

Descifrando las redes metabólicas microbianas implicadas en la restauración funcional de suelos y aguas contaminados

JOAQUIM VILA, SALVADOR LLADÓ, MARIA JORDÁN, POL MARTÍN, NÚRIA FORNS Y MAGDALENA GRIFOLL

Grupo de Biodegradación y Biorremediación, Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

✉ mgrifoll@ub.edu

Nuestro grupo (figura 1), integrado en el Grupo de investigación interuniversitario Biotecnología Sostenible y Biorremediación (2021 SGR 00852, Generalitat de Catalunya), posee una trayectoria de más de 30 años en el estudio de los procesos bacterianos de degradación de contaminantes orgánicos, y su aplicación en el desarrollo de estrategias de biorremediación de aguas y suelos contaminados. Esta actividad se ha desarrollado en gran parte en estrecha colaboración con el grupo de investigación en Biorremediación y Biodisponibilidad del IRNAS-CSIC, liderado por el Dr. José Julio Ortega-Calvo, a lo largo de 9 proyectos del Plan Nacional. Utilizando las mezclas de hidrocarburos, especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), como contaminante modelo, buscamos soluciones a las limitaciones actuales de la biorremediación. El objetivo final es consolidar esta estrategia basada en la naturaleza como una alternativa segura, fiable y sostenible a las metodologías físico-químicas para la descontaminación de suelos y aguas, restaurando sus funciones ecosistémicas. La base para alcanzar este objetivo es comprender el funcionamiento de las redes metabólicas microbianas que operan en estos ambientes para i) identificar mecanismos que permitan modular su actividad, disminuyendo el riesgo asociado a la formación de productos de transformación y a la presencia de fracciones residuales de contaminante; ii) desarrollar nuevas herramientas para monitorizar los procesos de biodegradación; iii) mejorar la evaluación del riesgo, actualmente limitada a determinar la concentración de un número limitado de dianas analíticas; y iv) restaurar el microbioma del suelo y su funcionalidad. Además de esta vertiente de investigación básica, el grupo mantiene una importante



Figura 1. Miembros del Grupo de Investigación en Biodegradación y Biorremediación de la UB. La imagen incluye los componentes senior Joaquim Vila (Profesor agregado), Salvador Lladó (Profesor Agregado), y Magdalena Grifoll (Catedrática), así como el técnico responsable de transferencia, Pol Martín, la investigadora predoctoral Maria Jordán, y varios estudiantes de TFM y TFG. La investigadora post-doctoral Núria Fornés no aparece en la foto.

actividad de transferencia tecnológica al sector medioambiental, evaluando la viabilidad de la biorremediación en diferentes escenarios, asesorando en la elección de la estrategia más apropiada, y monitorizando el éxito de su implementación.

El estudio de las redes metabólicas microbianas que operan en ambientes contaminados se realiza mediante un abordaje polifásico (figura 2) iniciado a principios de los 90 con el aislamiento de las primeras cepas con capacidad para degradar HAPs.

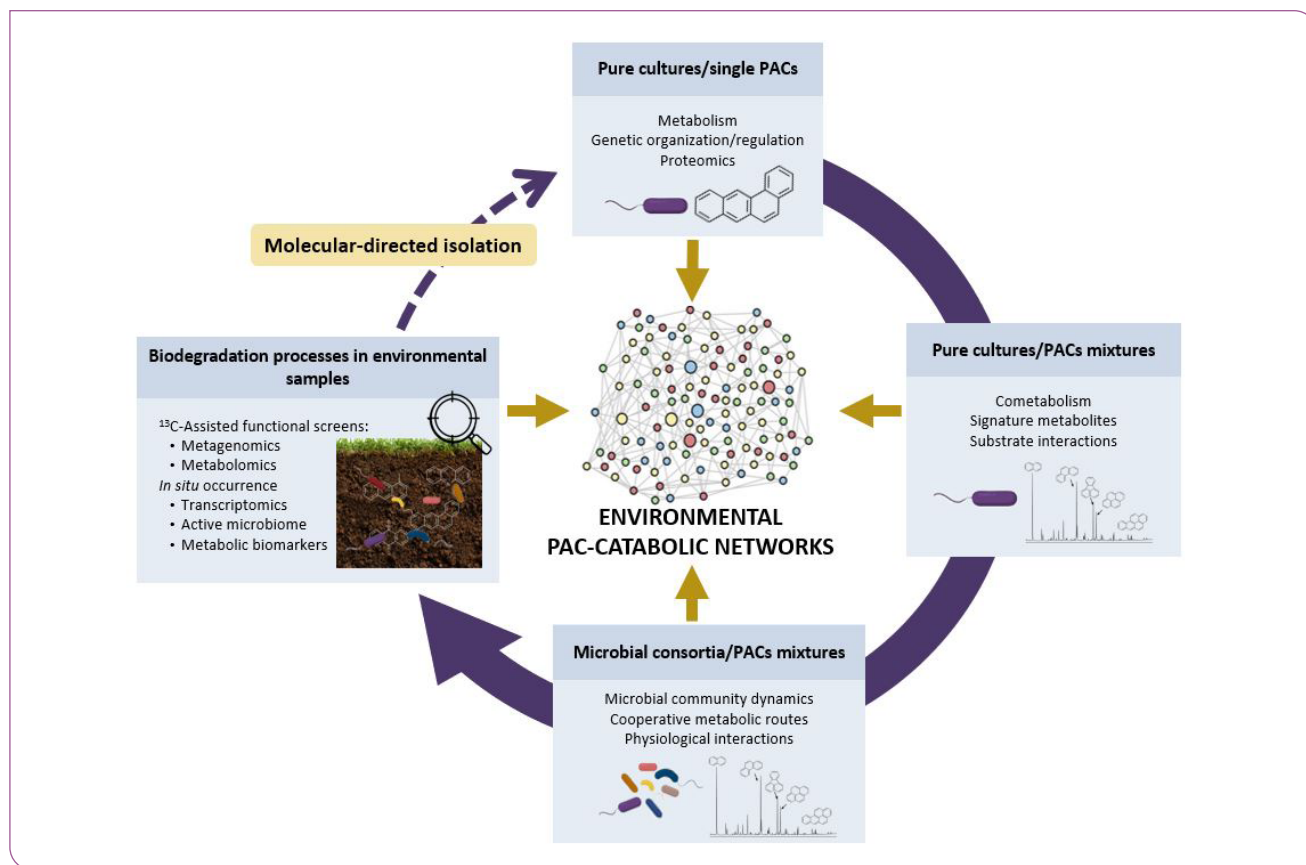


Figura 2. Flujo de información en el abordaje polifásico implantado por el grupo de investigación para comprender las redes metabólicas microbianas implicadas en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos y aguas contaminados. La integración de información taxonómica y funcional de cultivos puros, consorcios microbianos y comunidades ambientales tras su exposición a HAPs o sus mezclas debe permitir reconstruir los procesos microbianos que tienen lugar en ambientes contaminados. La información obtenida de los abordajes metagenómicos debe permitir definir dianas y estrategias para el aislamiento dirigido de nuevos filotipos clave detectados. Adaptado de Vila et al., 2015.

El aislamiento ha dado como resultado la obtención de una amplia colección de estirpes Gram negativas asociadas a la degradación de compuestos de 2 y 3 anillos aromáticos, y de micobacterias de crecimiento rápido asociadas a la degradación de compuestos de mayor peso molecular. A partir de la identificación de metabolitos acumulados durante el crecimiento de estas cepas frente a sustratos individuales, se ha podido reconstruir nuevas rutas para la utilización de HAPs como el fluoreno, el pireno o el fluoranteno. Actualmente, estos estudios metabolómicos se complementan con el análisis genómico y transcriptómico de los aislados, permitiendo una reconstrucción multiómica de los procesos de degradación a nivel celular.

Sin embargo, en el medio ambiente los contaminantes orgánicos generalmente no se encuentran como compuestos puros individuales, sino formando parte de mezclas complejas. Por este motivo, el

siguiente paso en el abordaje del grupo ha sido investigar las acciones de estas estirpes aisladas sobre mezclas de hidrocarburos. Estos trabajos han demostrado la versatilidad de estos microorganismos que, utilizando sustratos específicos para el crecimiento, actúan simultáneamente sobre un amplio espectro de análogos estructurales, poniéndose de manifiesto la importancia de los fenómenos de oxidación parcial y cometabolismo durante la degradación de mezclas ambientales. Estos procesos dan lugar a la formación y acumulación de productos de transformación microbiana, como cetonas y quinonas aromáticas, cuya presencia se ha observado en suelos y matrices ambientales contaminadas. De hecho, las mejoras en las metodologías analíticas han permitido identificar no solo productos de oxidación, sino también una amplia diversidad de co-contaminantes asociados a los HAPs, como son los metil derivados y los compuestos heterocíclicos, que actual-

mente son obviados durante los análisis de riesgo. La presencia de estos productos, algunos con mayor toxicidad y biodisponibilidad que los HAPs, y cuyo destino ambiental se desconoce, supone un riesgo a considerar durante la biorremediación de emplazamientos contaminados.

Los estudios con cultivos puros aportan una información fundamental sobre los mecanismos implicados en la degradación de contaminantes orgánicos y son clave para nutrir las bases de datos que permiten enfoques -ómicos. Sin embargo, infraestiman la diversidad real de las comunidades naturales y no permiten conocer las interacciones entre los distintos componentes que contribuyen a los flujos de carbono que determinan la eventual eliminación de los contaminantes orgánicos. La introducción de herramientas de metagenómica basadas en la amplificación del gen del ARNr 16S ha permitido identificar nuevas poblaciones asociadas a la degradación de

hidrocarburos, ya sea a partir del análisis de los cambios estructurales del microbioma de muestras ambientales en respuesta a la presencia de contaminantes o del estudio de consorcios microbianos. Estas estrategias permiten asignar un posible rol a las poblaciones detectadas mediante inferencia filogenética basada en aislados degradadores conocidos. Sin embargo, la función de una fracción importante de las comunidades ambientales, para las que todavía no existen representantes aislados, permanece desconocida. Actualmente, la utilización de herramientas de metagenómica funcional ha supuesto un paso adelante en la comprensión de estas poblaciones, permitiendo la reconstrucción de los genomas de bacterias no aisladas a partir de datos metagenómicos. Un avance adicional en esta estrategia es la utilización de estas herramientas metagenómicas combinadas con la aplicación de isótopos estables (normalmente ^{13}C para contaminantes orgánicos) a muestras ambientales (*DNA-stable isotope probing*, en inglés). Esta aproximación permite recuperar específicamente los genomas de las poblaciones ligadas a la utilización de un contaminante concreto introducido como trazador, permitiendo la reconstrucción *in situ* de rutas metabólicas de contaminantes diana sin necesidad del aislamiento de los microorganismos implicados.

El análisis genómico de bacterias todavía no aisladas proporciona, además, información sobre sus potenciales auxotrofías o requerimientos nutricionales específicos, lo que permite el diseño de nuevas estrategias de aislamiento dirigido. Recientemente, se ha aplicado con éxito esta estrategia para la recuperación en cultivo puro de aislados especializados en la degradación de productos de transformación de HAPs, que hasta el momento se habían mostrado elusivos al cultivo. Mediante el posterior análisis multiómico de estos cultivos hemos reconstruido rutas metabólicas para la degradación de compuestos polares, identificando enzimas clave para su degradación atípicos en el metabolismo de HAPs. Estas poblaciones, altamente especializadas en la degradación de compuestos polares, ponen de manifiesto la importancia de las complejas redes catabólicas microbianas para la eliminación completa del riesgo asociado a los contaminantes orgánicos y sus productos de transformación.

Como se ha comentado, nuestro grupo de investigación, además de realizar investigación básica en el campo de la

biodegradación y biorremediación de contaminantes orgánicos, tiene una elevada actividad de transferencia tecnológica al sector medioambiental. Realizamos tareas de diseño y evaluación de estrategias de biorremediación en emplazamientos contaminados, facilitando la toma de decisiones en relación a los tratamientos más adecuados para cada emplazamiento específico. Estas estrategias incluyen tanto aproximaciones de bioestimulación, como el desarrollo y escalado de inóculos microbianos *ad-hoc* para su aplicación en estrategias de bioaumento con poblaciones autóctonas. Posteriormente, para garantizar la efectividad de los tratamientos propuestos, llevamos a cabo una monitorización diagnóstica del proceso en base la detección de indicadores de biodegradación activa. Estos indicadores incluyen el recuento de poblaciones degradadoras específicas, la aplicación de una batería de biomarcadores moleculares por qPCR para la cuantificación de genes clave ligados a procesos de biodegradación, el seguimiento de cambios en el microbioma en respuesta al tratamiento, o la identificación de marcadores químicos. Entre estos últimos se incluye la elaboración de ratios diagnóstico a partir de cambios en la composición de mezclas de contaminantes atribuibles a degradación microbiana, el enriquecimiento isotópico mediante CSIA (*compound specific isotopic analysis*, en inglés), o la detección de productos de transformación microbiana.

Publicaciones seleccionadas (últimos 10 años)

Jiménez-Volkerink SN, Jordán M, Smidt H, Minguillón C, Vila J, Grifoll M. (2023). Metagenomic insights into the microbial cooperative networks of a benz(a)anthracene-7,12-dione degrading community from a creosote-contaminated soil. *Sci. Tot. Environ.* 907: 167832.

Jiménez-Volkerink SN, Jordán M, Smidt H, Singleton DR, Grifoll M, Vila J. (2023). Bacterial benz(a)anthracene catabolic networks in contaminated soils and their modulation by other co-occurring HMW-PAHs. *Environ. Pollution.* 328: 121624.

Jiménez-Volkerink SN, Vila J, Jordán M, Minguillón C, Smidt H, Grifoll M. (2023). Multi-omic profiling of a newly isolated oxy-PAH degrading specialist from

PAH-contaminated soil reveals bacterial mechanisms to mitigate the risk posed by polar transformation products. *Environ. Sci. Technol.* 57: 139-149.

Lundstedt S, Bandowe BAM, Wickle W, Boll E, Christensen J, Vila J, Grifoll M, Faure P, Biance C, Lorgeoux C, Larsson M, Irgum KF, Ivarsson P, Ricci M. (2014). First intercomparison study on the analysis of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (oxy-PAHs) and nitrogen heterocyclic polycyclic aromatic compounds (N-PACs) in contaminated soil. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 57: 83-92.

Posada-Baquero R, Jiménez-Volkerink SN, García JL, Vila J, Cantos M, Grifoll M, Ortega-Calvo JJ. (2020). Rhizosphere-enhanced biosurfactant action on slowly desorbing PAHs in contaminated soil. *Sci. Tot. Environ.* 720: 137608.

Posada-Baquero R, Grifoll M, Ortega-Calvo JJ. (2019). Rhamnolipid-enhanced solubilization and biodegradation of PAHs in soils after conventional bioremediation. *Sci Total Environ.* 668: 790-796.

Tian Z, Vila J, Yu M, Bodnar W, Aitken MD. (2018). Tracing the biotransformation of PAHs in contaminated soil using stable isotope-assisted metabolomics. *Environ. Sci. Technol. Let.* 5: 103-109.

Tian Z, Gold A, Nakamura J, Zhang Z, Vila J, Singleton DR, Collins LB, Aitken MD. (2017). Nontarget analysis reveals a bacterial metabolite of pyrene implicated in the genotoxicity of contaminated soil after bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7091-7100.

Tauler M, Vila J, Nieto JM, Grifoll M. (2016). Key high molecular weight PAH-degrading bacteria in a soil consortium enriched using a sand-in-liquid microcosm system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(7):3321-3336.

Vila J, Tauler M, Grifoll M. (2015). Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Curr. Op. Biotechnol.* 33:95-102.

Vila J, Tian Z, Wang H, Bodnar W, Aitken MD. (2020). Isomer-selective biodegradation of high-molecular-weight azarenes in PAH-contaminated environmental samples. *Sci. Tot. Environ.* 707: 135503.

.....