 2015. Retention and transport of an anaerobic trichloroethene dechlorinating microbial culture in anaerobic porous media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 130: 110-18.
- Zhang, M., Wu, B., Guo, P., Wang, S., Guo, S. 2021. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil under the superimposed electric field condition. *Chemosphere*, 273: 128723.
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., Zhang, R. 2013. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374: 689-700.
- Zhang, X., Gao, B., Zheng, Y., Hu, X., Creamer, A. E., Annable, M. D., Li, Y. 2017. Biochar for volatile organic compound (VOC) removal: Sorption performance and governing mechanisms. *Bioresource Technology*, 245: 606-14.
- Zhang, Y., Zhu, S., Xiao, R., Wang, J., Li, F. 2008. Vertical transport of polycyclic aromatic hydrocarbons in different particle-size fractions of sandy soils. *Environmental Geology*, 53: 1165-72.
- Zhang, Y., Tao, S., Shen, H., Ma, J. 2009. Inhalation exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk of Chinese population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 21063-67.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., Xu, P. 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, 102: 4111-16.
- Zhao, Z., Wong, J. 2010. Rapid biodegradation of benzo[a]pyrene by *Bacillus subtilis* BUM under thermophilic condition. *Environmental Engineering Science*, 27: 939-45.
- Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H-E., He, L., Heo, J., Hwang, G. 2021. Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
- Zhong, Y., Luan, T., Wang, X., Lan, C., Tam, N. F. . 2007. Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. strain PheB4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 175-86.
- Zhong, Y., Zou, S., Lin, L., Luan, T., Qiu, R., Tam, N. F. 2010. Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 2043-9.
- Zhu, X., Ni, X., Waigi, M. G., Liu, J., Sun, K., Gao, Y. 2016. Biodegradation of mixed pahs by PAH-degrading endophytic bacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13.
- Zhu, Y., Zhang, S., Huang, H., Wen, B. 2009. Effects of maize root exudates and organic acids on the desorption of phenanthrene from soils. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 920-26.





## 8. COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**



### Artículos en revistas científicas:

- Rolando, L., Vila, J., Posada-Baquero, R., **Castilla-Alcantara, J. C.**, Barra-Caracciolo, A., Ortega-Calvo, J. J. 2020. Impact of bacterial motility on biosorption and cometabolism of pyrene in a porous medium. *Science of The Total Environment*, 717: 137210.
- Fernández-López, C., Posada-Baquero, R., García, J. L., **Castilla-Alcantara, J. C.**, Cantos, M., Ortega-Calvo, J. J. 2021. Root-mediated bacterial accessibility and cometabolism of pyrene in soil. *Science of The Total Environment*, 760: 143408.
- **Castilla-Alcantara, J. C.**, Akbari, A., Ghoshal, S., Ortega-Calvo, J. J. 2022. Role of tactic response on the mobilization of motile bacteria through micrometer-sized pores. *Science of The Total Environment*, 832: 154938.
- **Castilla-Alcantara, J. C.**, Posada-Baquero, R., Balseiro-Romero, M., Fernández-López, C., García, J. L., Fernandez-Vazquez A., Parson J. R., Cantos, M., Ortega-Calvo, J. J. 2023. Risk reductions during pyrene biotransformation and mobilization in a novel plant- bacteria-biochar system. *Science of The Total Environment*, 868: 161600.
- Dos artículos en desarrollo: “*Behavioural influences on mineralization and cometabolism of PAHs by motile bacteria in membrane bioreactors with restricted porosities*” y “*Recent approaches on the influence of different chemical effectors in the bacterial transport and cometabolism of pyrene in column systems*”

Los artículos han sido publicados en la revista *Science of The Total Environment* que cuenta con un factor de impacto de 10,753 (Q1).

### Presentaciones a congresos:

- Conferencia en el I Congreso de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Rey Juan Carlos bajo el título: “Movilidad bacteriana y su implicación en la biodisponibilidad y biodegradación de suelos contaminados con compuestos orgánicos. 2018
- Comunicación formato póster en el SETAC Europe 29<sup>th</sup> Annual Meeting en Helsinki con el título: “Role of motility behaviour in the dispersal of pollutant-degrading bacteria through restricted porosities”. 2019
- Comunicación formato póster en el SETAC Europe 30<sup>th</sup> Annual Meeting con el título: “Chemoeffectors influence on the motile behaviour and dispersion of pollutant-degrading bacteria in membrane bioreactors with restricted porosities”. 2020
- Comunicación formato póster en el SETAC Europe 30<sup>th</sup> Annual Meeting con el título: “Pyrene cometabolism in soil by *Pseudomonas putida* G7 and metabolites uptake and distribution by sunflowers crops”. 2020



- Comunicación formato póster en el SETAC Europe 30<sup>th</sup> Annual Meeting con el título: "Pyrene cometabolism in soil by *Pseudomonas putida* G7 and metabolites uptake and distribution by sunflowers crops". 2020
- Comunicación formato póster en el SETAC Europe 31<sup>st</sup> Annual Meeting (virtual conference) con el título: "Behavioural influences on mineralization and cometabolism of PAHs by motile bacteria in membrane bioreactors with restricted porosities". 2021
- Comunicación formato póster en el SETAC Europe 32<sup>nd</sup> Annual Meeting en Copenhagen con el título: "Risk reductions during biotransformation and mobilization of pyrene in a model plant-bacteria-soil system". 2022

---

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**REGAGE23e00010408683**

CSV

**GEISER-00e6-71d5-a618-4a28-80f2-e652-33f5-0d7e**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**20/02/2023 08:17:39 Horario peninsular**

