

DOCTORAL THESIS



MOLECULAR TOOLS TO CHARACTERISE PLANT-ASSOCIATED
BACTERIAL COMMUNITIES IN SOILS NATURALLY ENRICHED
OR CONTAMINATED WITH TRACE METALS.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MARÍA TOUCEDA GONZÁLEZ
2017

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓNS AGROBIOLÓXICAS DE GALICIA
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



DEPARTAMENTO DE EDAFOLOXÍA E QUÍMICA AGRÍCOLA
Universidade de Santiago de Compostela



**Molecular tools to characterise
plant-associated bacterial communities in soils
naturally enriched or contaminated with trace metals.**

María Touceda González
Tese de Doutoramento , Xuño 2017



Dra. Ángeles Prieto Fernández e Dra. Petra S. Kidd, Científicos Titulares do Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscritas ao Instituto de Investigacións Agrobiolóxicas de Galicia

INFORMAN:

Que a presente memoria titulada “**Molecular tools to characterise plant-associated bacterial communities in soils naturally enriched or contaminated with trace metals**” presentada por **Dna. María Touceda González** para optar ao Grao de Doutora en Bioloxía, foi realizada baixo a nosa dirección.

E considerando que representa traballo de Tese de Doutoramento, autorizamos a súa presentación ante o Tribunal correspondente.

E para que así conste, asinamos o presente en Santiago de Compostela a 20 de Xuño de 2017.

Asdo.:

Dra. Ángeles Prieto Fernández

Asdo.:

Dra. Petra S. Kidd



Dra. M^a del Carmen Monterroso Martínez, Profesora titular do Departamento de Edafoloxía e Química Agrícola da Universidade de Santiago de Compostela

INFORMA:

Que a presente memoria titulada “**Molecular tools to characterise plant-associated bacterial communities in soils naturally enriched or contaminated with trace metals**” presentada por **Dna. María Touceda González** para optar ao Grao de Doutora en Bioloxía, foi realizada baixo a miña tutela.

E considerando que representa traballo de Tese de Doutoramento, autorizo a súa presentación ante o Tribunal correspondente.

E para que así conste, asino o presente en Santiago de Compostela a 20 de Xuño de 2017.

Asdo.: Dra. M^a del Carmen Monterroso Martínez





*A vós,
miña nai e meu pai.
Os que todo mo destes*





*A ti Cristina,
compañeira e amigha*



INDEX

Resumen	I
Introducción	III
Objetivos y tareas desarrolladas	X
Resultados principales y conclusiones	XII
Referencias	XVI
1. Introducción	1
1.1 Elementos traza	3
1.2 Sustratos naturalmente ricos en elementos traza. Ambientes ultramáficos	4
1.2.1 Plantas hiperacumuladoras	7
1.2.2 Comunidades microbianas en suelos ultramáficos	9
1.3 Suelos con elevado contenido en elementos traza de origen antropogénico	12
1.3.1 Comunidades microbianas en suelos contaminados con elementos traza	15
1.4 Genes implicados en la resistencia a Ni	20
1.5 Microorganismos y la rizosfera	30
1.5.1 Comunidades microbianas rizosféricas de plantas hiperacumuladoras y (pseudo)metalófitas	38
1.6 Técnicas de remediación de suelos contaminados de bajo impacto	47
1.7 Metodología de estudio de la microbiota edáfica	53
1.7.1 Métodos dependientes de cultivo	54
1.7.2 Métodos independientes de cultivo	55
1.7.2.1 Técnicas de análisis de “huellas moleculares”	59
1.7.2.2 Técnicas de hibridación	62
1.7.2.3 Técnicas basadas en la secuenciación de alto rendimiento	63
1.7.2.4 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	65
1.8 Referencias	66
2. Objectives	91
3. Bacterial communities in the rhizosphere of different populations of the Ni-hyperaccumulator <i>Alyssum serpyllifolium</i> and the metal-excluder <i>Dactylis glomerata</i> growing in ultramafic soils	99
4. Soil and rhizosphere bacterial communities associated with Ni-hyperaccumulating populations of <i>Alyssum serpyllifolium</i> in the Iberian Peninsula	101
5. Bacterial communities colonising the rhizosphere of the Ni-hyperaccumulator <i>Alyssum serpyllifolium</i> and the Ni-excluder <i>Dactylis glomerata</i>	103

6. Microbial community structure and activity in trace element-contaminated soils (Phyto)managed by Gentel Remediation Options (GRO)	105
6.1 Introduction	109
6.2 Material and methods	109
6.2.1 Sites and soil sampling procedure	109
6.2.2 Soil respiration, microbial biomass and enzyme activity	109
6.2.3 Microbial community structure	112
6.2.4 Quantitative PCR analysis of genes nirK, nirS, nosZ and amoA genes	116
6.2.5 Data analysis	118
6.3 Results	119
6.3.1 Soil ATP content, respiration and enzyme activities	119
6.3.2 Bacterial diversity and community structure	121
6.3.2.1 Biogeco field site: (aided) phytoextraction and (aided) phytostabilisation	121
6.3.2.2 Soil under phytoextraction (willow SRC)	124
6.3.2.3 Soils under in situ stabilization and phytoexclusion	129
6.3.3 Abundance of nirK, nirS, nosZ AOB and AOA genes	130
6.3.4 CCA ordination analysis	133
6.4 Discussion	138
6.5 References	145
7. Final synthesis and conclusions	149
Agradecimentos	155



RESUMEN





Introducción

Los elementos traza se caracterizan por estar presentes a bajas concentraciones en la litosfera ($<1000 \text{ mg kg}^{-1}$) y en los organismos vivos ($<100 \text{ mg kg}^{-1}$) (Adriano, 2001), y entre ellos se encuentra el grupo de los metales pesados, que tienen una densidad mayor de 5 g cm^{-3} (Bothe, 2011). Muchos de los elementos traza son micronutrientes esenciales para plantas y animales (tales como Cu, Fe, Mn, Ni y Zn). En cambio, otros metales son considerados no esenciales y carecen de cualquier función biológica conocida (por ejemplo, metal(oid)es tales como As, Cd, Hg y Pb) (Nies, 1999). Estos elementos, sean esenciales o no, a altas concentraciones pueden tener fuertes efectos tóxicos y suponer amenazas ambientales (McGrath & Zhao, 2015). En Europa, los elementos traza son uno de los contaminantes del suelo más frecuentes (European Commission, 2014) y están considerados como uno de los contaminantes más peligrosos debido a su larga persistencia en el ambiente, ya que estos no pueden ser biodegradados, pudiendo incorporarse a los ciclos biológicos (Adriano, 2001, Lombi *et al.*, 2001).

Los elementos traza pueden estar presentes en suelos a concentraciones tóxicas en suelos cuyo material original de partida contiene de forma natural altas concentraciones de metal o en suelos contaminados por la actividad industrial, minera o agrícola. Un ejemplo de los suelos naturalmente ricos en metales traza son los suelos que derivan de rocas ultramáficas. El término ultramáfico se refiere a las rocas ígneas o metamórficas que contienen altas cantidades de minerales ferromagnesianos ($> 70\%$) y concentraciones bajas de sílice ($\text{SiO}_2 < 45\%$) presentes en estos suelos y el término serpentinitico deriva de las rocas ricas en serpentinas cuyo color verde y apariencia con franjas de distintas tonalidades recuerda a la piel de las serpientes (Brooks, 1987, Mengoni *et al.*, 2010). Entre las características más destacables de estos suelos se pueden mencionar las elevadas concentraciones de Mg, Fe y metales traza potencialmente fitotóxicos, como Co, Cr y Ni, las bajas concentraciones de nutrientes esenciales como N, P y K, la baja relación Ca/Mg, el bajo contenido en materia orgánica y una baja capacidad de retención hídrica (Whittaker, 1954, Brooks, 1987). Las comunidades de plantas que se desarrollan en estas zonas presentan a menudo un elevado número de especies endémicas que han desarrollado adaptaciones morfológicas y fisiológicas que las diferencian de la flora de sustratos geológicos adyacentes (Whittaker,

1954, Brooks, 1987). Concretamente, algunas plantas han desarrollado mecanismos específicos para resistir altas concentraciones de metales (Baker, 1981) y entre ellas destacan las plantas hiperacumuladoras, que son capaces de acumular en la parte aérea concentraciones excepcionalmente elevadas de metales traza (Brooks, 1987, Chaney *et al.*, 2007). Estas plantas tienen un gran uso potencial en técnicas basadas en el uso de plantas para extraer metales del suelo. Hasta el momento, se conocen aproximadamente 500 especies de hiperacumuladoras y más del 90% de las especies hiperacumuladoras conocidas (>450 especies) acumulan Ni (Pollard *et al.*, 2014). Los géneros con mayor número de hiperacumuladoras de Ni son *Alyssum* y *Noccaea* (anteriormente *Thlaspi*) ambas pertenecen a la familia de angiospermas *Brassicaceae* (Baker & Brooks, 1989).

El estudio de las comunidades microbianas en suelos serpentínicos ha recibido poca atención hasta el momento, aunque su análisis es particularmente interesante ya que permite conocer como estas comunidades se adaptan de modo natural a concentraciones tóxicas de metales traza y como es la evolución de las comunidades microbianas en suelos naturalmente enriquecidos en metales traza, siendo esta una situación completamente diferente de la de suelos contaminados por el hombre (Héry *et al.*, 2003). En varios estudios, basados en el uso de métodos tradicionales dependientes de cultivo, se ha observado que estos suelos se caracterizan por una baja biomasa y actividad microbianas. Este hecho se ha atribuido principalmente a las altas concentraciones de metales traza (Lipman, 1926, Acea & Carballas, 1986, DeGrood *et al.*, 2005, Pal *et al.*, 2005). Recientemente, algunos autores han detectado una alta diversidad microbiana en suelos serpentínicos, utilizando técnicas más novedosas basadas en el análisis molecular (Mengoni *et al.*, 2004, Oline, 2006, Bordez *et al.*, 2016). En estos suelos se ha hallado una gran abundancia de miembros del Filo *Actinobacteria*, lo que se ha relacionado con la alta adaptabilidad de estas bacterias Gram-positivas para sobrevivir en ambientes con concentraciones tóxicas de metales traza (Amir & Pineau, 1998, Mengoni *et al.*, 2001, Héry *et al.*, 2003, Mengoni *et al.*, 2004, DeGrood *et al.*, 2005). También se ha descubierto que muchas de las cepas bacterianas aisladas de suelos serpentínicos, y especialmente aquellas asociadas a plantas hiperacumuladoras, poseen una gran resistencia a metales tales como Co,

Cr o Ni (Mengoni *et al.*, 2001, Abou-Shanab *et al.*, 2003, Héry *et al.*, 2003, Idris *et al.*, 2004, Pal *et al.*, 2005, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Becerra-Castro *et al.*, 2011, Álvarez- López, 2016). En suelos contaminados con metales traza derivados de la actividad humana se ha hallado que la exposición a altas concentraciones de metales afecta generalmente al crecimiento, morfología, actividad bioquímica, diversidad de los microorganismos y estructura de la comunidad (Giller *et al.*, 1998, Kozdrój & van Elsas, 2000, Perez-de-Mora *et al.*, 2006, Renella *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2007, Dell'Amico *et al.*, 2008, Subrahmanyam *et al.*, 2014). Los microorganismos son los primeros en ser sometidos al impacto directo e indirecto de la contaminación por metales en el suelo (Lenart-Boroń & Boroń, 2014). La respuesta de las poblaciones bacterianas a la contaminación por metales traza dependerá de múltiples factores, como por ejemplo el tipo de metal y el tipo de microorganismo, la concentración y biodisponibilidad de los metales, etc. (Hassen *et al.*, 1998), aunque los cambios en la comunidad no sólo dependerán de la presencia y la concentración de metal, sino de otros factores como puede ser el pH, la materia orgánica, la humedad y el tipo de suelos (Boivin *et al.*, 2006, Stemmer *et al.*, 2007, Kenarova *et al.*, 2014). Diversos estudios observaron que los suelos contaminados están dominados generalmente por miembros de los Fila *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*, aunque estos Fila se encuentran comúnmente también en suelos no contaminados (Vivas *et al.*, 2008, Sheik *et al.*, 2012, Gołębiewski *et al.*, 2014, Subrahmanyam *et al.*, 2016). Un efecto típico de la contaminación con metales traza sobre la comunidad bacteriana es el aumento de la frecuencia de bacterias tolerantes a metal, ya que la presencia de este metal induce un incremento de la tolerancia de la comunidad bacteriana, por la desaparición de especies sensibles y posterior adaptación de bacterias tolerantes (Bååth, 1989, Doelman *et al.*, 1994, Huysman *et al.*, 1994, Díaz-Raviña & Bååth, 1996, Pennanen *et al.*, 1996, Müller *et al.*, 2001, Mertens *et al.*, 2006, Perez-de-Mora *et al.*, 2006, Chien *et al.*, 2008, Dell'Amico *et al.*, 2008). Las comunidades bacterianas tolerantes están a menudo representadas por bacterias Gram-positivas de los géneros *Bacillus* (*Firmicutes*), *Arthrobacter* y *Corynebacterium* (*Actinobacteria*) o Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (*Proteobacteria*) (Piotrowska-Seget *et al.*, 2005).

Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias que les permiten resistir elevadas concentraciones de metales en el medio externo (Haferburg & Kothe 2007). Se conocen seis mecanismos (Bruins *et al.*, 2000): 1) Alteración de la permeabilidad de la membrana, 2) Secuestro de metales en el citoplasma, 3) Captación extracelular de metales, 4) Detoxificación enzimática, 5) Reducción de la sensibilidad de las dianas celulares de estos metales, 6) Transporte activo de metales en el interior celular mediante sistemas de extrusión. De estos seis mecanismos, la extrusión de metales mediante sistemas de transporte activo es el mecanismo más extendido en procariontes (Bruins *et al.*, 2000). La mayoría de los mecanismos de extrusión de metales descritos hasta el momento pertenecen a bacterias Gram-negativas, pero también podemos encontrar sistemas de flujo activo en bacterias Gram-positivas (Taj & Rajkumar, 2016). En el caso del Ni se conoce entre otros los genes *ncc* que codifican para un sistema de contra-transporte protón-cation (cación-proton antiporter) que exporta Ni, Cd y Co del interior de la célula y que se relaciona con la resistencia bacteriana a estos elementos (Schmidt & Schlegel, 1994).

Esta tesis se centra en el análisis de las comunidades bacterianas de la rizosfera de plantas que crecen en suelos naturalmente enriquecidos o contaminados con elementos traza. El término “rizosfera” fue propuesto por Hiltner en 1904 para describir la porción de suelo inmediatamente en contacto con las raíces de plantas que se caracterizan por una alta actividad microbiana. Las raíces producen y excretan continuamente compuestos en la rizosfera (Berg & Smalla, 2009). Estos rizodepósitos pueden estimular o inhibir las poblaciones microbianas y sus actividades. La mayoría de estos rizodepósitos son exudados radiculares y son principalmente compuestos orgánicos solubles en agua liberados por las células radiculares en la solución del suelo rizosférico (Bais *et al.*, 2006, Badri & Vivanco, 2009, Huang *et al.*, 2014). Estos exudados proporcionan una fuente lábil de carbono (y posiblemente de nitrógeno) que hacen que la actividad y densidad microbiana sean generalmente mayores en el suelo rizosférico (Brimecombe *et al.*, 2001, Walker *et al.*, 2003, Bais *et al.*, 2006, Hartmann *et al.*, 2009), fenómeno que se conoce como “efecto rizosférico” (Sørensen, 1997, Raaijmakers *et al.*, 2009).

La abundancia y la composición química de los exudados radiculares varía

dependiendo de la especie de planta, e incluso de la variedad dentro de la misma especie. También varía en función de la fase de desarrollo de la planta y diversos factores ambientales, incluyendo el tipo de suelo, pH, temperatura y la presencia de microorganismos (Uren, 2000, Brimecombe *et al.*, 2001, Smalla *et al.*, 2001, Badri & Vivanco, 2009). A través de sus exudados radiculares las plantas son capaces de atraer a la rizosfera comunidades microbianas específicas como por ejemplo microorganismos beneficiosos como son las PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria; (Vessey, 2003)). Las PGPR pueden influir en el crecimiento de la planta y su fisiología mediante la producción de compuestos que favorecen el crecimiento vegetal o fitohormonas, fijación de N₂ atmosférico, liberación de nutrientes para las plantas, o supresión de los niveles de etileno ante situaciones de estrés. (Schwyn & Neilands, 1987, Leyval & Berthelin, 1989, Van Loon *et al.*, 1998, Richardson, 2001, Compant *et al.*, 2005, Dell'Amico *et al.*, 2005, Beattie, 2006, Crowley, 2006, Podile & Kishore, 2006, Richardson & Simpson, 2011, Sessitsch *et al.*, 2013, Duca *et al.*, 2014, Glick, 2014).

La estructura y diversidad microbianas en la rizosfera de las plantas hiperacumuladoras no se conoce en detalle, ya que menos del 10% de las especies hiperacumuladoras han sido investigadas (Alford *et al.*, 2010). La mayoría de los trabajos centrados en el estudio de las comunidades bacteriana rizosféricas asociadas a plantas hiperacumuladoras de Ni se basan en el uso de técnicas cultivables con el objetivo de aislar y caracterizar cepas bacterianas con uso potencial como bio-inóculos en técnicas de fitocorrección (Abou-Shanab *et al.*, 2003, Idris *et al.*, 2004, Abou-Shanab *et al.*, 2006, Pal *et al.*, 2007, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Becerra-Castro *et al.*, 2011, Turgay *et al.*, 2011, Álvarez-López *et al.*, 2016). Muchas de las cepas aisladas en estos estudios presentan una alta tolerancia a Ni y están generalmente identificadas filogenéticamente con miembros pertenecientes a los Fila *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*. Algunos autores, utilizando métodos no dependientes de cultivo para estudiar las comunidades bacterianas asociadas a plantas hiperacumuladoras de Ni, (Gremion *et al.*, 2003, 2004, Idris *et al.*, 2004, Mengoni *et al.*, 2004) aun así, no se conocen con detalle las comunidades bacterianas de la rizosfera de estas plantas. Según han propuesto distintos autores la microbiota rizosférica puede tener un papel muy importante en el proceso de hiperacumulación. En los últimos años ha aumentado

el interés por estudiar los microorganismos de la rizosfera de plantas hiperacumuladoras, principalmente porque esta información puede ser de gran utilidad para optimizar distintas fitotecnologías que emplean este tipo de plantas (ej. fitominería) (Lebeau *et al.*, 2008, Kidd *et al.*, 2009, Glick, 2010, Becerra-Castro *et al.*, 2013, Sessitsch *et al.*, 2013, Glick, 2014, Muehe *et al.*, 2015).

El estudio de comunidades microbianas asociadas a otras plantas metalófitas o pseudometalófitas creciendo en ambientes ultramáficos ha recibido incluso menos atención. Algunos autores realizaron estudios comparativos centrados en el estudio de las comunidades bacterianas cultivables asociadas con plantas hiperacumuladoras de Ni, con plantas exclusoras de Ni, o con otras plantas metalófitas o pseudometalófitas no acumuladoras y no exclusoras (Delorme *et al.*, 2001, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Álvarez-López *et al.*, 2016).

Las especies y poblaciones vegetales desarrolladas en suelos con alto contenido en metales se consideran candidatas ideales para el desarrollo de técnicas de fitocorrección. La fitocorrección se define como el uso de plantas y de sus microorganismos asociados para tratar suelos, sedimentos o aguas contaminadas con compuestos orgánicos o inorgánicos. Estas técnicas se benefician de la capacidad natural de las plantas para transformar, extraer, volatilizar o estabilizar los contaminantes, y se consideran muy adecuadas para conseguir la mejora de las funciones y estructura del suelo (Cunningham & Ow, 1996, Salt *et al.*, 1998, Wenzel *et al.*, 1999, McGrath & Zhao, 2003, Pilon-Smits, 2005), además están consideradas como opciones económicamente rentables y menos invasivas que las técnicas convencionales basadas en métodos de ingeniería (Mench *et al.*, 2009, Vangronsveld *et al.*, 2009, Mench *et al.*, 2010, Greenland, 2014). Otra ventaja es que son técnicas de aplicación *in situ*, están diseñadas para extraer o estabilizar los contaminantes en el suelo en el lugar de origen, sin necesidad de excavación o remoción de suelo, generan pocos residuos, tienen un bajo coste, son fáciles de establecer, gozan de una gran aceptación social y pueden aplicarse conjuntamente con otras técnicas de recuperación (Pilon-Smits, 2005, Wuana & Okieimen, 2011). Las técnicas de fitocorrección pueden subdividirse en dos grupos: de contención o de extracción. Los procesos de contención comprenden la fitoestabilización o fitoinmovilización cuyo objetivo primordial es reducir la biodisponibilidad, la movilidad y/o la toxicidad del contaminante en el

ambiente. Por otra parte, los procesos de extracción comprenden la fitoextracción (uso de plantas que extraen los contaminantes del suelo, concentrándolos en su parte aérea), la fitovolatilización (uso de plantas para volatilizar contaminantes) y la fitodegradación (uso de plantas y de los microorganismos asociados a las mismas para degradar contaminantes orgánicos) (Lombi *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el uso de estas fitotecnologías puede incrementar la diversidad microbiana del suelo y restaurar su funcionalidad (Mench *et al.*, 2006, Kumpiene *et al.*, 2009), debido a la reducción de la disponibilidad y toxicidad del metal y a la mejora de las propiedades químicas del suelo.

El estudio de la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas presentes en distintos suelos, así como de las variaciones inducidas por diferentes factores (vegetación, clima, manejo, etc.) se aborda utilizando métodos que generalmente se subdividen en métodos dependientes de cultivo y métodos independientes de cultivo. El mayor problema de los métodos dependientes de cultivo es que tan solo se han podido cultivar entre un 0,001 y un 1% de los microorganismos vivos presentes en el medio ambiente (Torsvik *et al.*, 2003) por lo que permiten tener acceso a tan solo una pequeña parte de la diversidad real existente (Amann *et al.*, 1995).

Los métodos independientes de cultivo no requieren ninguna etapa de cultivo y se basan en el estudio de las características bioquímicas y moleculares de los organismos, para caracterizar taxonómica y funcionalmente las comunidades microbianas. Este tipo de técnicas permiten obtener mucha más información de la diversidad microbiana existente en una muestra ambiental que las técnicas dependientes de cultivo (Amann *et al.*, 1995). En este tipo de métodos se utilizan normalmente componentes celulares como por ejemplo ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Su *et al.*, 2012, Willers *et al.*, 2015). En muchos de los trabajos centrados en el estudio de las comunidades microbianas de suelos se han utilizado mayoritariamente los ácidos nucleicos, concretamente el ADN aunque el ARN también ha sido utilizado comúnmente para obtener información de la comunidad microbiana activa (Rastogi & Sani, 2011, van Elsas & Boersma, 2011, Puglisi *et al.*, 2012, Su *et al.*, 2012, Lagos *et al.*, 2015, Visioli *et al.*, 2015).

En esta tesis se utilizaron técnicas dependientes e independientes de cultivo. Con respecto a las técnicas independientes se han utilizado DGGE, secuenciación

de alto rendimiento y qPCR. La DGGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con una concentración creciente de agente desnaturalizante) de fragmentos amplificados por PCR del gen que codifica el ARN ribosómico 16S (ADNr 16S) permite, en poco tiempo, comparar y tener una perspectiva general de la estructura y diversidad de la comunidad microbianas (van Elsas & Boersma, 2011) así como, analizar un número elevado de muestras en paralelo. Sin embargo, esta técnica solo detecta las bacterias dominantes en la comunidad (Lagos *et al.*, 2015). En los últimos años, las técnicas de secuenciación de alto rendimiento o NGS (del inglés Next-generation sequencing) posibilitan el análisis a gran escala de las comunidades microbianas, ya que permiten secuenciar ADN y ARN mucho más rápido. La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real permite cuantificar con fiabilidad el número de copias de un fragmento de ADN de interés presentes en una muestra.

Objetivos y tareas desarrolladas

El objetivo global de este proyecto fue, por una parte, caracterizar comunidades bacterianas de la rizosfera de distintas plantas que crecen en suelos naturalmente ricos en metales traza y, por otra parte, evaluar el efecto de las técnicas de fitocorrección, a medio y largo plazo, en las comunidades bacterianas de suelos contaminados con metales traza. Se emplearon técnicas moleculares que permiten una visión más amplia que con técnicas tradicionales basadas en el cultivo. Con el fin de alcanzar este objetivo se realizaron una serie de estudios en dos escenarios de contaminación diferentes.

Escenario 1: Suelos naturalmente ricos en metales traza. Suelos serpentínicos.

Las plantas hiperacumuladoras tienen la capacidad de acumular grandes concentraciones de metal en la parte aérea y presentan un interés especial en técnicas de fitoextracción (Brooks, 1987, Chaney *et al.*, 2007). En la Península Ibérica hay dos subespecies de *Alyssum serpyllifolium* Desf. que son hiperacumuladoras de Ni y endémicas en suelos serpentínicos. En este estudio se trabajó con tres poblaciones de *Alyssum serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*

(Barazón (Galicia- España), Morais y Samil (Trás-Os_Montes, Portugal)) y una población de *Alyssum serpyllifolium* subsp. *malacitanum* (Sierra Bermeja (Andalucía, España))

Inicialmente, se procedió al estudio de las comunidades bacterianas rizosféricas de dos subespecies de *A. serpyllifolium* presentes en la Península Ibérica (**Capítulo 3**). A efectos comparativos también se analizaron muestras de suelo no vegetado, así como muestras de suelo rizosférico de una especie exclusora de metales (*Dactylis glomerata*) recogidas en los mismos suelos serpentínicos. Este trabajo se realizó empleando la técnica de DGGE de fragmentos amplificados del gen que codifica el ARN ribosómico 16S (ADNr 16S).

A continuación (**Capítulo 4**), se caracterizó con mayor detalle la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en suelos no vegetados y en la rizosfera de las dos subespecies hiperacumuladoras de *A. serpyllifolium* de áreas ultramáficas del norte (Barazón) y sur de España, (Sierra Bermeja). Por otro lado, se cuantificó, en suelos no vegetados y en la rizosfera de *Alyssum*, la abundancia de un gen (*nccA*) relacionado con la tolerancia bacteriana a elementos traza como Ni, Co y Cd. Las técnicas utilizadas en este estudio fueron, secuenciación de alto rendimiento (pirosecuenciación) y DGGE de fragmentos de ADNr 16S así como qPCR para la cuantificación de *nccA*.

En el siguiente estudio (**Capítulo 5**) se llevó a cabo un experimento en macetas con el fin de comparar las comunidades bacterianas que colonizan la rizosfera de las dos subespecies de *A. serpyllifolium* hiperacumuladoras de Ni de la Península Ibérica y la exclusora *Dactylis glomerata*. Este experimento se planteó para analizar con mayor detalle las comunidades bacterianas de la rizosfera de dos especies vegetales que presentan estrategias opuestas para hacer frente a concentraciones tóxicas de metal en el suelo. Las semillas de *Alyssum* fueron recogidas en Barazón, Morais y Samil, en el caso de la subsp. *lusitanicum*, y en Sierra Bermeja, en el caso de la subsp. *malacitanum* y las semillas de *Dactylis* fueron recolectadas en Barazón. Las semillas germinadas se transplantaron a macetas que contenían un sustrato estéril enriquecido con roca ultramáfica. Estas macetas se dispusieron sobre una capa de suelo ultramáfico fresco proveniente de Barazón de modo que los microorganismos del suelo fresco pudieran colonizar los

sustratos rizosféricos. Las comunidades bacterianas rizosféricas y así como de sustrato no plantados establecido de la misma forma como control se analizaron mediante DGGE de fragmentos de ADNr 16S y también se determinaron las densidades de bacterias heterótrofas y de bacterias tolerantes a Ni utilizando técnicas dependientes de cultivo.

Escenario 2: Suelos contaminados por la actividad antrópica

Las técnicas de fitoestabilización y fitoextracción son las técnicas más comúnmente aplicadas en áreas contaminadas con metales traza y ambas pretenden disminuir la concentración de metal lábil en el suelo (Kidd *et al.*, 2015). El objetivo del último estudio (**Capítulo 6**) fue analizar el efecto de diversas técnicas de fitocorrección en la estructura, la diversidad y la actividad de las comunidades microbianas edáficas y estudiar el potencial de estos parámetros biológicos para monitorizar el éxito de las técnicas de fitocorrección a medio y largo plazo en suelos contaminados. Con este fin, se recogieron muestras en seis suelos contaminados con metales traza a lo largo de todo Europa donde se aplicaron técnicas de fitocorrección durante al menos 5 años. Las técnicas de corrección utilizadas en estos suelos fueron fitoextracción, fitoestabilización asistida y estabilización/fitoexclusión *in situ*. Por una parte, se evaluó la actividad de ciertas enzimas claves en los ciclos del C, P, N y S, además se utilizó qPCR para evaluar el número de copias de distintos genes implicados en procesos esenciales del ciclo del N. Por otra parte, se estudió la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas utilizando DGGE de fragmentos de ADNr 16S.

Resultados principales y conclusiones

Los resultados y conclusiones más relevantes del estudio realizado pueden resumirse de la siguiente manera:

En lo que respecta a los suelos enriquecidos naturalmente con elementos traza, se observó que la comunidad microbiana de los suelos ultramáficos estudiados estuvo dominada por los miembros de los Fila *Alfaproteobacteria* y *Actinobacteria* (que presentaron una abundancia relativa similar). Las secuencias afiliadas a estos Fila supusieron 2/3 del total de secuencias obtenidas por

pirosecuenciación. En los suelos ultramáficos, la abundancia relativa de los Fila *Actinobacteria* y *Gemmatimonadetes* fue más alta que la encontrada generalmente en otros suelos no enriquecidos en elementos traza con características similares.

Al comprar los datos de las áreas ultramáficas de Galicia y Andalucía se vio que la abundancia relativa de *Acidobacteria* (grupos 3, 4 y 7) y de *Actinobacteria* fue menor en Sierra Bermeja que en Barazón, y se observó lo contrario para *Proteobacteria* (en concreto para las clases *Alfa-* y *Betaproteobacteria*), *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. A un nivel taxonómico inferior, se observó un notable enriquecimiento en *Oxalobacteraceae* en Sierra Bermeja. Las diferencias en la composición de la comunidad bacteriana entre las dos áreas ultramáficas fueron más pronunciadas en el suelo no vegetado que en el rizosfera.

Por otra parte, se comprobó que las comunidades bacterianas en los suelos ultramáficos no vegetados defirieron de las comunidades en la rizosfera de la hiperacumuladora y de la exclusora de Ni aun creciendo en los mismos suelos. Esto mismo se observó al analizar la comunidad bacteriana total y, en general, fue aún más pronunciado en los perfiles DGGE de *Alfaproteobacteria* y/o *Actinobacteria*. En las cuatro áreas ultramáficas estudiadas, la rizosfera de la hiperacumuladora de Ni, *Alyssum*, y de la exclusora, *Dactylis*, también albergaron comunidades bacterianas diferentes. Los valores de disimilitud alcanzaron un máximo en el caso de las comunidades de *Alfaproteobacteria*. En cuanto a las comunidades bacterianas en la rizosfera de las cuatro poblaciones estudiadas de la hiperacumuladora de Ni, *Alyssum*, se encontraron diferencias significativas, aunque, las diferencias entre las dos poblaciones portuguesas no fueron marcadas.

Los análisis de correspondencias canónicas indicaron que, en el suelo no vegetado, la estructura de las comunidades de *Alfaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Streptomycetaceae* se vio influenciada significativamente por algunas características intrínsecas del suelo (como el C orgánico, Ni total en suelo y el Mg intercambiable), mientras que, en la rizosfera estos factores fueron sustituidos por otros parámetros relacionados con la disponibilidad de nutrientes (CIC en la rizosfera de *Alyssum* y en la rizosfera de *Dactylis* el K disponible) y, en el caso de la planta exclusora, también la disponibilidad de elementos traza. Estos resultados sugieren una relación entre las comunidades bacterianas rizosféricas y la disponibilidad de nutrientes y elementos traza.

Las comunidades de *Alfaproteobacteria* en la rizosfera de las distintas poblaciones de *Dactylis glomerata* mostraron una alta similitud y constituyeron un grupo definido en el dendrograma de los perfiles DGGE de fragmentos de ADNr 16S. En los perfiles de otros grupos bacterianos o en el caso de las comunidades rizosféricas de *Alyssum* no se apreció este agrupamiento lo que sugiere que la planta excluyente de Ni selecciona, en las diferentes áreas ultramáficas, una comunidad de *Alfaproteobacteria* similar. Parece interesante investigar más en profundidad el papel de los miembros de este grupo bacteriano en los mecanismos de tolerancia y/o exclusión de plantas de la familia *Poaceae*.

En cuanto a los análisis sobre la comunidad bacteriana de la rizosfera de *Alyssum* se puede destacar que, en comparación con el suelo no vegetado, la rizosfera de las hiperacumuladoras de Ni de Barazón y de Sierra Bermeja mostró un enriquecimiento relativo en miembros de los Fila *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* de la clase *Actinobacteridae*, y *Alfaproteobacteria*. En cambio, *Acidobacteria* del grupo 1, Bacilli (especialmente los géneros *Cohnella* y *Paenibacillus*), *Anaeromyxobacter* y *Latescibacteria* (previamente WS3) mostraron una mayor abundancia relativa en el suelo no vegetado que en la rizosfera. La secuenciación de las bandas cortadas en los perfiles DGGE de los fragmentos del gen 16S rARN, así como la pirosecuenciación de fragmentos del gen 16S rARN amplificados a partir del ADN total de la comunidad, indicarán que algunos miembros relevantes y característicos de la comunidad bacteriana rizosfera de la hiperacumuladora de Ni *Alyssum serpyllifolium* son:

a) *Actinobacteria* de la familia *Geodermatophilaceae* (generos *Blastococcus*, *Geodermatophilus* y *Modestobacter*) conocidos por sus austeros requerimientos nutricionales y su capacidad para colonizar sustratos pobres.

b) *Actinobacteria* del genero *Pseudonocardia*.

c) *Alfaproteobacteria* de la familia *Hyphomicrobiaceae* como los miembros de los generos *Devosia* y *Hyphomicrobium*, caracterizados por la presencia de prosthecae (apéndices que les confieren la capacidad de sobrevivir en hábitats pobres en nutrientes) y/o por poseer en su genoma genes relacionados con la fijación de N₂.

d) *Alfaproteobacteria* del genero *Methylobacterium*, las cuales han sido previamente encontradas en asociación con *Alyssum* y otras plantas, y que

incluyen numerosas bacterias con capacidad de promover el crecimiento vegetal.

e) Miembros de la familia *Rhodobacteraceae* que, según varios autores, incluyen bacterias con capacidad para fijar N_2 y cepas relacionadas con el ciclo del Mn.

f) Organismos relacionados filogenéticamente con *Gemmatimonas*.

Esta información indica que sería de gran interés aislar y caracterizar organismos de estos taxones, así como investigar su capacidad para mejorar la nutrición *Alyssum* y/o la movilización de Ni.

Otro aspecto que se puede destacar es que la rizosfera de las subespecies de *Alyssum serpyllifolium* hiperacumuladoras de Ni cultivadas en el substrato artificial enriquecido con roca ultramáfica albergó una densidad más alta de bacterias tolerantes a Ni que la rizosfera de la exclusora o que el substrato no plantado. Además, en suelos ultramáficos de Barazón y Sierra Bermeja el número de copias del gen *nccA*, implicado en un mecanismo bacteriano (bomba de extrusión) para expulsar el Ni de la célula, fue mayor en la rizosfera de *Alyssum* que en suelo no vegetado.

En lo que se refiere al estudio relativo a suelos contaminados por actividad antrópica en los que se implementaron diferentes técnicas de fitomanejo, se observó que los procesos de fitorremedio indujeron incrementos en la biomasa y actividad microbianas así como claras modificaciones en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas (tanto a nivel de la comunidad total como en distintos grupos bacterianos analizados). Los cambios se observaron principalmente en los tratamientos de fitomanejo en los que se incorporaron enmiendas orgánicas e inorgánicas. También se vio que la comunidad de Actinobacteria se mostró especialmente sensible a los tratamientos de fitomanejo de suelos contaminados con TE en los que incluyeron enmiendas del suelo, tanto inorgánicas como orgánicas, mientras que, las comunidades de *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* resultaron especialmente útiles para el seguimiento de cambios en los lugares en los que se emplearon enmiendas orgánicas e inorgánicas, respectivamente. Por otra parte, se puede señalar que, en general, el número de copias de genes implicados en la desnitrificación y nitrificación (*nirK*, *nirS*, *nosZ* and *amoA*) se vieron afectados por las técnicas de

fitomanejo implementadas. Los cambios más pronunciados se apreciaron en los lugares en los que se incorporaron enmiendas orgánicas. El estudio realizado permitió apreciar que los parámetros microbiológicos fueron muy sensibles a los cambios inducidos por el fitorremedio a medio y largo plazo.

Referencias

- Abou-Shanab RA, Angle JS, Delorme TA, Chaney RL, van Berkum P, Moawad H, Ghanem K & Ghazlan HA (2003) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytol* **158**: 219–224.
- Abou-Shanab RAI, Angle JS & Chaney RL (2006) Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biol Biochem* **38**: 2882-2889.
- Acea MJ & Carballas T (1986) Relationships among microbial groups in various humid zone soils, and the factors controlling their distribution. *Agrochimica* **34**: 1-14.
- Adriano DC (2001) *Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer-Verlag, New York, Berlin etc.
- Alford É, Pilon-Smits EH & Paschke M (2010) Metallophytes—a view from the rhizosphere. *Plant Soil* **337**: 33-50.
- Álvarez- López V (2016) Plant-microbe-soil interactions and their role in phytotechnologies applied to trace metal-rich soils. Doctoral dissertation Thesis, Universidade de Santiago de Compostela and CSIC (Spain).
- Álvarez-López V, Prieto-Fernández Á, Becerra-Castro C, Monterroso C & Kidd PS (2016) Rhizobacterial communities associated with the flora of three serpentine outcrops of the Iberian Peninsula. *Plant Soil* 1-20.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- Amir H & Pineau R (1998) Influence of plants and cropping on microbiological characteristics of some New Caledonian ultramafic soils. *Soil Research* **36**: 457-472.
- Bååth E (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Poll* **47**: 335-379.
- Badri DV & Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell Environ* **32**: 666-681.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 233-266.
- Baker AJM (1981) Accumulators and excluders - Strategies in the response of plants to heavy-metals. *J Plant Nutr* **3**: 643-654.
- Baker AJM & Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126.
- Beattie GA (2006) Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. *Plant-Associated Bacteria*, (Gnanamanickam SS, ed.) 1-56. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Becerra-Castro C, Monterroso C, Garcia-Leston M, Prieto-Fernandez A, Acea MJ & Kidd PS (2009) Rhizosphere microbial densities and trace metal tolerance of the nickel

- hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*. *Int J Phytoremediation* **11**: 525-541.
- Becerra-Castro C, Prieto-Fernández A, Álvarez-Lopez V, Monterroso C, Cabello-Conejo MI, Acea MJ & Kidd PS (2011) Nickel solubilizing capacity and characterization of rhizobacteria isolated from hyperaccumulating and non-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium*. *Int J Phytoremediation* **13**: 229-244.
- Becerra-Castro C, Kidd P, Kuffner M, Prieto-Fernández A, Hann S, Monterroso C, Sessitsch A, Wenzel W & Puschenreiter M (2013) Bacterially induced weathering of ultramafic rock and its implications for phytoextraction. *Appl Environ Microbiol* **79**: 5094-5103.
- Berg G & Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 1-13.
- Boivin MEY, Greve GD, Kools SAE, van der Wurff AWG, Leeftang P, Smit E, Breure AM, Rutgers M & van Straalen NM (2006) Discriminating between effects of metals and natural variables in terrestrial bacterial communities. *Appl Soil Ecol* **34**: 103-113.
- Bordez L, Jourand P, Ducouso M, Carriconde F, Cavaloc Y, Santini S, Claverie JM, Wantiez L, Leveau A & Amir H (2016) Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol Ecol* **25**: 2258-2272.
- Bothe H (2011) Plants in heavy metal soils. *Detoxification of Heavy Metals*, (Sherameti I & Varma A, eds.), 35-57. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Brimecombe M, De Leij F & Lynch J (2001) The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. *The rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the soil-plant Interface*, (Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P, eds.), 95-140. Marcel Dekker, New York.
- Brooks RR (1987) *Serpentine and its vegetation: A multidisciplinary approach*. Dioscorides, Portland, OR.
- Bruins MR, Kapil S & Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **45**: 198-207.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C & Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4951-4959.
- Crowley DE (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*, (Barton LL & Abadia J, eds.), 169-198. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Cunningham SD & Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol* **110**: 715-719.
- Chaney RL, Angle JS, Broadhurst CL, Peters CA, Tappero RV & Sparks DL (2007) Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J Environ Qual* **36**: 1429-1443.
- Chien C, Kuo Y, Chen C, Hung C, Yeh C & Yeh W (2008) Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* **20**: 359-363.
- DeGroot SH, Claassen VP & Scow KM (2005) Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biol Biochem* **37**: 1427-1435.
- Delorme TA, Gagliardi JV, Angle JS & Chaney RL (2001) Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. and the non metal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations. *Can J Microbiol* **47**: 773-776.

-
- Dell'Amico E, Cavalca L & Andreoni V (2005) Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **52**: 153-162.
- Dell'Amico E, Mazzocchi M, Cavalca L, Allievi L & Andreoni V (2008) Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiol Res* **163**: 671-683.
- Díaz-Raviña M & Bååth E (1996) Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2970-2977.
- Doelman P, Jansen E, Michels M & van Til M (1994) Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol Fertility Soils* **17**: 177-184.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D & Glick BR (2014) Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* **106**: 85-125.
- European Commission E (2014) Progress in the management of contaminated sites in Europe. Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Giller KE, Witter E & McGrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* **30**: 1389-1414.
- Glick BR (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv* **28**: 367-374.
- Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* **169**: 30-39.
- Gołębiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A & Wróbel B (2014) 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microb Ecol* **67**: 1-13.
- Greenland (2014) Gentle remediation of trace element contaminated land. Best practice guidance for practical application of gentle remediation options (GRO). <http://www.greenland-project.eu/downloads/Greenland%20best-practice%20guide%20final.pdf>.
- Gremion F, Chatzinotas A & Harms H (2003) Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol* **5**: 896-907.
- Gremion F, Chatzinotas A, Kaufmann K, Von Sigler W & Harms H (2004) Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 273-283.
- Hartmann A, Schmid M, Tuinen Dv & Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321**: 235-257.
- Hassen A, Saidi N, Cherif M & Boudabous A (1998) Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour Technol* **64**: 7-15.
- Héry M, Nazaret S, Jaffré T, Normand P & Navarro E (2003) Adaptation to nickel spiking of bacterial communities in neocaledonian soils. *Environ Microbiol* **5**: 3-12.
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der DLG* **98** 59-78.
- Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q & Vivanco JM (2014) Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* **92**: 267-275.

- Huysman F, Verstraete W & Brookes PC (1994) Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biol Biochem* **26**: 103-110.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW & Sessitsch A (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goessingense*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2667-2677.
- Kenarova A, Radeva G, Traykov I & Boteva S (2014) Community level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites. *Ecotoxicol Environ Saf* **100**: 226-232.
- Kidd P, Barceló J, Bernal MP, Navari-Izzo F, Poschenrieder C, Shilev S, Clemente R & Monterroso C (2009) Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ Exp Bot* **67**: 243-259.
- Kidd P, Mench M, Alvarez-López V, Bert V, Dimitriou I, Friesl-Hanl W, Herzig R, Janssen JO, Kolbas A, Müller I, Neu S, Renella G, Ruttens A, Vangronsveld J, Puschenreiter M (2015) Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *Int J Phytoremediation* **17**: 1005-1037.
- Kozdrój J & van Elsas JD (2000) Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biol Biochem* **32**: 1405-1417.
- Kumpiene J, Guerri G, Landi L, Pietramellara G, Nannipieri P & Renella G (2009) Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**: 115-119.
- Lagos L, Maruyama F, Nannipieri P, Mora ML, Ogram A & Jorquera MA (2015) Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini review. *Soil sci plant nutri* **15**: 504-523.
- Lebeau T, Braud A & Jézéquel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environ Pollut* **153**: 497-522.
- Lenart-Boroń A & Boroń P (2014) The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils — A Review. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, (Hernandez-Soriano MC, ed.) InTech.
- Leyval C & Berthelin J (1989) Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil* **117**: 103-110.
- Lipman CB (1926) The bacterial flora of serpentine soils. *J Bacteriol* **12**: 315-318.
- Lombi E, Wenzel WW, Gobran GR & Adriano DC (2001) Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: A review. *Trace Elements in the Rhizosphere*, (Gobran GR, Wenzel WW & Lombi E, eds.), 3-24. Crc Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- McGrath SP & Zhao F-J (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 277-282.
- McGrath SP & Zhao FJ (2015) Concentrations of metals and metalloids in soils that have the potential to lead to exceedance of maximum limit concentrations of contaminants in food and feed. *Soil Use and Manage* **31**: 34-45.
- Mench M, Vangronsveld J, Bleeker P, Ruttens A, Gebelen W & Lepp N (2006) Phytostabilisation of metal-contaminated sites. *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, Vol. 68 (Morel J-L, Echevarria G & Goncharova N, eds.), 109-190. Springer Netherlands.
- Mench M, Schwitzgubel JP, Schroeder P, Bert V, Gawronski S & Gupta S (2009) Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ Sci Pollut Res* **16**: 876-900.

- Mench M, Lepp N, Bert V, Schwitzguébel J-P, Gawronski SW, Schröder P & Vangronsveld J (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J Soils Sed* **10**: 1039-1070.
- Mengoni A, Schaaf H & Vangronsveld J (2010) Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant Soil* **331**: 5-16.
- Mengoni A, Barzanti R, Gonnelli C, Gabrielli R & Bazzicalupo M (2001) Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environ Microbiol* **3**: 691-698.
- Mengoni A, Grassi E, Barzanti R, Biondi EG, Gonnelli C, Kim CK & Bazzicalupo M (2004) Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb Ecol* **48**: 209-217.
- Mertens J, Springael D, De Troyer I, Cheyens K, Wattiau P & Smolders E (2006) Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environ Microbiol* **8**: 2170-2178.
- Muehe EM, Weigold P, Adaktylou IJ, Planer-Friedrich B, Kraemer U, Kappler A & Behrens S (2015) Rhizosphere microbial community composition affects Cadmium and Zinc uptake by the metal-hyperaccumulating plant *Arabidopsis halleri*. *Appl Environ Microbiol* **81**: 2173-2181.
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S & Sørensen SJ (2001) The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 11-19.
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730-750.
- Oline D (2006) Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and non serpentine soils. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6965-6971.
- Pal A, Wauters G & Paul AK (2007) Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant Soil* **293**: 37-48.
- Pal A, Dutta S, Mukherjee PK & Paul AK (2005) Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. *J Basic Microbiol* **45**: 207-218.
- Pennanen T, Frostegard A, Fritze H & Baath E (1996) Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl Environ Microbiol* **62**: 420-428.
- Perez-de-Mora A, Burgos P, Madejon E, Cabrera F, Jaekel P & Schloter M (2006) Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biol Biochem* **38**: 327-341.
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 15-39.
- Piotrowska-Seget Z, Cycoń M & Kozdrój J (2005) Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl Soil Ecol* **28**: 237-246.
- Podile AR & Kishore GK (2006) Plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria*, 195-230.
- Pollard AJ, Reeves RD & Baker AJM (2014) Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Sci* **217-218**: 8-17.
- Puglisi E, Hamon R, Vasileiadis S, Coppolecchia D & Trevisan M (2012) Adaptation of soil microorganisms to trace element contamination: A review of mechanisms, methodologies, and consequences for risk assessment and remediation. *Crit Rev Environ Sci Technol* **42**: 2435-2470.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C & Moëgne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **321**: 341-361.

- Rastogi G & Sani RK (2011) Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, (Ahmad I, Ahmad F & Pichtel J, eds.), 29-57. Springer New York, New York, NY.
- Renella G, Egamberdiyeva D, Landi L, Mench M & Nannipieri P (2006) Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. *Soil Biol Biochem* **38**: 702-708.
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Funct Plant Biol* **28**: 897-906.
- Richardson AE & Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol* **156**: 989-996.
- Salt DE, Smith RD & Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 643-668.
- Schmidt T & Schlegel HG (1994) Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* **176**: 7045-7054.
- Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47-56.
- Sessitsch A, Kuffner M, Kidd P, Vangronsveld J, Wenzel WW, Fallmann K & Puschenreiter M (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol Biochem* **60**: 182-194.
- Sheik CS, Mitchell TW, Rizvi FZ, Rehman Y, Faisal M, Hasnain S, McInerney MJ & Krumholz LR (2012) Exposure of soil microbial communities to Chromium and Arsenic alters their diversity and structure. *PLoS One* **7**: e40059.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H & Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4742-4751.
- Sørensen J (1997) The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms *Modern Soil Microbiology* (Van Elsas JD, Trevors JT & Wellington EMH, eds.), 21-45. Marcel Dekker Inc., New York.
- Stemmer M, Watzinger A, Blochberger K, Haberhauer G & Gerzabek MH (2007) Linking dynamics of soil microbial phospholipid fatty acids to carbon mineralization in a ¹³C natural abundance experiment: Impact of heavy metals and acid rain. *Soil Biol Biochem* **39**: 3177-3186.
- Su C, Lei L, Duan Y, Zhang KQ & Yang J (2012) Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 993-1003.
- Subrahmanyam G, Shen J-P, Liu Y-R, Archana G & Zhang L-M (2016) Effect of long-term industrial waste effluent pollution on soil enzyme activities and bacterial community composition. *Environ Monit Assess* **188**: 1-13.
- Subrahmanyam G, Hu H-W, Zheng Y-M, Gattupalli A, He J-Z & Liu Y-R (2014) Response of ammonia oxidizing microbes to the stresses of arsenic and copper in two acidic alfisols. *Appl Soil Ecol* **77**: 59-67.
- Taj ZZ & Rajkumar M (2016) Perspectives of Plant Growth-Promoting Actinomycetes in Heavy Metal Phytoremediation. *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*, (Subramaniam G, Arumugam S & Rajendran V, eds.), 213-231. Springer Singapore, Singapore.
- Torsvik V, Øvreås L & Thingstad TF (2003) Prokaryotic diversity—Magnitude, dynamics, and controlling factors *Science* **296** 1064 - 1066.

-
- Turgay OC, Görmez A & Bilen S (2011) Isolation and characterization of metal resistant-tolerant rhizosphere bacteria from the serpentine soils in Turkey. *Environ Monit Assess* **184**: 515-526.
- Uren NC (2000) Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. *The Rhizosphere: Biochemistry, and Organic Substances at the Soil Interface* (Pinton R, Varani Z & Nanniperi P, eds.), 19-40. Marcel Dekker Inc., New York.
- van Elsas JD & Boersma FGH (2011) A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *Eur J Soil Biol* **47**: 77-87.
- Van Loon LC, Bakker PAHM & Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Vol. 36 453-483.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res* **16**: 765-794.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**: 571-586.
- Visioli G, D'Egidio S & Sanangelantoni AM (2015) The bacterial rhizobiome of hyperaccumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Front Plant Sci* **5**.
- Vivas A, Moreno B, del Val C, Macci C, Masciandaro G & Benitez E (2008) Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *J Environ Monit* **10**: 1287-1296.
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E & Vivanco JM (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* **132**: 44-51.
- Wang Y, Shi J, Wang H, Lin Q, Chen X & Chen Y (2007) The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf* **67**: 75-81.
- Wenzel WW, Adriano DC, Salt D & Smith R (1999) Phytoremediation: A plant-microbe-based remediation system. *Bioremediation of Contaminated Soils*, (Adriano DC, Bollag JM, Frankenberger WT & Sims RC, eds.), 457-508. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Whittaker RH (1954) The ecology of serpentine soils. *Ecology* **35**: 258-288.
- Willers C, Jansen van Rensburg PJ & Claassens S (2015) Microbial signature lipid biomarker analysis - an approach that is still preferred, even amid various method modifications. *J Appl Microbiol* **118**: 1251-1263.
- Wuana RA & Okieimen FE (2011) Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* **2011**: 20.

1

INTRODUCCIÓN





1.1 Elementos traza

De los 94 elementos naturales presentes en la tabla periódica 69 son metales, de los cuales 55 son metales pesados (Figura 1.1). Los elementos conocidos como metales pesados se definen como elementos que pertenecen al grupo de los metales y metaloides y que presentan una densidad mayor de 5 g cm^{-3} (Parker, 1989).

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18																																
Período																																																		
1	1 H																	2 He																																
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne																																
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar																																
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr																																
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe																																
6	55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn																																
7	87 Fr	88 Ra	**	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Uut	114 Fl	115 Uup	116 Lv	117 Uus	118 Uuo																																
	<table border="1"> <tr> <td>*</td> <td>57 La</td> <td>58 Ce</td> <td>59 Pr</td> <td>60 Nd</td> <td>61 Pm</td> <td>62 Sm</td> <td>63 Eu</td> <td>64 Gd</td> <td>65 Tb</td> <td>66 Dy</td> <td>67 Ho</td> <td>68 Er</td> <td>69 Tm</td> <td>70 Yb</td> <td>71 Lu</td> </tr> <tr> <td>**</td> <td>89 Ac</td> <td>90 Th</td> <td>91 Pa</td> <td>92 U</td> <td>93 Np</td> <td>94 Pu</td> <td>95 Am</td> <td>96 Cm</td> <td>97 Bk</td> <td>98 Cf</td> <td>99 Es</td> <td>100 Fm</td> <td>101 Md</td> <td>102 No</td> <td>103 Lr</td> </tr> </table>																		*	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu	**	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr
*	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu																																			
**	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr																																			

Figura 1.1: Tabla periódica de los elementos. Los metales pesados están marcados en verde y los contaminantes más generalizados (metales y metaloides) están marcados en amarillo.

Los términos "metal pesado", "elemento traza" o "metal traza" se utilizan con frecuencia como sinónimo en la literatura aunque, en realidad, los elementos traza, metales o metaloides, se definen como los que están presentes en la litosfera en concentraciones por debajo de 1000 mg kg^{-1} peso seco y que se detectan comúnmente en los seres vivos a concentraciones por debajo de 100 mg kg^{-1} peso seco (Adriano, 2001). Muchos de los elementos traza son micronutrientes esenciales para plantas y animales (tales como Cu, Fe, Mn, Ni y Zn), y se pueden producir deficiencias cuando su concentración en el suelo es muy baja o cuando su biodisponibilidad es muy limitada. En cambio, otros metales son considerados no esenciales y carecen de cualquier función biológica conocida (por ejemplo, metal

(oid)es tales como As, Cd, Hg y Pb) (Nies, 1999). En todos los casos sean esenciales o no, los elementos traza a altas concentraciones pueden tener fuertes efectos tóxicos y suponer amenazas ambientales (McGrath & Zhao, 2015). Entre los metal(oid)es considerados como contaminantes frecuentes y que pueden provocar problemas ambientales se encuentran el Cd, Hg, As, Cr, Cu, Pb, Ni y Zn, siendo extremadamente tóxicos los tres primeros (Kuffner, 2007)(Figura 1.1) . Uno de los principales problemas ambientales derivados de la presencia de metales a elevadas concentraciones es que estos no pueden ser biodegradados y por lo tanto su persistencia en el ambiente es muy elevada (cientos de años) pudiendo incorporarse a los ciclos biológicos (Lombi *et al.*, 2001).

1.2 Sustratos naturalmente ricos en elementos traza. Ambientes ultramáficos

Libre de interferencia humana el contenido de metales del suelo depende en gran medida de la roca madre de la que parte el suelo y de los procesos de meteorización. En general, las concentraciones de estos elementos en suelos son bajas, aunque existen excepciones, como el caso de los suelos serpentínicos que derivan de rocas ultramáficas y que están naturalmente enriquecidos en metales como Ni, Cr y Co. El término "ultramáfica" se refiere a las rocas ígneas o metamórficas que contienen altas cantidades de minerales ferromagnesianos (> 70%) y concentraciones bajas de sílice ($\text{SiO}_2 < 45\%$). Las rocas ígneas ultramáficas se componen esencialmente de minerales ferro-magnesianos (más del 90%), particularmente olivinos y piroxenos (Brooks, 1987). La mayoría de estas rocas ha sufrido distintos procesos metamórficos, siendo la serpentinización (en diversos grados) el más frecuente. La serpentinización es un proceso hidrotermal en el que minerales primarios, tales como olivinos y piroxenos, se transforman en minerales ultramáficos, como antigorita, lizardita y crisotilo. Las rocas ultramáficas tienden a ser ricas en elementos traza como Cr, Co y Ni y deficientes en P, K y Ca, siendo estos cuatro últimos esenciales en la nutrición vegetal (Brooks, 1987, Calvo de Anta *et al.*, 1987, Proctor, 1999). Las rocas ultramáficas están ampliamente distribuidas en todo el mundo y suponen cerca del 13% de los sustratos geológicos mundiales (Menezes de Sequeira & Pinto da Silva, 1991).

Los suelos que se desarrollan sobre rocas ultramáficas se denominan

habitualmente suelos ultramáficos o suelos serpentínicos aunque este último no sea el apelativo más correcto (Brooks, 1987) y estos ocupan alrededor del 1% de toda la corteza terrestre (Proctor, 1999). Aunque estos suelos muestran una considerable variabilidad en sus propiedades físico-químicas, por lo general presentan una serie de características comunes que los diferencian de otros suelos. Entre las características más destacables se pueden mencionar: elevadas concentraciones de Mg, Fe y elementos traza potencialmente fitotóxicos, como Co, Cr y Ni; bajas concentraciones de nutrientes esenciales como N, P y K; baja relación Ca/Mg; bajo contenido en materia orgánica y una baja capacidad de retención hídrica (Whittaker, 1954, Brooks, 1987). Los suelos ultramáficos, o suelos derivados de rocas ultramáficas, están considerados como ambientes naturalmente ricos en elementos traza.

En la Península Ibérica se distinguen áreas serpentínicas en el noroeste de España (complejo de la Capelada-Serra do Careón), noreste de Portugal (Trás-Os-Montes) y suroeste de España (Sierra Bermeja) (Brooks *et al.*, 1981, Menezes de Sequeira & Pinto da Silva, 1991). En la provincia de Coruña, las rocas ultramáficas son parte de un complejo de rocas básicas (gabros, noritas, anfibolitas y eclogitas) que se sitúan al norte de Santiago de Compostela hasta O Cabo Ortegal. Existen rocas serpentinizadas en el complejo de A Capelada (afloramientos de Herbeira, Uzal y Limo), en el complejo polimetamórfico de Melide (gándara de Melide y Serra do Careón) y en el complejo de Bazar-Castriz (Macías Vázquez & Calvo de Anta, 1992). También se encuentran rocas ultramáficas en el noreste de Portugal, en Trás-Os-Montes (cerca de Bragança y Vinhais). La geología de esta región fue descrita por Ferreira (1965) y Coteloneiva (1948) que la interpretaron como un batolito erosionado y rodeado de anfibolitas. Estas rocas ultramáficas están representadas por dunitas, lertzolitas, anfibolitas y peridotitas ricas en asbestos fuertemente serpentinizadas que difieren de otras rocas ultramáficas por: su alto contenido en magnesio (sobre un 35% MgO) debido a las altas concentraciones de enstatita y forsterita, y también por una elevada concentración de Na debido a la naturaleza calco-alcalina del magma original (Brooks, 1987). La tercera área de serpentinas de la Península Ibérica se localiza en Sierra Bermeja (llamada así por el color rojo debido a la riqueza en hierro de las rocas). Fue descrita por López González (1975) como rocas de origen

Terciario, rodeadas de sedimentos y con invasiones pequeñas de rocas ácidas. Las peridotitas están fuertemente serpentinizadas y contienen abundantes óxidos de Fe (Aguilar-Ruiz *et al.*, 1998, Pérez-Latorre *et al.*, 2013).

Los ecosistemas serpentínicos se caracterizan por un escaso desarrollo de la cobertura vegetal, así como por afloramientos rocosos ocasionados por la gran lentitud en la alteración de las rocas (Proctor & Whitten, 1971, Brooks, 1987, Menezes de Sequeira & Pinto da Silva, 1991, Reeves *et al.*, 1996, Robinson *et al.*, 1996). Las propiedades singulares de los suelos ultramáficos (alta concentración de elementos traza, baja fertilidad, etc) dan lugar a una flora con un elevado número de endemismos, y con adaptaciones morfológicas y estructurales que se desarrollaron para resistir, tolerar y/o prosperar en estas condiciones desfavorables para el crecimiento vegetal (Whittaker, 1954, Kruckeberg, 1984, Brooks, 1987, Menezes de Sequeira & Pinto da Silva, 1991, Roberts & Proctor, 1992, Harrison, 1999, Brady *et al.*, 2005). Se cree que la flora en las áreas serpentínicas está muy condicionada por la presencia de níquel, debido a su disponibilidad relativamente alta y el hecho de que en muchas de estas zonas se hayan descubierto (sub) especies vegetales que pueden acumular concentraciones de Ni extraordinariamente elevadas en su biomasa aérea (Brooks *et al.*, 1977, Brooks, 1987, Proctor & Roberts, 1992, Díez-Lázaro *et al.*, 2006). Este tipo de plantas, que se describirán con más detalle en el apartado siguiente, se denominan hiperacumuladoras y su distribución está estrechamente relacionada con la distribución de los substratos ultramáficos (Brooks & Radford, 1978, Brooks *et al.*, 1979, Baker & Brooks, 1989).

En áreas serpentínicas de la Península Ibérica se encuentran 2 subespecies de *Alyssum serpyllifolium* Desf. hiperacumuladoras de níquel: *Alyssum serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*, frecuentemente denominada *A. pintodasilvae* (endémica de áreas serpentínicas de la región de Trás-los-Móntes en el nordeste de Portugal y del noroeste de España en Barazón) (Pinto da Silva, 1970, Freitas *et al.*, 2004) y *Alyssum serpyllifolium* subsp. *malacitanum* frecuentemente denominada *A. malacitanum* (endémica de suelos sobre serpentinas del Sur de España concretamente en Sierra Bermeja, Málaga) (López-González, 1975). Las dos subespecies son genéticamente próximas a la no hiperacumuladora, *Alyssum serpyllifolium* Desf., una planta ubicua en la Península Ibérica y el sur de Francia.

1.2.1 Plantas hiperacumuladoras

Algunas plantas han desarrollado mecanismos biológicos altamente especializados que les permiten resistir, tolerar y/o desarrollarse en presencia de elevadas concentraciones de metales, como las presentes en suelos ultramáficos (Brooks, 1987, Menezes de Sequeira & Pinto da Silva, 1991, Reeves *et al.*, 1996). Baker (1981) definió tres estrategias mediante las cuales las plantas podrían resistir altas concentraciones de metales, clasificándolas en exclusoras, indicadoras y acumuladoras (Figura 1.2).

- Plantas exclusoras: Son aquellas que toleran elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y/o translocación hacia las hojas, lo que les permite mantener concentraciones constantes y relativamente bajas en la biomasa aérea, independientemente de la concentración metálica del suelo en un intervalo amplio.

- Plantas indicadoras: son aquellas que presentan en su parte aérea concentraciones metálicas que refleja la concentración de metal en el suelo; sin embargo, cuando los metales en el suelo alcanzan niveles tóxicos, se reduce el crecimiento y se llega a causar la muerte de la planta.

- Plantas acumuladoras: Son aquellas que absorben los metales activamente a partir del suelo y los acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea.

Entre las plantas acumuladoras se han reconocido diferentes grados de acumulación metálica, desde pequeñas elevaciones sobre el nivel de fondo hasta concentraciones excepcionalmente elevadas de elementos traza en su biomasa aérea, sin mostrar ningún síntoma visible de toxicidad, como es el caso de las plantas hiperacumuladoras (Brooks, 1987). El término hiperacumuladora fue acuñado por Brooks y Reeves para referirse a plantas desarrolladas en campo capaces de acumular en los tejidos de su parte aérea cantidades $>1000 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ peso seco (Brooks *et al.*, 1977). De forma general, las hiperacumuladoras alcanzan concentraciones de metales en hojas entre 10 y 100 veces mayores que las plantas normales (Lasat, 2002). Actualmente se utiliza el término hiperacumuladora de metales para designar plantas que acumulan en su parte aérea concentraciones $>10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn y Zn (1% peso seco), $>1000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Co, Cu, Cr, Pb, Ni y Se (0,1% peso seco) y $>100 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd y As (0,001% peso seco) (Reeves & Brooks, 1983). Recientemente estos criterios han sido reevaluados y se ha

propuesto un umbral más bajo para elementos como Co, Cu y Cr (300 mg kg^{-1} ; 0,03% peso seco) o Zn (3000 mg kg^{-1} ; 0,3% pesos seco) (Krämer, 2010, van der Ent *et al.*, 2013).

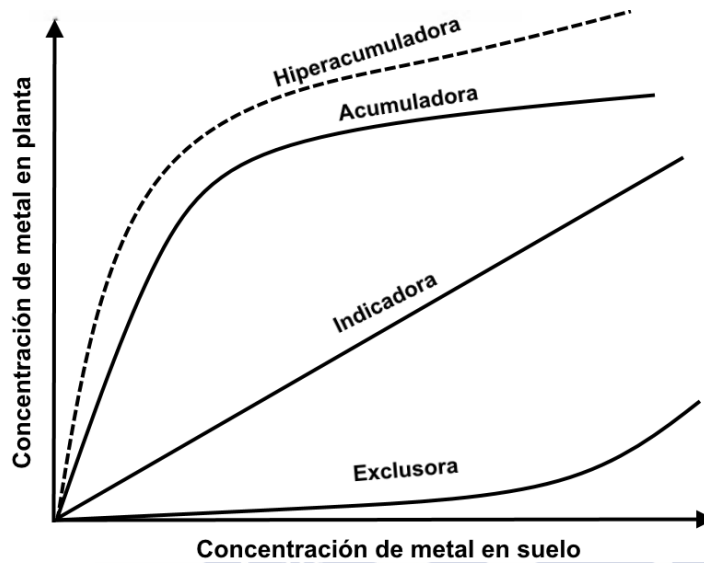


Figura 1.2: Respuestas típicas de las plantas frente a la presencia de elementos traza en el suelo (Baker, 1981).

La hiperacumulación es un fenómeno raro y la base evolutiva de su selección ha sido una incertidumbre desde su descubrimiento. Algunos estudios sugieren que la alta concentración de metales en la parte aérea de estas plantas les confiere capacidad para limitar su depredación y las infecciones microbianas causantes de enfermedades vegetales (Boyd & Martens, 1994, Boyd *et al.*, 1994, Pollard & Alan, 1997, Poschenrieder *et al.*, 2006), además algunas de estas plantas no pueden completar sus ciclos vitales cuando crecen en suelos con un bajo nivel de metal. Hasta el momento, se conocen aproximadamente 500 especies de hiperacumuladoras y más del 90% de estas especies (>450 especies) acumulan Ni (Pollard *et al.*, 2014). Los géneros con mayor número de hiperacumuladoras de Ni son *Alyssum* y *Noccaea* (anteriormente *Thlaspi*) ambas pertenecen a la familia de angiospermas *Brassicaceae* (Baker & Brooks, 1989). La lista de hiperacumuladoras de Zn es mucho más corta que la de Ni, con cerca de 10-20

especies identificadas (Baker *et al.*, 1992, Brooks, 1994). Estas plantas se encuentran principalmente en suelos ricos en Zn como los suelos de calamina (Meerts & Van Isacker, 1997, Bert *et al.*, 2000). Las plantas hiperacumuladoras de Zn se concentran en los géneros *Noccaea* y *Arabidopsis* (ambos dentro de la familia *Brassicaceae*) aunque se han encontrado algunas especies de otras familias que pueden hiperacumular este elemento, como algunos miembros del género *Sedum* (*Crassulaceae*) encontrados en Asia (Baker & Brooks, 1989, Deng *et al.*, 2016, Gupta *et al.*, 2016, Martos *et al.*, 2016). Las hiperacumuladoras de Cd parecen ser las misma que las hiperacumuladoras de Zn, *N. caerulescens*, *A. halleri*, *Sedum plumbizincicola* y *S. alfredii* (Brown *et al.*, 1995, Küpper *et al.*, 2000, Lombi *et al.*, 2000, Deng *et al.*, 2016) y la hiperacumuladora de Ni *Noccaea goesingensis* (Lombi *et al.*, 2000).

1.2.2 Comunidades microbianas en suelos ultramáficos

Los elementos traza a concentraciones elevadas pueden tener un efecto negativo sobre los microorganismos del suelo. Numerosos estudios han demostrado una reducción en la densidad, actividad metabólica y la diversidad de las comunidades microbianas después de exposición prolongada a metales (Giller *et al.*, 1998, Kozdrój & van Elsas, 2000, Lorenz *et al.*, 2006, Renella *et al.*, 2006). Las concentraciones tóxicas de metales provocan un cambio en la composición de especies y la selección de bacterias tolerantes a metales (Giller *et al.*, 1998, Kelly *et al.*, 1999, Mertens *et al.*, 2006, Pereira & Castro, 2014).

Los suelos ultramáficos tienen gran interés para el estudio de la adaptación bacteriana a metales como el Ni, al ser suelos naturalmente enriquecidos en este elemento y expuestos al mismo a largo plazo (Héry *et al.*, 2003). Además, los suelos ultramáficos podrían proporcionar cepas microbianas o bio-inóculos resistentes a metales con uso potencial en prácticas de biorremedio (Mengoni *et al.*, 2001).

Las comunidades de plantas desarrolladas en suelos ultramáficos, y especialmente las especies vegetales hiperacumuladoras de Ni, han sido el objeto de muchos estudios; sin embargo la microbiota edáfica en este tipo de suelos permanece poco conocida. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados en

suelos ultramáficos se han centrado en la comunidad bacteriana cultivable y en la resistencia a metal de cepas específicas (Lipman, 1926, Acea & Carballas, 1990, Amir & Pineau, 1998, Mengoni *et al.*, 2001, Pal *et al.*, 2005, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Álvarez-López *et al.*, 2016) y existen relativamente pocos estudios centrados en la comunidad bacteriana no cultivable (Mengoni *et al.*, 2004, DeGrood *et al.*, 2005, Oline, 2006). Diversos estudios indican que los suelos ultramáficos se caracterizan por una baja densidad y actividad microbianas, lo que se ha atribuido principalmente a las elevadas concentraciones de elementos traza de estos suelos (Lipman, 1926, Acea & Carballas, 1986, 1990, DeGrood *et al.*, 2005, Pal *et al.*, 2005, Álvarez-López *et al.*, 2016). Sin embargo, algunos estudios demuestran que las comunidades microbianas presentan una alta diversidad genética (Mengoni *et al.*, 2004, Mengoni *et al.*, 2010). Mengoni *et al.* (2004) analizaron la comunidad bacteriana en tres áreas serpentínicas del centro de Italia utilizando T-RFLP (del inglés Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) y encontraron en estos suelos una gran diversidad genética. Oline (2006) comparó las comunidades bacterianas en suelos ultramáficos con aquellas de suelos adyacentes no ultramáficos utilizando librerías de clones del gen ARNr 16S y pese al reducido tamaño de las librerías analizadas, observó que las comunidades bacterianas de suelos ultramáficos tendían a mostrar mayores similitudes entre ellas que con las comunidades de suelos no serpentínicas. Además, este autor constató que las diferencias eran significativas a escala taxonómica inferior hecho que atribuye a que la adaptación bacteriana a las condiciones de suelos ultramáficos y, en consecuencia, las características específicas de las comunidades de estos suelos, pueden estar relacionada con la presencia de genes de resistencia que se transmiten horizontalmente. Varios estudios han descrito una gran abundancia de miembros del Filo *Actinobacteria* en suelos ultramáficos (Amir & Pineau, 1998, Mengoni *et al.*, 2001, Héry *et al.*, 2003, DeGrood *et al.*, 2005). Amir & Pineau (1998) cultivaron bacterias de suelos ultramáficos de Nueva Caledonia y encontrando que más del 80% de las bacterias cultivables pertenecían a este mismo Filo, *Actinobacteria*. Asimismo, en tres áreas serpentínicas de Italia la comunidad de bacterias cultivables resistentes a Ni estuvo dominada por miembros del Filo *Actinobacteria*, y más concretamente del género *Streptomyces* (Mengoni *et al.*, 2001). Héry *et al.*, (2003) evaluaron los

cambios inducidos en las comunidades microbianas de suelos ultramáficos y no ultramáficos de Nueva Caledonia al añadir Ni (en forma de NiCl₂). Tras un periodo de 14 días de incubación ambos suelos mostraron una nueva banda en los patrones de ITS (del inglés Internal transcribed spacer) con una secuencia que coincidía con la de un miembro del orden *Actinomycetales*. DeGroot *et al.* (2005) también estudiaron las comunidades microbianas en varios suelos ultramáficos y no ultramáficos utilizando los perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos (comúnmente denominados por sus siglas en inglés PLFA), observando una mayor proporción de *Actinobacteria* en los suelos ultramáficos que en los no ultramáficos. Por el contrario, existen estudios que describen una baja proporción de *Actinobacteria* en suelos ultramáficos (Lipman, 1926). Pal *et al.* (2005) obtuvieron una frecuencia parecida de bacterias Gram-positivas (51%; p.e el Filo *Actinobacteria*) y Gram-negativas (49%; p.e el Filo *Proteobacteria*) aisladas a partir de suelos ultramáficos de la India. Utilizando métodos basados en secuenciación de alto rendimiento, secuenciación 454 e Illumina MiSeq respectivamente, encontraron que la comunidades bacterianas de los suelos ultramáficos de Nueva Caledonia utilizados en estos estudios están dominadas por miembros del Filo *Proteobacteria* (Bordez *et al.*, 2016, Gourmelon *et al.*, 2016).

Diversos estudios han demostrado que las cepas bacterianas aisladas de suelos ultramáficos, y especialmente aquellas asociadas a plantas hiperacumuladoras, poseen una mayor resistencia a metales tales como Co, Cr o Ni (Mengoni *et al.*, 2001, Abou-Shanab *et al.*, 2003, Héry *et al.*, 2003, Idris *et al.*, 2004, Pal *et al.*, 2005, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Becerra-Castro *et al.*, 2011, Álvarez- López, 2016). En un trabajo realizado por Héry *et al.* (2003) estudiaron los efectos de la adición de Ni sobre la estructura de la comunidad bacteriana de un suelo ultramáfico de Nueva Caledonia y de un suelo referencia (no ultramáfico). Los resultados confirmaron que la comunidad bacteriana del suelo ultramáfico estaba mejor adaptada a las altas concentraciones de Ni. Estos autores ponen de manifiesto la importancia del estudio de las comunidades microbianas de suelos ultramáficos que han estado expuestos a metales y particularmente a Ni, por 40 millones de años (Eoceno), y en los que se espera que el impacto de níquel en la comunidad bacteriana difiera considerablemente de la de suelos recientemente contaminados. Schlegel *et al.* (1991) aislaron cepas bacterianas de suelos

ultramáficos capaces de tolerar hasta 10-20 mM Ni (en medio de cultivo), mientras que las cepas de otros tipos de suelo toleraron solamente 1 mM de Ni. Turgay *et al.* (2012) aislaron cepas bacterianas de suelos ultramáficos de Turquía que toleraban hasta 34 mM de Ni en el medio de cultivo. Mengoni *et al.* (2001) observaron que la mayoría de las cepas aisladas de distintos suelos ultramáficos mostraron una resistencia simultánea a Ni, Cr y Co, mientras que solamente un número reducido eran resistentes a Zn y Cu. Estos autores sugirieron la existencia de distintas combinaciones de determinantes genéticos para resistencia a metal, incluyendo co-resistencia a distintos metales o resistencia a un solo metal, que podrían haber evolucionado independientemente en los nichos ecológicos de los afloramientos serpentínicos (Mengoni *et al.*, 2001).

El estudio de los hongos micorrícicos en suelos ultramáficos también han recibido mucha atención (Schechter & Bruns, 2008, Branco, 2010, Schechter & Branco, 2014). Branco y Ree (2010) mostraron que, a pesar de la naturaleza extrema del sustrato, los suelos ultramáficos presentan una abundante comunidad de hongos ectomicorrícicos. Maas & Stuntz (1969) documentaron diferencias significativas en la mico-flora de suelos ultramáficos y no-ultramáficos, y describieron un mayor número de especies de micorrizas en suelos desarrollados sobre serpentinas que en los suelos no ultramáficos. Pal *et al.* (2005) mostraron que de manera global los hongos presentes en suelos ultramáficos tenían una tolerancia al Ni similar a las bacterias.

1.3 Suelos con elevado contenido en elementos traza de origen antropogénico.

Los metales son uno de los contaminantes del suelo más frecuente (35%) en Europa (European Commission, 2014) y están considerados como uno de los contaminantes más peligrosos debido a su larga persistencia en el ambiente (Adriano, 2001, Vassilev *et al.*, 2004). Así, su incorporación a la cadena alimentaria puede ocasionar graves problemas a los seres vivos (Tabla 1.1). Según Ross (1994), las fuentes antropogénicas de contaminación de metales se pueden resumir en cuatro grupos principales (Tabla 1.1): 1) minería y fundición de metales, 2) industria, 3) deposición atmosférica y 4) agricultura. A nivel mundial,

hay un mercado creciente de materias primas que a su vez causan un aumento en las actividades de extracción. Esto contribuye a una mayor entrada de metales en los suelos (Alloway, 1995).

Tabla 1.1. Diferentes fuentes de metales traza en suelos (Lone *et al.*, 2008).

Metal traza	Origen
As	Semiconductores, refinación de petróleo, conservantes de madera, alimentación animal, centrales eléctricas de carbón, herbicidas, volcanes, minería y fundición.
Cu	Industria del galvanizado, fundición y refinación, minería, biosólidos.
Cd	Fuentes geogénicas, actividades antropogénicas, fundición y refinación de metal, quema de combustibles fósiles, uso de fertilizantes fosfatados, lodos de depuradora.
Cr	Industria del galvanizado, residuos sólidos, lodos, curtido de piel.
Pb	Minería y la fundición, quema de gasolina con plomo, aguas residuales municipales, residuos industriales enriquecidos en Pb, pinturas.
Hg	Erupciones volcánicas, incendios forestales, emisiones de industrias que elaboran soda cáustica, quema de carbón, turba y leña.
Se	Minería de Carbón, refinado de petróleo, combustión de combustibles fósiles, industria de fabricación de vidrio, síntesis química (p. ej., barniz, pinturas, etc)
Ni	Erupciones volcánicas, relleno de tierra, incendios forestales, intercambio del gas en el océano, erosión de suelos y materiales geológicos ricos en metal.
Zn	Industria del galvanizado, fundición y refinación, minería, biosólidos.

Una de las principales causas de contaminación del suelo por metales traza es la actividad minera. Los procesos relacionados con la extracción y aprovechamiento de metales generan grandes cantidades de subproductos no deseados y residuos (EPA, 2004), que se consideran una fuente importante de contaminación (Mendez & Maier, 2008). A esto se une la degradación del suelo

que es uno de los impactos más evidentes de la actividad minera. Los residuos y escombros de mina se caracterizan por propiciar condiciones desfavorables para el crecimiento vegetal, debido principalmente a una elevada concentración de metales (Mendez & Maier, 2008). Además estos suelos presentan otros factores adicionales que limitan el crecimiento vegetal como son la baja disponibilidad de nutrientes y de materia orgánica, pobre estructura y, a menudo, alta acidez (Monterroso & Macías, 1998, Wong, 2003).

Otra de las actividades humanas que causan contaminación en el suelo por metales son los procesos industriales. Muchos de los productos que utilizamos hoy en día son fabricados en industrias tales como la textil, petroquímica, curtido, farmacéuticas, etc. (Wuana & Okieimen, 2011). Los residuos resultantes de esta producción son vertidos al suelo y muchos son potencialmente peligrosos debido a su contenido en metales (Cr, Pb, Zn) o compuestos orgánicos tóxicos (Sumner, 2000).

Los metales traza también pueden llegar al suelo por deposición atmosféricas. La presencia de estos elementos en la atmósfera es, principalmente, resultado de la producción de energía, el transporte, la metalurgia y la producción de materiales de construcción (Alloway, 2013). Con la excepción del mercurio, los elementos traza llegan a la atmósfera generalmente en forma de aerosol y el depósito de estos en el suelo se produce mayoritariamente a través de precipitación y sedimentación, siendo estos metales esparcidos por el viento en amplias áreas (Wuana & Okieimen, 2011, Alloway, 2013). La mayoría de los combustibles fósiles contienen elementos traza y desde la revolución industrial han adquirido gran importancia. La emisión de Pb debido al uso de gasolinas ricas en este elemento, contribuye al aumento del Pb en los suelos de zonas urbanas y áreas adyacentes a las carreteras. El Zn y el Cd provenientes de los aceites lubricantes y ruedas, pueden estar también generando problemas en los suelos cercanos a las carreteras (Wuana & Okieimen, 2011).

Las prácticas agrícolas también juegan un papel importante en el aumento de elementos traza en el suelo. Así los fertilizantes, que se añaden regularmente a los suelos en grandes cantidades para proporcionar suficientes nutrientes a las plantas, contienen pequeñas cantidades de metales, como Cd y Pb, impurezas que después del uso continuo pueden aumentar significativamente el contenido de

estos elementos en el suelo (Wuana & Okieimen, 2011). El uso de pesticidas en agricultura es común y estos presentan concentraciones importantes de metales en su composición que pueden causar problemas ambientales (McLaughlin *et al.*, 2000). La adición de enmiendas orgánicas a suelos agrícolas, como estiércol, compost o lodos municipales, también propicia la acumulación de elementos traza en los suelos (Basta *et al.*, 005). El uso de aguas residuales en prácticas agrícolas es muy común en todo el mundo, en 2011 se estimaba que se regaban 20 millones de hectáreas de suelo cultivado con aguas residuales (Wuana & Okieimen, 2011). Aunque las concentraciones de metales en este tipo de aguas suelen ser relativamente bajas, el aumento de su uso o su aplicación repetida puede llevar a la acumulación de elementos traza en el suelo. En algunos casos, los metales añadidos al suelo con distintas prácticas agrícolas pueden ser lixiviados a través del perfil del suelo y constituyen un riesgo de contaminación de las aguas subterráneas (McLaren *et al.*, 2005).

1.3.1 Comunidades microbianas en suelos contaminados con elementos traza

En el suelo se ha descrito una gran riqueza en microorganismos, así se ha encontrado que 1 gramo de suelo agrícola puede contener millones de unidades formadoras de colonias (UFC) pertenecientes a miles de especies diferentes (Rosselló-Mora & Amann, 2001). A pesar de que los microorganismos constituyen menos del 0,5% de la masa del suelo, tienen un gran impacto sobre sus propiedades y los procesos que ocurren en el mismo (Tate, 2000); como es el caso de los ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros metales; degradación de compuestos xenobióticos, etc.

Los microorganismos son los primeros en ser sometidos al impacto directo e indirecto de la contaminación por metales en el suelo (Lenart-Boroń & Boroń, 2014). La respuesta de las poblaciones bacterianas a la contaminación por elementos traza dependerá de múltiples factores, como por ejemplo el tipo de metal y el tipo de microorganismo, la concentración y biodisponibilidad de los metales, etc. (Hassen *et al.*, 1998).

Tal como se indicó en el primer apartado los metales sin función biológica conocida son generalmente tolerados a concentraciones muy bajas, mientras que los elementos esenciales son tolerados a concentraciones más altas (Haferburg & Kothe, 2007). Los elementos traza a concentraciones no tóxicas están involucrados en el metabolismo secundario de bacterias y hongos (Weinberg, 1990, Haferburg & Kothe, 2007). A concentraciones tóxicas estos metales pueden dañar las enzimas y por lo tanto provocar su inactivación, ya que los elementos asociados a enzimas pueden ser desplazados por elementos tóxicos con estructura similar (Bruins *et al.*, 2000). Además, la presencia de elementos traza a altas concentraciones también puede alterar la estructura de los ácidos nucleicos y proteínas, formando complejos con moléculas proteicas que los inactivan y también pueden actuar como sustancias xenotóxicas y alterar procesos fisiológicos como son la fotosíntesis, la respiración celular y el metabolismo de los carbohidratos. Los efectos más notables son la ruptura de la membrana celular de los microorganismos, de los orgánulos celulares o la destrucción de toda la célula (Figura 1.3) (Vangronsveld & Clijsters, 2008, Lenart-Boroń & Boroń, 2014). En general se considera que los microorganismos y enzimas del suelo son muy sensibles al exceso de elementos traza y son considerados como indicadores bioquímicos para evaluar la calidad del suelo (Winding *et al.*, 2005, Renella *et al.*, 2006, Igbinsola, 2015).

Varios estudios han demostrado que los metales afectan el crecimiento, morfología, actividad bioquímica, diversidad de los microorganismos y estructura de la comunidad (Sandaa *et al.*, 1999, Tsai *et al.*, 2005, Perez-de-Mora *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2007, Dell'Amico *et al.*, 2008, Subrahmanyam *et al.*, 2014). El estrés causado por la presencia de elementos traza a concentraciones tóxicas, generalmente disminuye la diversidad y actividad de las poblaciones bacterianas del suelo provocando una reducción de la biomasa total, disminución en número de poblaciones específicas y un cambio en la estructura de la comunidad (Hirsch *et al.*, 1993, Smit *et al.*, 1997, Sandaa *et al.*, 1999, Kozdrój & van Elsas, 2001, Sandaa *et al.*, 2001, Moffett *et al.*, 2003, Hinojosa *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2010, Lenart-Boroń & Boroń, 2014, Zhang *et al.*, 2015). Sin embargo, hay otros estudios que no muestran esta relación entre contaminación por metales traza y biomasa

microbiana o estructura de la comunidad bacteriana (Müller *et al.*, 2001, Gillan *et al.*, 2005, Grandlic *et al.*, 2006, Lorenz *et al.*, 2006, Zhu *et al.*, 2013).

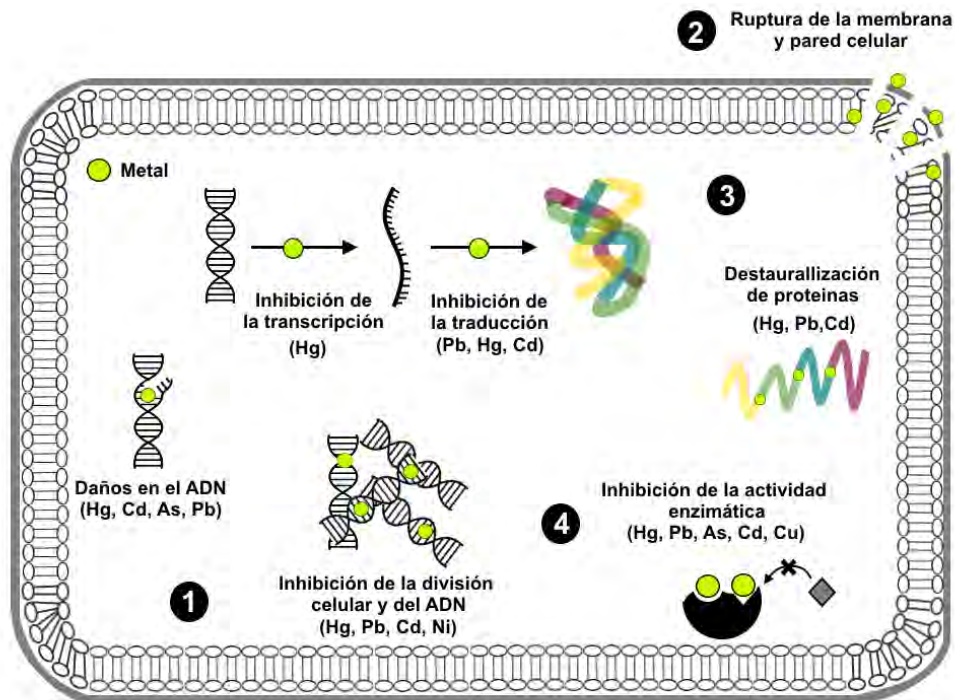


Figura 1.3: Efectos de los elementos traza a altas concentraciones en las bacterias: 1) Producción de especies reactivas de oxígeno que causan daños en el ADN, 2) Ruptura de la membrana celular; 3) Bloqueo de mecanismos esenciales al dañarse las biomoléculas; 4) Desplazamiento de elementos esenciales (p.ej. Fe) en las enzimas por otros metales.

Un efecto típico de la contaminación con metales traza sobre la comunidad bacteriana es el aumento de la frecuencia de bacterias tolerantes a metal (Bååth, 1989, Doelman *et al.*, 1994, Huysman *et al.*, 1994, Díaz-Raviña & Bååth, 1996, Pennanen *et al.*, 1996, Müller *et al.*, 2001, Mertens *et al.*, 2006, Perez-de-Mora *et al.*, 2006, Chien *et al.*, 2008, Dell'Amico *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios indican que las bacterias y hongos aislados en hábitats ricos en metales toleran niveles más altos de estos, que los aislados en áreas no contaminadas (Doelman *et al.*, 1994, Huysman *et al.*, 1994, Mertens *et al.*, 2006) y se ha visto que la adición de metales al suelo (Cd, Zn, Cu, Pb o Ni), induce un incremento de la tolerancia de la comunidad bacteriana a estos metales por la desaparición de especies sensibles y posterior adaptación de bacterias tolerantes (Díaz-Raviña & Bååth, 1996). Las

comunidades bacterianas tolerantes están a menudo dominadas por bacterias Gram-positivas de los géneros *Bacillus* (*Firmicutes*), *Arthrobacter* y *Corynebacterium* (*Actinobacteria*) o Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (*Proteobacteria*) (Piotrowska-Seget *et al.*, 2005). Sheik *et al.* (2012) observaron cambios en la comunidad bacteriana y en la abundancia del Filo *Proteobacteria* en suelos expuestos a Cr y As durante largos periodos de tiempo. En comparación con un suelo no contaminado, los suelos contaminados estaban dominados por *Proteobacterias* mientras que *Actinobacteria* y *Acidobacteria* (que son generalmente abundantes en suelos con altas concentraciones de elementos traza) se convirtieron en taxa menos representadas de la comunidad bacteriana. En otro estudio, Vivas *et al.* (2008) encontraron que *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* son los Fila más abundantes en suelos con contaminación mixta (contaminantes orgánicos y elementos traza). Subrahmanyam *et al.* (2016) estudiaron el efecto de la contaminación a largo plazo sobre la actividad y la composición de la comunidad bacteriana. A su vez identificaron aquellos Fila más sensibles a metales y/o dominantes en la comunidad bacteriana. Utilizando clonación y secuenciación de las bandas de DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) revelaron que los Fila bacterianos dominantes en suelos con contaminación mixta (orgánicos y elementos traza) eran *Acidobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Estos autores sugirieron que estos Fila pueden incluir bacterias con alta tolerancia a elementos traza. Gołębiewski *et al.* (2014) se cuestionaron si existía un conjunto de taxones comunes a este tipo de suelos contaminados, y estudiaron 2 suelos con contaminación metálica, por Zn, Pb y Cr. Estos autores observaron un grupo de organismos presentes en todas las muestras analizadas, que pertenecían a los géneros *Sphingomonas*, *Candidatus Solibacter* y *Flexibacter*. Estos estudios principalmente han aumentado nuestro conocimiento sobre las poblaciones bacterianas sensibles que se ven afectadas negativamente por elementos traza.

Los distintos metales presentes en el suelo afectan las poblaciones microbianas de forma diferente (Lenart-Boroń & Boroń, 2014). Por ejemplo, el Cu afecta a los microorganismos que intervienen en el proceso de nitrificación y de mineralización de compuestos proteínicos (Kabata-Pendias & Pendias, 1999). Utilizando métodos dependientes de cultivo, Dell'Amico *et al.* (2008) demostraron

que el Cu influye en las comunidades bacterianas cultivables, afectando la estructura y alterando su resistencia a este metal. El porcentaje de bacterias de crecimiento rápido, después de un día de incubación, era menor en los suelos con mayor concentración de Cu extraíble. Utilizando métodos no dependientes de cultivo, Berg *et al.* (2012) descubrieron que una exposición a Cu durante un largo periodo de tiempo afecta a la estructura de la comunidad bacteriana, pero no a su diversidad y riqueza. Distintos autores llegaron a conclusiones similares (Sandaa *et al.*, 2001, Ellis *et al.*, 2003, Chodak *et al.*, 2013). Rajapaksha *et al.* (2004) compararon las reacciones de bacterias ante la presencia de metales a concentraciones tóxicas en suelos (Zn y Cu) y concluyeron que la comunidad bacteriana es más sensible al aumento de elementos traza en el suelo que la comunidad fúngica. Del mismo modo, Zhang *et al.* (2016) demostraron, utilizando PCR-DGGE, que la contaminación por metales traza, como Pb, Cd, Cr and Cu, en suelos, influye significativamente en la estructura de la comunidad bacteriana, provocando cambios en la misma.

Respecto al Cr, Lenart & Wolny-Kołodka (2013), utilizando métodos dependientes de cultivo, concluyeron que el Cr es el principal metal que afecta a las comunidades bacterianas en suelos contaminados por la industria del acero. Estos encontraron diferencias significativas en las comunidades microbianas de suelos no contaminados con respecto a los suelos contaminados. Las bacterias aisladas en estos suelos eran menos abundantes en las áreas contaminadas con elementos traza que en áreas no contaminadas. Concretamente, el Cd y el Cr fueron los principales metales que influyeron en la comunidad bacteriana. Utilizando secuenciación de alto rendimiento, Hur *et al.* (2011) descubrieron que en áreas con altas concentraciones de Cd se encuentran un bajo número de OTUs.

En cuanto al Pb y el Zn, en un estudio Doelman *et al.* (1986) descubrieron que alrededor de 100 ppm de Zn en suelo pueden inhibir procesos de nitrificación, unos 1000 ppm inhibe la mayoría de los procesos microbiológicos en suelos. Un aumento de las concentraciones de Pb en capas superficiales del suelo afecta negativamente a los microorganismos del suelo, se inhiben procesos de descomposición de materia orgánica, particularmente la celulosa, como resultado de la disminución de la actividad enzimática de los microorganismos (Kabata-Pendias & Pendias, 1999). Gołębiewski *et al.* (2014) analizaron suelos

contaminados con Zn, Pb y Cr y descubrieron que el Zn disminuye la diversidad y la riqueza, a nivel de familia y especie. Además, la coexistencia de diferentes metales puede tener más efectos adversos en la biomasa, actividad y diversidad microbiana del suelo que los metales solos a altas concentraciones (Renella *et al.*, 2005). Khan *et al.*, (2007) demostraron que la exposición a elementos traza tanto a corto plazo como a largo plazo dio lugar a una reducción significativa en la actividad y diversidad microbiana del suelo.

Los cambios en la comunidad microbiana dependerán no sólo de la presencia y la concentración de metal, sino de otros factores como puede ser el pH, la materia orgánica, la humedad y el tipo de suelos (Boivin *et al.*, 2006, Stemmer *et al.*, 2007, Kenarova *et al.*, 2014). El pH es uno de los factores que más va a influir en la disponibilidad de metal en el suelo y por lo tanto en la toxicidad del mismo para los microorganismos que en él habitan. Diaz-raviña y Bååth ya expusieron en el 1996 que el pH del suelo tiene un papel muy importante en la determinación de la composición de la comunidad microbiana de los suelos. Rajapaksha *et al.* (2004) también notaron el efecto que tiene el cambio de pH del suelo en la comunidad microbiana. Un pH bajo aumenta los efectos negativos que tienen estos metales sobre las bacterias, mientras que esto no ocurre con los hongos. Fernández-Calviño y Bååth (2016) determinaron la respiración y el crecimiento de bacterias y hongos durante 60 días para ver la respuesta de los microorganismos a adiciones de Cu (hasta 32 mmol Cu Kg⁻¹ suelo) en cuatro suelos con pH entre 4,5 y 7,8. Se confirmó que a mayor pH menor es el efecto tóxico del Cu en las comunidades microbianas.

1.4 Genes implicados en la resistencia a Ni

Los elementos traza, tanto aquellos que son micronutrientes esenciales y son necesarios en pequeñas cantidades para algunos procesos celulares (ejerciendo funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actuando como micronutrientes o cofactores enzimáticos, o estabilizando estructuras proteicas (Nies, 1999, Bruins *et al.*, 2000, Mulrooney & Hausinger, 2003)) como aquellos que no tienen una función biológica conocida, a concentraciones altas ejercen un efecto tóxico sobre los organismos vivos. La

mayoría de los metales traza son elementos de transición con orbitales “d” incompletos, lo que les permite la formación de compuestos complejos. La toxicidad de los elementos traza depende de su capacidad para participar en reacciones de oxidación-reducción en las que se produce tanto la oxidación de grupos tioles como la producción de especies reactivas de oxígeno, como superóxido (O_2^-), radicales hidroxilos (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Harrison *et al.*, 2009).

Las bacterias debido a su pequeño tamaño presentan una alta relación superficie/volumen, lo que se traduce en un área de contacto grande para interactuar con el entorno. Además de esto, presentan carga neta negativa en su envoltura celular lo que hace que estos organismos sean propensos a acumular elementos catiónicos que se hallan en el ambiente (Collins & Stotzky, 1992). En ambientes con concentraciones de elementos traza no tóxicas, la captación de una amplia variedad de iones metálicos se realiza mediante unos pocos sistemas de captación de alta capacidad y relativamente inespecíficos, lo que constituye una solución económica para la mayoría de las células y permite la acumulación de estos elementos en el interior de la célula para necesidades futuras. Sin embargo, los sistemas de captación por defecto y no se detiene en momentos de estrés, con lo que los cationes metálicos son transportados dentro de la célula, se unen a proteínas e interfieren en las funciones de otros cationes metálicos (Nies, 1992). El exceso de elementos traza en las células puede ser letal para las bacterias, por esto la supervivencia microbiana en suelos con alta concentración de elementos traza depende de propiedades intrínsecas bioquímicas y estructurales, fisiológicas, y / o adaptaciones genéticas y morfológicas, cambios de las células, así como modificaciones ambientales en la especiación de metales (Wuertz & Mergeay, 1997). Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias que les permiten resistir elevadas concentraciones de metales en el medio externo (Haferburg & Kothe 2007). Se conocen seis mecanismos generales de resistencia a metales en microorganismos (Bruins *et al.*, 2000):

- Alteración de la permeabilidad de la membrana con objeto de excluir el metal del interior celular.
- Secuestro de metales en el citoplasma por unión a proteínas como metalotioneinas.

- Captación extracelular por unión a moléculas excretadas, como es el caso del glutatión.
- Detoxificación enzimática en formas menos tóxicas del metal.
- Reducción de la sensibilidad de las dianas celulares de estos metales.
- Transporte activo de metales en el interior celular mediante sistemas de extrusión de metales de mayor o menor especificidad.

Los determinantes genéticos que codifican para las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plásmidos o transposones, o en ambos (Bruins *et al.*, 2000). Es probable que las bacterias adquieran resistencia a elementos traza por transferencia de genes o mutación espontánea (Silver & Walderhaug, 1992, Osborn *et al.*, 1997). La resistencia a metales adquirida a través de plásmidos ha sido descrita casi exclusivamente en bacterias. La transferencia de genes que confieren resistencia a metal puede ser mediada por plásmidos de amplio espectro de hospedador, mediante transferencia natural y por movilización de plásmidos recombinantes o por transformación (Mergeay, 1991). Los plásmidos confieren resistencia a elevadas concentraciones de metal y pueden moverse fácilmente de una célula a otra por transmisión horizontal de su material genético, de modo que contribuyen considerablemente a la adaptación de las comunidades microbianas a ambientes contaminados (Mergeay, 1991, Nies, 1999). Los determinantes cromosomales de resistencia a metales son en algunos casos muy similares a los plasmídicos (Schmidt *et al.*, 1991), además se ha comprobado que algunos genes de resistencia a metal localizados en el cromosoma pueden complementar a los plasmídicos (Stoppel & Schlegel, 1995).

De los seis mecanismos citados, la extrusión de metales mediante sistemas de transporte es el mecanismo más extendido en procariotas (Bruins *et al.*, 2000) y la mayoría de estos se basan en el eflujo activo de iones tóxicos tales como iones de Cd, Co, Ni, Cu, Pb y Zn (Nies, 2000). En este proceso intervienen fundamentalmente tres sistemas diferentes encargados de expulsar cationes metálicos del interior celular al exterior, pasando o no por el periplasma (Figura 1.4): los transportadores compuestos por proteínas miembros de la familia de resistencia, nodulación y división celular (RND, por sus siglas en inglés:

Resistance-nodulation-cell division), las ATPasas tipo P y los facilitadores de difusión de cationes (CDF, por sus siglas en inglés: Cation diffusion facilitator) (Nies, 2003).

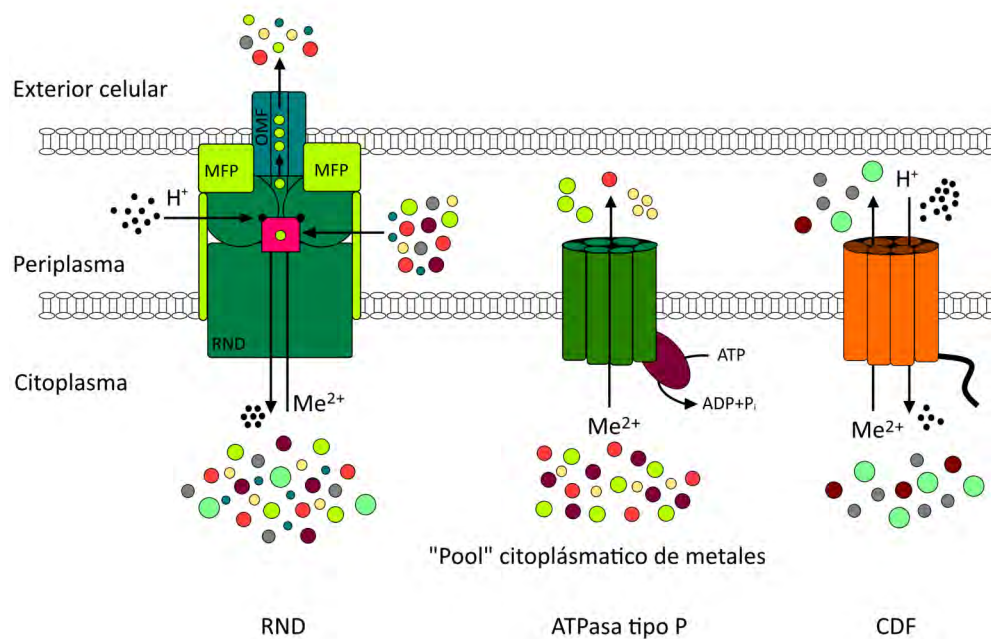


Figura 1.4: Prototipos de los principales sistemas de eflujo de iones metálicos. 1) sistemas RND, 2) ATPasas tipo P y 3) facilitadores de difusión (CDF). Modificada de Nies *et al.* (2003).

Los transportadores de la familia RND fueron descritos como un grupo de proteínas de transporte bacteriano involucrado en la resistencia a elementos traza (*Cupriavidus metallidurans*), nodulación (*Mesorhizobium loti*) y división celular (*E. coli*) (Saier *et al.*, 1994) (Figura 1.4). En bacterias y arqueas, los miembros de esta familia están involucrados en el transporte de metales, compuestos hidrofóbicos, anfifílicos y factores de nodulación y en la excreción de proteínas (SecDF) (Marrero-Coto *et al.*, 2010). Generalmente en estos sistemas el gen que codifica una proteína RND se encuentra ubicado en una posición adyacente a un segundo gen que codifica para un miembro de la familia de proteínas de fusión de membrana (MFP, siglas en inglés: membrane fusion protein) (Saier *et al.*, 1994). Las proteínas MFP se han designado como una familia de proteínas de exportación periplasmática o familia de proteínas adaptadoras periplasmáticas (Johnson &

Church, 1999, Andersen *et al.*, 2001). Además de la proteína MFP, muchas proteínas RND cooperan con una tercera proteína que pertenece a la familia de factores de membrana externa (OMF, por sus siglas en inglés: outer membrane factor) (Paulsen & Saier, 1997). A diferencia de los otros dos sistemas de expulsión mencionados anteriormente (ATPasas tipo P y CDF) que solo translocan el sustrato al espacio periplasmático, estas tres proteínas forman un complejo que puede exportar sus sustratos desde el citoplasma, la membrana citoplasmática o el periplasma a través de la membrana externa directamente al exterior (Zgurskaya & Nikaido, 2000). Esta característica hace que sea considerado como el sistema de resistencia a metales de mayor importancia y complejidad en bacterias (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Los miembros de la familia de proteínas RND están descritos únicamente en bacterias Gram-negativas (Ruggerone *et al.*, 2013) además según el sustrato que transporten, la familia RND se puede subdividir en siete familias, siendo una de ellas la familia HME (Heavy-Metal Efflux). A su vez la familia HME se puede subdividir en cinco grupos: HME1, que transporta Zn^{+2} , Co^{+2} y Cd^{+2} ; HME2 [Co^{+2} y Ni^{+2}], HME3a (metales divalentes) y HME3b (metales monovalentes), HME4 [Cu^{+1} y Ag^{+1}], y HME5 [Ni^{+2}] (Nies, 2003). Los mecanismos del sistema HME-RND que confieren resistencia a Ni mejor caracterizados son el *cnrABC* (resistencia a Co-Ni) de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (anteriormente *Ralstonia metallidurans* CH34) y *nccABC* (resistencia a Ni-Co-Cd).

El determinante *cnr* se encontró localizado en el plásmido pMOL28 de *Ralstonia metallidurans* CH34, pertenece al grupo HME2 y confiere resistencia a Co y Ni. Los productos de los genes *cnrA*, *cnrB* y *cnrC* constituyen un sistema de proteínas que catalizan el eflujo, con coste energético, de Ni y Co mediante un mecanismo de acción de un anti-transporte protón/cation (Grass *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la expresión del sistema se induce por Ni a concentraciones de 50 μM , mientras que el Co a la misma concentración apenas muestra efecto inductivo (Grass *et al.*, 2000). El sistema *ncc* pertenece también al grupo HME2 y es responsable de la resistencia a Ni, Cd y Co. Los genes *ncc* también codifican para un sistema de contra-transporte protón-cation (cación-protón antiporter) que exporta Ni, Cd y Co (Schmidt & Schlegel, 1994). Este determinante génico de resistencia a Ni ha sido identificado y caracterizado a nivel molecular por primera

vez en *Alcaligenes xylosoxidans* 31A que alberga dos determinantes genicos (*ncc*, *nre*) en el plásmido pTOM9 (Schmidt & Schlegel, 1994). *ncc* codifica para una proteína putativa de membrana externa (*nccC*), una proteína de fusión de la membrana o MFP (*nccB*) y una proteína de la familia de resistencia, nodulación y división celular (*nccA*). *nccA* es una bomba de eflujo situada en la membrana citoplasmática (Schmidt & Schlegel, 1994, Nies, 2003). Se ha demostrado que la expresión del sistema permite una resistencia a Ni de hasta 20–50 mM (Schmidt *et al.*, 1991, Schmidt & Schlegel, 1994). Los genes del operón *ncc* tienen una gran homología con los genes del operón *cnr* (Porter *et al.*, 2017).

Las ATPasas tipo P son la defensa básica contra elementos traza catiónicos (Figura 1.4). Estas ATPasas constituyen una familia de proteínas de transporte que emplean como fuente de energía la hidrólisis del ATP (Fagan & Saier, 1994). Sus sustratos son cationes inorgánicas tales como el H⁺, el Na⁺, el K⁺, el Mg⁺², el Ca⁺², el Cu⁺, el Zn⁺² y el Cd⁺² (Saier, 2003). Las ATPasas tipo P pueden importar el sustrato desde el espacio periplasmático, al citoplasma (ATPasa tipo P importadora) o exportarlo desde el citoplasma al periplasma (ATPasa tipo P exportadora). Respecto a la homeostasis de los elementos traza, este tipo de transportadores pueden ser importantes por dos razones: primero, los sistemas de importación de macroelementos como el del Mg²⁺ pueden también importar elementos traza y segundo, las ATPasas tipo P exportadoras pueden detoxificar elementos traza catiónicos expulsándolos al periplasma (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Los CDF funcionan como un filtro secundario de cationes en bacterias (Figura 1.4). Las proteínas CDF forman una familia de transportadores (TC 2.A.4.1.1.2) cuyo sustrato primario son cationes divalentes como Zn⁺², Mn⁺², Co⁺², Ni⁺², Fe⁺² y Cd⁺² (Saier, 2000, Haney *et al.*, 2005). Estos transportadores utilizan protones como fuerza motriz para expulsar metales desde el interior celular, antitransporte metal-protón (Nies & Silver, 1995, Goldberg *et al.*, 1999). Un ejemplo de esta familia de transportadores es el transportador de Co⁺² y Ni⁺² *dmeF* el cual tiene un papel considerable en la tolerancia a Ni y Co y es esencial para exportar estos metales al periplasma celular (Munkelt *et al.*, 2004, Rubio-Sanz *et al.*, 2013).

Hay otros sistemas de transporte activo que son utilizados por las bacterias para la desintoxicación celular como es el caso de los genes *nre* y del *ncr*. El gen *nre* codifica para un antitransporte Ni/H^+ que pertenece a la familia de DHA3 de la superfamilia MFS (del inglés Major Facilitator Superfamily), el mayor grupo de transportadores activos secundarios, que incluye 58 familias diferentes y se encuentra en los tres dominios de la vida *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea* (Law *et al.*, 2008, Pini *et al.*, 2014). Esta proteína fue descubierta por Grass *et al.* (2001) en la bacteria resistente a metal *Achromobacter xylosoxidans* 31A. Esta bacteria contiene dos determinantes de resistencia a Ni distintos: el *ncc*, del que hablamos anteriormente, y *nreB*. Este último se encuentra también en el megaplásmido pTOM9. La expresión del gen *nreB* es inducido por la presencia de Ni en el medio. En bacterias en las que este gen se expresa la acumulación de Ni disminuye en el interior celular sugiriendo que este gen está relacionado con el eflujo de Ni (Nies, 2003). Además se ha demostrado que la expresión de *nreB* permite una resistencia a Ni de hasta 3mM (Taghavi *et al.*, 2001). El determinante génico *ncr* confiere resistencia a Ni y Co, se ha localizado y estudiado en *Serratia marcescens* (Marrero *et al.*, 2007), *Hafnia alvei* (Park *et al.*, 2004) y *Leptospirillum ferriphilum* (Tian *et al.*, 2007). Este determinante codifica para la proteínas *ncrA* que es un antitransporte Ni o Co e H^+ , similar a *NreB*, y componente central de transporte de Ni y Co.

Los mecanismos de extrusión de metales descritos hasta el momento pertenecen a bacterias Gram-negativas, pero también podemos encontrar sistemas de eflujo activo en bacterias Gram-positivas. En el Filo *Actinobacteria*, que incluye las especies *Streptomyces* y *Mycobacterium*, se ha demostrado la existencia de mecanismos de eflujo para eliminar el metal del interior celular y también para tolerar la presencia de antibióticos (Taj & Rajkumar, 2016). Un ejemplo es el sistema de transporte ABC para antibióticos, que también puede ser utilizado como bomba de eflujo para muchos metales (Borges-Walmsley *et al.*, 2003, Haferburg & Kothe, 2007). Otro ejemplo es el mecanismo de resistencia a Cu en *Actinobacteria*, que podría ser similar al mecanismo de bacterias Gram-negativas, el sistema *pco* de *Escherichia coli* o su homólogo *cop* de *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas campestris*, que codifican para una ATPasa de tipo P (Albarracín *et al.*, 2005, Taj & Rajkumar, 2016).

Además de los sistemas de extrusión de metal podemos encontrar otros mecanismos de resistencia en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como son los mecanismos de secuestro intracelular y extracelular y la detoxificación enzimática.

El secuestro de metales intracelular es un mecanismo que se basa en la formación de complejos (complejación) y reducción de metales en el citosol bacteriano evitando que los componentes celulares esenciales se vean expuestos a concentraciones tóxicas de elementos traza (Nies, 1999). Ejemplos de estos mecanismos de detoxificación intracelular son la unión de los metales a proteínas como metalotioneínas o glutatión y/o la formación de cuerpos de inclusión (Puglisi *et al.*, 2012). El glutatión impide la formación de radicales libres de Cu^{+2} y Fe^{+2} y también de Cd^{+2} y Hg^{+2} (Taj & Rajkumar, 2016). Sin embargo, en algunas ocasiones la unión del glutatión con los cationes metálicos puede llevar a la formación de bis-glutationato (Nies, 1999), este puede reaccionar con el oxígeno molecular para formar bisglutationato oxidado y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es conocido por generar estrés oxidativo en las células (Puglisi *et al.*, 2012). En algunos organismos que presentan resistencia a metal se han descubierto cuerpos de inclusión que unen y neutralizan grandes cantidades de cationes metálicos en el interior celular, como es el caso de los gránulos de polifosfato (Gonzalez & Jensen, 1998, Haferburg & Kothe, 2007).

Otro mecanismo de resistencia a metal es la detoxificación enzimática. El mejor ejemplo de este mecanismo es el operón *mer*, que es el sistema mejor estudiado dentro de los mecanismos de detoxificación enzimática. Este operón permite que las bacterias transformen Hg^{+2} en mercurio volátil mediante reducción enzimática y no es funcional hasta que entra en contacto con el Hg (Nies, 1999, Nascimento & Chartone-Souza, 2003).

Otro mecanismo de resistencia es el secuestro extracelular. La exportación de metales al exterior bacteriano va seguida del secuestro para evitar el reingreso de estos elementos traza en la célula. Las bacterias pueden excretar agentes quelantes o secuestrantes de elementos traza como fitoquelatinas, sideróforos y polisacáridos impidiendo la entrada del metal en la célula a través de los transportadores de membrana inespecíficos (Gadd, 2004). Todos estos compuestos se cree que participan en la inmovilización después de la desintoxicación de

elementos traza por algunas bacterias resistentes a metal (Diels *et al.*, 1995). Ejemplos de estos compuestos quelantes extracelulares son los pigmentos de melanina que tienen una enorme afinidad por los metales y son excretados por muchos de los microorganismos del suelo (Haferburg & Kothe, 2007). Por otra parte, la pared celular en combinación con la membrana celular, se encargan de la absorción de metales y facilita la bio-reducción de metales en el suelo. Se ha demostrado que algunas bacterias tienen la capacidad para cambiar el estado de oxidación de los metales, precipitando estos en la pared celular (Gadd, 2007, Andrezza *et al.*, 2010). Las bacterias también pueden pasivamente adsorber grandes cantidades de metal mediante un proceso denominado biosorción. Los cationes metálicos son adsorbidos a la superficie de la célula que está cargada negativamente, y también en la capa de polisacárido de la mayoría de las paredes celulares bacterianas u otras estructuras extracelulares tales como cápsulas (Lovley & Coates, 1997, Malik, 2004). Además, Almás *et al.* (2005) concluyeron que los microporos y biofilms en suelos pueden proteger las bacterias contra la presencia de elementos traza a concentraciones tóxicas y ayudan a prevenir la depredación y la competencia. La figura 1.5 representa de modo esquemático los mecanismos de resistencia a metal en bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas.

Varios trabajos se han centrado en el estudio de estos mecanismos de resistencia en suelos ultramáficos (Stoppel & Schlegel, 1995, Abou-Shanab *et al.*, 2007). Stoppel y Schlegel (1995) compararon los fragmentos de ADN de bacterias aisladas de suelos contaminados y de suelos naturalmente ricos en Ni de Nueva Caledonia que poseían determinantes génicos de resistencia a Ni utilizando hibridación de ADN con ADN. La mayoría del ADN bacteriano utilizado, tanto de bacterias aisladas del suelo ultramáfico como del antrópico, presenta una gran homología con uno o más de los determinantes de resistencia a Ni estudiados, los operones *cnr*, *ncc* y *nre*.

En los suelos ultramáficos de nueva Caledonia los operones *cnr* y *ncc* se pueden encontrar de manera aislada o combinada con el operón *nre*, además estos son los determinantes de resistencia a Ni más abundantes en estos suelos ultramáficos.

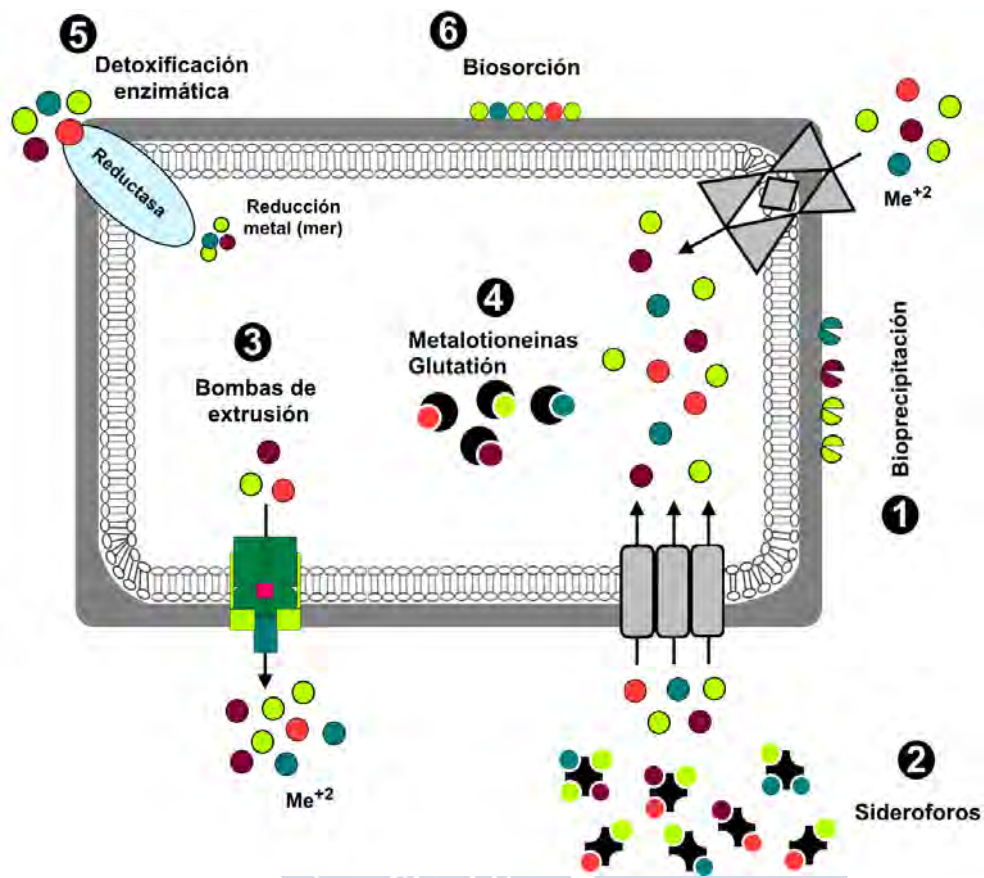


Figura 1.5: Mecanismos de resistencia a metal en bacterias. 1) Precipitación de metales en la membrana (Gram-negativas) o en la pared celular (Gram-positivas); 2) la presencia de sideróforos disminuye la biodisponibilidad del metal por complejación; 3) transportadores de eflujo que expulsan los metales acumulados en el citoplasma fuera de la célula; 4) síntesis de metalotioneínas o glutación que se unen a los metales con gran afinidad; 5) detoxificación enzimática debido a la producción de enzimas como las reductasas; 6) los metales se unen a los componentes de la membrana celular o de la pared celular y a sustancia polimérica extracelular secretada por la bacteria (Figura modificada de Taj et al. (2016)).

Abou-Shanab *et al.* (2007) analizaron la capacidad para resistir la presencia de elementos traza en el medio (Cd, Cr, Zn, As, Hg, Pb, Co, Cu, y Ni) de cuarenta y cinco bacterias aisladas de suelos naturalmente ricos en Ni y de la rizosfera de *Alyssum murale* creciendo en los mismos suelos recogidos en Oregón. Todos los aislados presentaron resistencia a más de un metal. En concreto cinco de ellos resultaron ser tolerantes a los 9 metales utilizados en este estudio, fue el caso de *Arthrobacter rhombi* AY509239, *Clavibacter xyli* AY509235, *Microbacterium*

arabinogalactanolyticum AY509226, *Rhizobium mongolense* AY509209 y *Variovorax paradoxus* AY512828. Este trabajo también incluyó el estudio de varios mecanismos genéticos responsables de la resistencia a metal en algunas de estas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, para lo cual utilizaron una combinación de PCR y secuenciación. En concreto se examinaron los operones *czc*, *chr*, *ncc* y *mer* que son responsables de la resistencia a Zn, Cr, Ni y Hg, respectivamente, en bacterias Gram-negativas. Los genes de resistencia a metal descritos en la bacteria Gram-positiva, *Microbacterium arabinogalactanolyticum* AY509226, tuvieron una gran homología con los genes *czcD*, *chrB*, *nccA* y *mer* de bacterias Gram-negativa, proporcionando evidencia de que estos genes están presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

1.5 Microorganismos y la rizosfera

El término “rizosfera” fue propuesto por Hiltner en 1904 para describir la porción de suelo inmediatamente en contacto con las raíces de plantas leguminosas que se caracterizan por una alta actividad microbiana. Esta región representa una interfaz suelo-raíz que se caracteriza por su alta dinámica y complejidad en cuanto a interacciones químicas, físicas y biológicas ocurriendo en esta zona (Lagos *et al.*, 2015). Generalmente, la rizosfera tiene un grosor de 1-2 mm, pero sus dimensiones pueden variar dependiendo de la masa y la arquitectura de las raíces de la planta (Egamberdieva *et al.*, 2011). La rizosfera presenta unas condiciones estables y favorables para el asentamiento de los microorganismos edáficos y su efecto no se restringe sólo a un aumento de la biomasa o de la actividad microbiana con respecto al suelo no rizosférico, sino que la rizosfera es un ambiente que actúa selectivamente sobre el crecimiento microbiano y por lo tanto sobre la abundancia relativa de determinados grupos (Germida *et al.*, 1998, Steer & Harris, 2000), de modo que, los procesos biogeoquímicos son diferentes a los que tienen lugar en el suelo no rizosférico o sin vegetación (Hinsinger *et al.*, 2005, Jones & Hinsinger, 2008). El “efecto rizosférico” se describe como el fenómeno en el que la biomasa y la actividad de los microorganismos es mayor en el suelo rizosférico que en el no rizosférico como resultado de la incorporación al

suelo de exudados y otros rizodepósitos (Sørensen, 1997, Raaijmakers *et al.*, 2009).

Varios factores bióticos y abióticos influyen en la estructura y diversidad funcional de las comunidades microbianas rizosféricas (Figura 1.6), por ejemplo, clima y estacionalidad, la presencia de animales, uso de pesticidas en los suelos, fertilizantes, estructura y tipo de suelo y la especie o incluso variedad de planta (Lemanceau *et al.*, 1995, Granér *et al.*, 2003, Garbeva *et al.*, 2004, Jousset *et al.*, 2006). Los diferentes tipos de suelo albergan comunidades microbianas específicas (Fierer *et al.*, 2005) y las plantas pueden seleccionar determinadas poblaciones mediante un proceso principalmente dirigido por los exudados radiculares (Bais *et al.*, 2006, Berg & Smalla, 2009, Hartmann *et al.*, 2009, Ryan *et al.*, 2009).

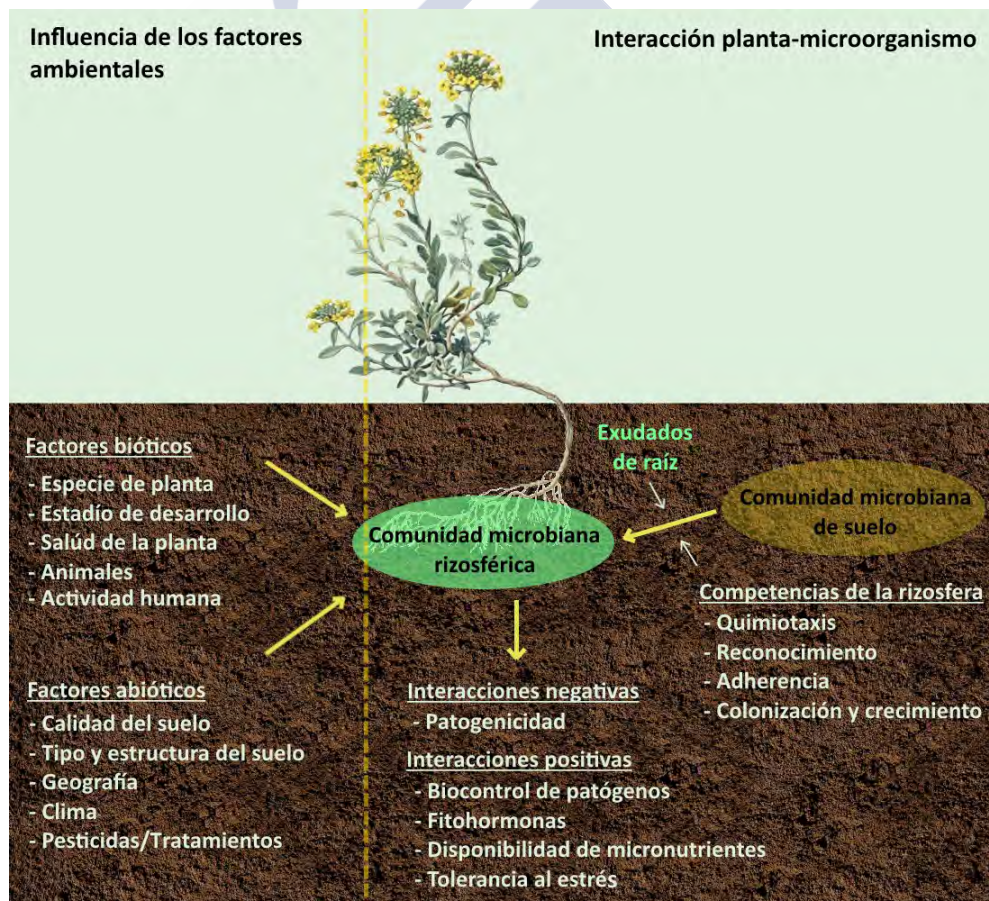


Figura 1.6: Factores que influyen en la comunidad microbianas rizosférica (modificada de (Berg & Smalla, 2009)).

Las raíces producen y excretan continuamente compuestos en la rizosfera (Berg & Smalla, 2009). Estos rizodepósitos pueden estimular o inhibir las poblaciones microbianas y sus actividades. Los rizodepósitos se pueden agrupar en cinco clases: exudados radiculares (aminoácidos, ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, azúcares y compuestos fenólicos), secreciones radiculares (ectoenzimas y carbohidratos poliméricos), mucilago (carbohidratos y residuos celulares), mucigel (carbohidratos y residuos celulares) y lisados de raíz (flavonoides, fenoles y residuos celulares) (Curl & Truelove, 1986, Lynch & Whipps, 1990). Los exudados radiculares son principalmente compuestos orgánicos solubles en agua liberados por las células radiculares en la solución nutritiva del suelo rizosférico y se agrupan en dos clases: 1) compuestos de bajo peso molecular, como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios; y 2) compuestos de alto peso molecular, tales como polisacáridos y proteínas (Bais *et al.*, 2006, Badri & Vivanco, 2009, Huang *et al.*, 2014). Estos exudados proporcionan una fuente lábil de carbono (y posiblemente de nitrógeno) para los microorganismos, ya que son sustancias fácilmente asimilables. Debido a la gran disponibilidad de sustratos carbonados presentes en la rizosfera, la actividad y densidad microbiana son generalmente mayores en la misma que en el suelo no rizosférico (Brimecombe *et al.*, 2001, Walker *et al.*, 2003, Bais *et al.*, 2006, Hartmann *et al.*, 2009). Las densidades microbianas en la rizosfera pueden ser hasta 1 o 2 veces mayores que en suelo no rizosférico, alcanzando densidades de 10^7 - 10^9 bacterias cultivables (UFC) g^{-1} de suelo rizosférico. Christensen *et al.*, (1999) concluyeron que la adición de glucosa en suelo no rizosférico para simular las condiciones de la rizosfera, aumentaba en un 5% la proporción de células activas detectadas. Benizri *et al.* (2007) añadieron mucilago derivado de la raíz al suelo no rizosférico para simular las condiciones de la rizosfera, en una cantidad que suponía un aumento del carbono disponible en suelo en un 23%. Al añadir el mucilago se incrementaba el número de bacterias cultivables en un 450% en comparación con el suelo control no enmendado (Benizri *et al.*, 2007).

Por otra parte, la abundancia y la composición química de los exudados radiculares varía dependiendo de la especie de planta, e incluso de la variedad dentro de la misma especie. También varía en función de la fase de desarrollo de

la planta y diversos factores ambientales, incluyendo el tipo de suelo, pH, temperatura y la presencia de microorganismos (Uren, 2000, Brimecombe *et al.*, 2001, Badri & Vivanco, 2009). Varios estudios sugieren que la diversidad de los microorganismos presentes en la rizosfera de las distintas plantas, y especialmente sus capacidades funcionales, pueden estar relacionadas con la variación en los rizodépósitos que producen y excretan (Grayston & Campbell, 1996, Grayston *et al.*, 1998, Baudoin *et al.*, 2002). Los exudados radiculares no solo influyen en la selección de microorganismos específicos en la rizosfera, sino que también en las funciones específicas de la comunidad como por ejemplo en la autoinducción o percepción de *quorum* (Gao *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2014). La percepción de *quorum* afecta la regulación de la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en la densidad de la población bacteriana. Las bacterias durante el proceso de autoinducción producen y liberan moléculas, señales químicas, llamadas autoinductores que aumentan en concentración según aumenta la densidad bacteriana. La detección de una concentración umbral mínima de autoinductores provoca una alteración en la expresión génica. La percepción de *quorum* se utiliza en distintas actividades como la producción de antibióticos, formación de biofilms, motilidad, simbiosis y virulencia (Miller & Bassler, 2001). Este mecanismo de regulación no sólo es importante dentro de una población bacteriana sino también entre las poblaciones bacterianas (Pierson & Pierson, 2007, Hosni *et al.*, 2011).

Varios estudios han demostrado que la comunidad microbiana original del suelo es un factor determinante en la comunidad microbiana rizosférica (Normander & Prosser, 2000, Garbeva *et al.*, 2008, Berg & Smalla, 2009, Lundberg *et al.*, 2012, Bakker *et al.*, 2013). Muchas de las bacterias del suelo no rizosférico colonizaran el suelo rizosférico atraídas por los exudados radiculares. El proceso de colonización de la rizosfera consiste en: reconocimiento, adhesión e invasión (sólo en endófitos y patógenos), colonización y crecimiento. Las raíces de las plantas inician una conversación cruzada con los microorganismos del suelo mediante la producción de señales que son reconocidas por los microorganismos, que a su vez producen señales que fomentan la colonización (Bais *et al.*, 2006). Otro factor importante que influye en la colonización de la rizosfera es la movilidad de las bacterias (De Weger *et al.*, 1987, Simons *et al.*, 1997, Dennis *et*

al., 2010). Las bacterias necesitan una fuente de energía para moverse, por lo tanto, la capacidad de colonización puede reducirse si disminuye la producción de ATP o si no existen apéndices móviles como flagelos (Dekkers *et al.*, 1998). Otro aspecto importante en la colonización de la rizosfera por parte de las bacterias es su tasa de crecimiento, que en parte depende de su capacidad para obtener componentes esenciales para el crecimiento o mantenimiento como son los aminoácidos, vitamina B1 y ácidos orgánicos (Dennis *et al.*, 2010).

A través de sus exudados radiculares las plantas son capaces de atraer a la rizosfera comunidades microbianas específicas como por ejemplo microorganismos beneficiosos como son las PGPR (de las que hablaremos más adelante) (Vessey, 2003), e incluso se ha demostrado que algunas especies de plantas pueden crear comunidades similares en suelos diferentes (Miethling *et al.*, 2000, Schreiter *et al.*, 2014). Hay microorganismos que únicamente pueden colonizar un solo tipo de planta como es el caso de *Rhizobium* y de muchos patógenos de plantas (Hartmann *et al.*, 2009). Por otro lado, algunas especies microbianas como *Pseudomonas* y *Trichoderma* se pueden encontrar de forma ubicua en casi todas las plantas (Hartmann *et al.*, 2009). Por todo ello, la composición de las comunidades microbianas es distinta en el suelo rizosférico con respecto al suelo no rizosférico y no vegetado. En varios estudios se demostró la influencia de las plantas en las comunidades microbianas de la rizosfera, utilizando métodos dependientes de cultivo (Glandorf *et al.*, 1993, Lemanceau *et al.*, 1995, Germida *et al.*, 1998, Grayston *et al.*, 1998, Germida & Siciliano, 2001) y más recientemente con métodos moleculares independientes de cultivo empleados en numerosos estudios (Steer & Harris, 2000, Smalla *et al.*, 2001, Kuske *et al.*, 2002, Milling *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2006, DeAngelis *et al.*, 2008, Haichar *et al.*, 2008, Hartmann *et al.*, 2009, Dias *et al.*, 2012, Touceda-González *et al.*, 2015). Utilizando métodos tradicionales de cultivo, Lemanceau *et al.* (1995) estudiaron como afectaba la presencia de plantas de lino y de tomate a la diversidad de *Pseudomonas* en la rizosfera, y observaron que estas plantas afectaban de distinta manera a la población *Pseudomonas*; además, comprobaron que ambas especies vegetales ejercían presión selectiva sobre la comunidad bacteriana edáfica de modo que la comunidad rizosférica se diferenciaba significativamente de la del suelo no vegetado. Glandorf *et al.* (1993) obtuvieron

resultados similares estudiando la diversidad de *Pseudomonas* en la rizosfera de patata, trigo y raigrás. Utilizando técnicas moleculares independientes de cultivo, Smalla *et al.* (2001) hicieron un seguimiento durante dos años de las comunidades bacterianas de la rizosfera de tres especies vegetales de alto valor agrícola como son la fresa, la colza y la patata, utilizando electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) de fragmentos de ADNr 16S. Estos autores observaron comunidades bacterianas rizosféricas características de cada especie y encontraron que las diferencias eran más pronunciadas en el segundo año de cultivo. También llegaron a observar efectos estacionales en la abundancia y composición en las poblaciones bacterianas rizosféricas. En otro estudio, llevado a cabo por Haichar *et al.* (2008), se demostró que las raíces de trigo, maíz, colza y trébol presentaban una comunidad bacteriana rizosférica específica debido a las diferencias en los exudados radiculares de cada especie. En la rizosfera del maíz se encontró benzoxacinone, un insecticida natural exudado por las raíces, que inducía mayores densidades de una cepa de *Pseudomonas putida* en la rizosfera. Dicha bacteria es conocida por aportar efectos beneficiosos a las plantas (Neal *et al.*, 2012). İnceoğlu *et al.* (2013) demostraron que el estado de desarrollo de la planta afecta la estructura de la comunidad bacteriana rizosférica. DeAngelis *et al.* (2008) descubrieron que la mayoría de las especies bacterianas encontradas en el suelo rizosférico de *Avena fatua* pertenecían a los Fila *Firmicutes* o *Actinobacteria* o a la clase *Alfaproteobacteria*. Muchos estudios independientes han señalado que algunos miembros del Filo *Proteobacteria* (por ejemplo, bacterias de las familias *Burkholderiaceae* y *Pseudomonadeceae*) como miembros dominantes de las comunidades bacterianas rizosféricas (Gomes *et al.*, 2001, DeAngelis *et al.*, 2008, Uroz *et al.*, 2010, Peiffer *et al.*, 2013). Esto concuerda con que en el Filo *Proteobacteria* generalmente incluye bacterias de crecimiento rápido, estrategias de la r, con la capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos de carbono exudados por la raíz (Philippot *et al.*, 2013). Además de las bacterias, los hongos también constituyen un componente muy importante de la microbiota rizosférica y estos también se ven afectados por la especie de planta y la etapa de desarrollo de la misma (Wang *et al.*, 2008, Hannula *et al.*, 2010, Turner *et al.*, 2013) aunque en esta introducción se presta atención fundamentalmente a la comunidad bacteriana.

Las propiedades físico-químicas de los suelos afectan la fisiología de las

plantas y el patrón de exudación de las raíces, esto a su vez influye en la composición de la microbiota de la rizosfera (Berg & Smalla, 2009, Bulgarelli *et al.*, 2012, Lundberg *et al.*, 2012). Del mismo modo, las plantas pueden inducir cambios en las propiedades del suelo rizosférico (Marschner *et al.*, 1986, Lombi *et al.*, 2001, Puschenreiter *et al.*, 2005), modificando el comportamiento de nutrientes y elementos traza mediante acidificación, quelación, precipitación o reacciones de oxidación-reducción (Hinsinger *et al.*, 2005, Jing *et al.*, 2007). Por otra parte, los microorganismos que colonizan la rizosfera también van a influir cualitativa y cuantitativamente en la exudación radicular (Leyval & Berthelin, 1993, Jones *et al.*, 2004, Matilla *et al.*, 2010). Jones *et al.* (2004) demostraron que la colonización de hongos micorrízicos arbusculares influyeron cualitativamente en los exudados radiculares liberados por la planta, aumentando las secreciones de N, fenoles y giberelinas y reduciendo las secreciones de azúcares totales, y de iones de potasio y fósforo. Los microorganismos presentes en la rizosfera también pueden afectar en el crecimiento, la nutrición y la salud de las plantas (Bonfante & Anca, 2009, Berendsen *et al.*, 2012, Philippot *et al.*, 2013) y pueden influir directamente o indirectamente en la composición y crecimiento de las comunidades vegetales en ecosistemas naturales (Kardol *et al.*, 2007, Schnitzer *et al.*, 2011).

Algunos microorganismos rizosféricos son perjudiciales para las plantas a las que están asociados ya que compiten con ellas por los nutrientes y en ocasiones puedan llegar a causarles enfermedades. Por el contrario, una amplia gama de bacterias tienen un efecto beneficioso sobre las plantas (Vessey, 2003, Compant *et al.*, 2010). Según Brimecombe *et al.* (2001) estas bacterias beneficiosas pueden dividirse en tres categorías:

- Microorganismos que en asociación con la planta pueden abastecerla de nutrientes minerales, como es el caso de la fijación de nitrógeno por parte de *Rhizobium* o microorganismos asociados a la descomposición de residuos orgánicos y al proceso de mineralización/inmovilización.
- Microorganismos que estimulan el crecimiento de la planta indirectamente produciendo antibióticos, compuestos volátiles o enzimas hidrolíticas, impidiendo el crecimiento y/o actividad de patógenos. Estas bacterias se utilizan como agentes de biocontrol.

- Microorganismos que estimulan el crecimiento de la planta de forma directa (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB y Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR) como por ejemplo mediante la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, control de los niveles de etileno (compuestos que participan en la regulación del estrés), etc.

Las PGPR son uno de los grupos bacterianos más importantes y más ampliamente estudiados en cuanto a sus efectos beneficiosos para las plantas. Este grupo incluye especies bacterianas pertenecientes de géneros como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* entre otras (Bhattacharyya & Jha, 2012, Deka *et al.*, 2015). Las PGPB pueden influir en el crecimiento de la planta y su fisiología mediante métodos directos o indirectos. Métodos directos son la producción de compuestos que favorecen el crecimiento vegetal o fitohormonas, fijación de N₂ atmosférico, liberación de nutrientes para las plantas, o supresión de los niveles de etileno ante situaciones de estrés. El ácido indolacético (IAA) producido por las bacterias estimula la formación de pelos radiculares y también induce un aumento en el número y longitud de raíces laterales y primarias, siempre cuando esta fitohormona se encuentre a su concentración ideal (Duca *et al.*, 2014). Las PGPB pueden aumentar la disponibilidad de nutrientes esenciales, tales como N, P o Fe, mejorando la nutrición de las plantas en suelos deficientes. Por ejemplo, las bacterias diazotrófas pueden fijar N atmosféricos a amoníaco utilizando la enzima nitrogenasa, y este amoníaco será utilizado por las plantas en la nutrición de las mismas (Beattie, 2006). Muchas bacterias pueden convertir los fosfatos insolubles en formas de P disponibles para las plantas, mediante la producción de ácidos orgánicos o fosfatasas, mejorando así el crecimiento y la nutrición de las mismas (Leyval & Berthelin, 1989, Richardson, 2001, Richardson & Simpson, 2011). Generalmente, el hierro se encuentra en el suelo en su forma insoluble, Fe⁺³. Algunas bacterias pueden liberar compuestos quelantes de Fe, llamados sideróforos, cuando la concentración de Fe en el medio es baja (Schwyn & Neilands, 1987, Crowley, 2006). Estos pueden movilizar el Fe desde la fase sólida o extraer el Fe de los complejos organometálicos (Crowley, 2006). Cuando el estrés aumenta, las plantas producen altos niveles de etileno y este inhibe la elongación de la raíz. Algunas bacterias pueden producir ácido 1-

aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) una enzima que puede suprimir la producción de etileno por parte de las plantas y reducir el estrés de las mismas. El ACC es una fitohormona que también juega un papel importante en la iniciación, elongación, nodulación, senescencia, abscisión y maduración de la raíz. Las bacterias productoras de ACC desaminasa pueden beneficiarse del ACC como fuente de N y las plantas muestran una mayor elongación de la raíz debido a la reducción de etileno en su interior (Dell'Amico *et al.*, 2005, Glick, 2014). Recientemente se descubrió que la producción de compuestos volátiles por parte de las bacterias puede ser beneficiosa para las plantas (Ryu *et al.*, 2003). Blom *et al.* (2011) estudiaron los efectos de los compuestos volátiles producidos por 42 cepas bacterianas en *Arabidopsis thaliana*. Encontraron más de 130 compuestos volátiles bacterianos diferentes, que causan efectos positivos y negativos en el crecimiento de las plantas. Indirectamente las bacterias pueden inhibir o reducir enfermedades en las plantas y nos referimos a estas bacterias como agentes de biocontrol. Estas bacterias protegen a las plantas indirectamente al competir por nutrientes y espacio, producir compuestos antimicrobianos o al inducir mecanismos de defensa de la planta (Compant *et al.*, 2005, Podile & Kishore, 2006). Por otro lado, algunas bacterias pueden estimular mecanismos de defensa en la planta sin causar síntomas de estrés en la misma, este fenómeno se conoce como resistencia sistémica inducida (RSI) y algunos de los compuestos que pueden inducir resistencias son los lipopolisacáridos, los sideróforos, ácido salicílico y otras macromoléculas (Van Loon *et al.*, 1998).

1.5.1 Comunidades microbianas rizosféricas de plantas hiperacumuladoras y (pseudo)metalófitas.

A finales de los años 90 y principio de los 2000, varios estudios sugirieron que la acumulación de elementos traza por las plantas (hiper)acumuladoras estaba influenciada por su microbioma rizosférico (Delorme *et al.*, 2001, Mengoni *et al.*, 2001, Whiting *et al.*, 2001, Lodewyckx *et al.*, 2002, Abou-Shanab *et al.*, 2003). De Souza *et al.* (1999) compararon sistemas estériles y sistemas no estériles mostrando que las plantas acumuladoras de selenio sólo alcanzaron su capacidad máxima de acumulación cuando los microorganismos indígenas de la rizosfera

estaban presentes. Un gran número de estudios indicaron que la microbiota rizosférica juega un papel importante en el proceso de fitoextracción de metales (Lebeau *et al.*, 2008, Kidd *et al.*, 2009, Glick, 2010, Becerra-Castro *et al.*, 2013, Sessitsch *et al.*, 2013, Glick, 2014, Muehe *et al.*, 2015). Por otra parte, en muchos estudios se encontró una mayor abundancia de bacterias tolerantes en la rizosfera de plantas hiperacumuladoras (Schlegel *et al.*, 1991, Delorme *et al.*, 2001, Mengoni *et al.*, 2001, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Álvarez-López, 2016).

La estructura y diversidad de las comunidades microbianas de la rizosfera de algunas especies vegetales (especialmente de plantas con un gran valor económico y/o alimenticio) han sido analizadas empleando distintas metodologías para caracterizar la interacción entre microorganismos y plantas (Sørensen *et al.*, 2009, Visioli *et al.*, 2015). En el caso de las plantas hiperacumuladoras de metales se han investigado menos del 10% de las especies (Alford *et al.*, 2010). Las técnicas utilizadas para el estudio de las bacterias en la rizosfera de plantas hiperacumuladoras se basa principalmente en técnicas tradicionales dependientes de cultivo (Lodewyckx *et al.*, 2002, Abou-Shanab *et al.*, 2003, Idris *et al.*, 2004, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Abou-Shanab *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2010, Becerra-Castro *et al.*, 2011, Jing *et al.*, 2014, Álvarez-López *et al.*, 2016). En la mayoría de estos estudios la atención se centró en el aislamiento de cepas que muestran resistencia a Ni. Los aislados obtenidos se clasifican en 3 Fila principales: *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* y pertenecen sobre todo a géneros de bacterias Gram-positivas como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* y *Curtobacterium* y géneros de Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Variovorax* (Visioli *et al.*, 2015). Entre los estudios que identificaron un mayor número de aislados cabe mencionar el trabajo de Abou-shanab *et al.* (2010) en el que identificaron cerca de 200 aislados resistentes a Ni más abundantes en la rizosfera de *Alyssum murale* que en suelo no rizosférico (Abou-Shanab *et al.*, 2003). Las cepas rizosféricas de este estudio se clasificaron en su mayoría como *Actinobacteria*, en géneros como *Microbacterium*, *Arthrobacter* y *Clavibacter*, *Proteobacteria*, entre las que fueron muy abundantes las cepas de rizobios (*Alfaproteobacteria*) (Abou-Shanab *et al.*, 2010). Mengoni *et al.* (2001) identificaron un número importante de cepas resistentes a Ni de suelo no rizosférico y de la rizosfera de *A. bertoloni* de 3 afloramientos ultramáficos de

Italia y encontraron predominio de cepas de *Pseudomonas* sp. entre los aislados de la rizosfera de esta hiperacumuladora. Por otra parte, en la rizosfera de una población austríaca de la hiperacumuladora de Ni, *Noccaea goesingensis*, se encontró que los aislados resistentes a Ni se clasificaban mayoritariamente como *Methylobacterium* (*Alfaproteobacteria*), o como *Rhodococcus* spp. y *Okibacterium* spp. (*Actinobacteria*) (Idris *et al.*, 2004). Por su parte, Becerra-Castro *et al.* (2009) analizaron cepas, con actividad sobre la movilidad de Ni, aisladas de la rizosfera de subspecies hiperacumuladoras de *A. serpyllifolium* de tres afloramientos ultramáficos de la Península Ibérica. Estos autores concluyeron que, la mayoría de los aislados, independientemente de su capacidad potencial para movilizar o inmovilizar Ni, pertenecían a géneros de *Actinobacteria* como *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus* o *Streptomyces*, aunque observaron que las cepas de *Arthrobacter* con actividad movilizadora de Ni se situaban filogenéticamente separadas de las que tenían actividad inmovilizadora. En un estudio posterior del mismo grupo, Álvarez-López *et al.* (2016) también observaron que la comunidad bacteriana cultivable asociada a la rizosfera de estas hiperacumuladoras de Ni estuvo dominada por miembros del Filo *Actinobacteria*. Los aislados obtenidos en este estudio pertenecían mayoritariamente a los géneros *Arthrobacter*, *Amycolatopsis* y *Streptomyces*. En la rizosfera de hiperacumuladoras de Ni de los géneros *Rinorea* y *Dichapetalum* desarrolladas en suelos ultramáficos de India. Pal *et al.* (2007) obtuvieron un centenar de aislados bacterianos que, en su mayoría se clasificaban como Gram-negativos de los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (*Gammaproteobacteria*), *Alcaligenes* (*Betaproteobacteria*) o *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*) o Gram-positivos del género *Bacillus* (*Firmicutes*) o *Streptomyces* (*Actinobacteria*). Entre estos aislados observaron que los que se clasificaban como *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*), *Cupriavidus* (*Betaproteobacteria*) o *Bacillus* (*Firmicutes*), mostraban mayor tolerancia a Ni. Turgay *et al.* (2012) recogieron muestras de 191 suelos y 431 plantas en diferentes regiones serpentínicas del oeste de Turquía, de estas 431 plantas 8 de ellas mostraron características típicas de plantas hiperacumuladoras y de estas 8 solo 2, *Isatis pinnatiloba* y *Alyssum dasycarpum* (ambas de la familia *Brassicaceae*), fueron capaces de crecer en invernadero en suelos ultramáficos. Posteriormente aislaron 22 bacterias de los

suelos no rizosféricos ultramáficos y rizosféricos de estas dos hiperacumuladoras, de las cuales 11 eran características de la rizosfera. Estas rizobacterias se identificaron mayoritariamente como *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Kocuria*. Lodewyckx *et al.* (2002) estudiaron las poblaciones bacterianas de la hiperacumuladora de Zn, *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*, desarrolladas sobre suelos de mina ricos en Zn y Pb en el este de Bélgica. En el suelo no rizosférico encontraron bacterias que generalmente se encuentran en otros suelos como, *Arthrobacter* y *Acidovorax*, pero curiosamente no se encontraron cepas de estos géneros en las probaciones bacterianas de la raíz y la parte aérea de *T. caerulescens*. Las bacterias que sí resultaron ser abundantes en la rizosfera de la hiperacumuladora de Zn son *Afipia* sp. y *Rhodococcus* sp. En dos suelos contaminados con As del norte-centro de Florida y en la rizosfera de la hiperacumuladora de As *Pteris vittata* desarrollada sobre esos mismos suelos, Huang *et al.* (2010) identificaron un número importante de cepas resistentes a As, siendo estas más abundantes en el suelo rizosférico que en el no rizosférico. En concreto 12 de estas cepas fueron capaces de resistir concentraciones inusualmente altas de As y el 40% de las mismas se relacionaron con *Pseudomonas* sp. Jing *et al.* analizaron cepas, con capacidad para tolerar y solubilizar metales traza (Cd, Pb y Zn), aisladas de la rizosfera de la planta hiperacumuladora de Mn *Polygonum pubescens* de suelos con contaminación múltiple recogidos en Guangzhou, China. Estos autores trabajaron con seis cepas fueron aisladas del suelo rizosférico y dos de ellas se identificaron como *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp., tenían capacidad para tolerar y solubilizar Cd, Pb y Zn. Se inocularon estas dos cepas posteriormente en *Brassica napus* y provocaron un mayor crecimiento de la planta y aumentó la acumulación de Cd, Pb y Zn en las raíces y en la parte aérea. Muchos autores indican que las bacterias resistentes a metal, como las aisladas en estos trabajos, podrán ser utilizadas para inocular plantas hiperacumuladoras o metalófitas para optimizar su crecimiento y/o capacidad de extracción de metal en procesos de fitoestabilización y fitoextracción (Kuffner *et al.*, 2010, Sessitsch *et al.*, 2013, Cabello-Conejo *et al.*, 2014).

Para revelar la diversidad, la estructura, funciones y dinámica de comunidades microbianas sin necesidad de cultivar se han utilizado métodos

independientes de cultivo, basados en el aislamiento y análisis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos directamente extraídos de las muestras ambientales (Kirk *et al.*, 2004, van Elsas & Boersma, 2011). Hasta el momento existen pocos trabajos en los que se empleen estos métodos para estudiar comunidades bacterianas asociadas a plantas hiperacumuladoras (Gremion *et al.*, 2003, Idris *et al.*, 2004, Mengoni *et al.*, 2004, Muehe *et al.*, 2015). Los trabajos publicados que investigan las comunidades bacterianas asociadas a plantas hiperacumuladoras utilizando este tipo de metodología observaron que los Filos que se han detectado mayoritariamente son *Proteobacteria* (*Alfa-* y *Gammaproteobacteria*), *Firmicutes*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* (Gremion *et al.*, 2003, Gremion *et al.*, 2004, Idris *et al.*, 2004, Mengoni *et al.*, 2004). Mengoni *et al.* (2004) utilizando la técnica T-RFLP (del inglés Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) para analizar muestras de suelo a distinta distancia de la raíz de la hiperacumuladora *Alyssum bertolonii* en tres áreas serpentínicas diferentes, encontraron fragmentos TRF presentes en todas las muestras de rizosfera estudiadas. El análisis de estos TRFs indicó que los fragmentos característicos de la rizosfera se clasificaban principalmente como *Alfaproteobacteria*. Estos mismos autores utilizaron análisis dependiente de cultivo de los mismos suelos ultramáficos y mostraron dominio del género *Pseudomonas* (*Proteobacteria*) (Mengoni *et al.*, 2001). Idris *et al.* (2004) utilizando T-RFLP's también encontraron un alto porcentaje de proteobacterias en la rizosfera de la hiperacumuladora de Ni, *Noccaea goesingensis*. Además, observaron que la comunidad de la rizosfera de *N. goesingensis* también alberga miembros del Filo *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* y bacterias Gram-positivas con alto contenido en GC (Idris *et al.*, 2004). Gremion *et al.* (2003) construyeron librerías de clones a partir de ARNr 16S y el ADNr 16S con el fin de caracterizar la diversidad bacteriana rizosférica de la hiperacumuladora de Cd y Zn, *Noccaea caerulescens*, desarrollada en un suelo contaminado con Zn, Cd y Cu. Los resultados indicaron un predominio, en la librería de clones del suelo rizosférico, de miembros del Filo *Actinobacteria* y de los órdenes *Planctomycetales* y *Verrucomicrobiales*. También cabe resaltar que solo se encontraron filotipos afiliados con miembros de *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) y OP10 en las librerías de clones (ADNr) del suelo rizosférico. En cuanto a la población metabólicamente activa

observaron que miembros del Filo *Actinobacteria*, concretamente de la subclase *Rubrobacteria*, son altamente dominante tanto en el suelo rizosférico de *N. caerulea* como en el no rizosférico. Gomez-Balderas *et al.* (2014) utilizando RLFP estudiaron la composición de la comunidad bacteriana en muestras de suelo a distinta distancia de la raíz (rizoplano, rizosfera y suelo no rizosférico) de la hiperacumuladora *Arabidopsis halleri* en un área altamente contaminada con Cd y Zn en Francia y encontraron que los miembros de clases como *Alfa* y *Gammaproteobacteria* son menos abundantes cerca de la raíz de la hiperacumuladora. También, estos datos permiten descubrir que los géneros que más se relacionaron con la rizosfera y el rizoplano en este estudio fueron *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacteria*, *Buttiauxella* y *Flavobacteria*. Utilizando secuenciación 454, Muehe *et al.* (2015) estudiaron las comunidades bacterianas rizosféricas de la hiperacumuladora de Cd y Zn, *Arabidopsis halleri*, en suelos contaminados con Cd de Lagelsheim en los Montes Harz en Alemania. Por una parte, estudiaron el suelo rizosférico sin tratar y por otra, el mismo suelo irradiado con rayos gamma encontrando que las OTU (del inglés “Operational Taxonomic Unit”) más abundantes en ambos suelos fueron “*Candidatus Chloracidobacterium*”, *Nitrospira*, *Acidovorax*, *Gemmatimonas* y “*Candidatus Solibacter*”, mientras que al analizar solo las OTUs del suelo no tratado, serían más abundantes *Lysobacter*, *Streptomyces*, *Nocardioideis*, *Kineosporia* y *Steroidobacter*. Estos autores concluyeron que los miembros de estos géneros probablemente juegan un papel en la absorción de metal.

La flora de suelos con altas concentraciones de metales también incluye especies vegetales denominadas metalófitas que se definen como aquellas plantas que poseen mecanismos que les permite sobrevivir en suelos con altos contenidos con elementos traza (Alford *et al.*, 2010), así como especies pseudometalófitas que son aquellas capaces de sobrevivir en estos suelos, pero que también pueden ser encontradas en suelos deficientes en metal (Whiting *et al.*, 2004). En suelos ultramáficos se llevó a cabo el estudio de aislados de la rizosfera de plantas pseudometalófitas comúnmente desarrolladas en estas áreas como son la poácea, *Dactylis glomerata* una exclusora de metal y la Asterácea, *Santolina semidentata* una serpentinófila facultativa. (Becerra-Castro *et al.*, 2009, Becerra-Castro *et al.*, 2011, Álvarez-López *et al.*, 2016). Becerra-Castro *et al.* (2009) estudiaron la

comunidad bacteriana cultivable de la rizosfera de la planta exclusiva *D. glomerata* y la compararon con las comunidades de las hiperacumuladoras de Ni *Alyssum pintodasilvae*, en el norte de Portugal y Noroeste de España, y *Alyssum malacitanum* en el sur de España. En este estudio hallaron que las densidades bacterianas totales fueron mayores en el suelo rizosférico de las hiperacumuladoras de Portugal que en la rizosfera de la exclusiva y también encontraron un enriquecimiento en bacterias tolerantes a Ni mayor en la rizosfera de las hiperacumuladoras de Portugal que en la rizosfera de la planta exclusiva. Estos resultados fueron corroborados en un trabajo de Álvarez-López *et al.* (2016) que encontraron que las subespecies de *Alyssum* hiperacumuladoras de Ni tienen una mayor densidad bacteriana que las plantas no hiperacumuladoras, *Dactylis* y *Santolina*. Además, en la mayoría de los casos las plantas no hiperacumuladoras no presentaron un enriquecimiento que se detecte en bacterias tolerantes a Ni, como si lo presentan las plantas hiperacumuladoras. Adicionalmente, Álvarez-López *et al.* (2016) hicieron una caracterización genotípica de las bacterias aisladas en el suelo rizosférico de las plantas hiperacumuladoras de Ni de las áreas serpentínicas de España y Portugal, *A. malacitanum* y *A. pintodasilvae*, y de las no hiperacumuladoras *D. glomerata* (exclusiva) y *S. semidentata* (serpentinófila). Se identificaron un total de 329 aislados y se vio que en las hiperacumuladoras de Ni la diversidad fue mayor que en las otras especies. Así en la comunidad rizosférica cultivable de *Alyssum* estuvieron representados 19 géneros, mientras que las comunidades de *D. glomerata* y *S. semidentata*, se detectaron cepas de 10 y 6 géneros, respectivamente. Algunos géneros solo se observaron en la colección de la rizosfera de las plantas hiperacumuladoras, como es el caso de *Stenotrophomonas* (*Gammaproteobacteria*), *Methylobacterium* (*Alphaproteobacteria*), *Staphylococcus* (*Firmicutes*), *Amycolatopsis* y *Mycobacterium* (*Actinobacteria*) y miembros del Filo *Bacteroidetes* (representados exclusivamente por los géneros *Olivibacter* y *Chitinophaga*). Por el contrario, miembros de los géneros *Janibacter* (*Actinobacteria*) y *Mesorhizobium* y *Aminobacter* (*Alphaproteobacteria*) se encontraron únicamente en la rizosfera de *D. glomerata* (en las plantas del norte de España) y miembros del género *Enterobacter* (*Gammaproteobacteria*) se observaron únicamente en la rizosfera de *S. semidentata*. Otros géneros como *Arthrobacter*, *Streptomyces* y *Rhodococcus*

(*Actinobacteria*) se detectaron en todos los suelos rizosféricos estudiados en este trabajo. Además, miembros de dos de estos géneros anteriores, *Arthrobacter* y *Streptomyces*, fueron predominantes entre los aislados de rizosfera de *D. glomerata* y *S. semidentata*.

Existen otros estudios que analizaron la comunidad asociada a plantas desarrolladas en suelos con altos contenidos en elementos traza de origen antrópico. Así, se observó que las comunidades bacterianas cultivable rizosférica asociada a tres plantas pseudometalófitas (*Betula celtiberica*, *Cytisus scoparius* and *Festuca rubra*) creciendo en una escombrera altamente contaminada con Pb, Zn y Cd estaban dominadas por miembros del Filo *Actinobacteria* (Becerra-Castro *et al.*, 2012). Hanbo *et al.* (2004) describieron que un 90 % de las bacterias aisladas en suelos de mina de Pb y Zn estaban afiliadas a género *Arthrobacter* (*Actinobacteria*). Pereira *et al.* (2015) estudiaron las comunidades bacterianas rizosféricas asociadas con las dos especies de humedal (*Phragmites australis* y *Juncus effusus*) afectados por la contaminación con residuos sólidos y aguas residuales de un gran complejo químico industrial y contaminado por metales (Zn, Pb, Hg) y metaloides (As). El análisis filogenético indicó que las cepas bacterianas aisladas de los puntos más contaminados se relacionaban principalmente con las clases *Actinobacteria* (36%), *Bacilli* (24%), *Betaproteobacteria* (20%) y *Gammaproteobacteria* (12%), y una pequeña fracción asociada a las clases *Alphaproteobacteria* (6%) y *Sphingobacteria* (6%). Montalbán *et al.* (2016) estudiaron la comunidad bacteriana cultivable asociada a *Brassica napus*, cultivada en un área agrícola contaminada con Zn debido a las emisiones de una planta metalúrgica y encontraron que la diversidad de las poblaciones bacterianas aisladas fue similar en las raíces y la rizosfera, y menor en suelo no rizosférico y el tallo. Utilizando métodos independientes de cultivo, Zhang *et al.* (2012) y He *et al.* (2010) observaron una gran abundancia de *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria* respectivamente, en la rizosfera de *Chenopodium ambrosioides*, planta que crece en suelos de mina de Pb y en la rizosfera de once plantas pseudometalófitas resistentes a Cu desarrolladas en suelos de mina ricos en este metal. En la rizosfera de la planta tolerante a Cu, *Elsholtzia splendens*, desarrollada en suelos contaminados con Cu en China Jiang *et al.* (2016), utilizando pirosecuenciación, encontraron que la comunidad bacteriana rizosférica estaba constituida por (en

orden de abundancia decreciente) miembros de los Fila *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* y TM7. Además, estos investigadores descubrieron que la abundancia relativa de *Proteobacteria* aumentaba al incrementar la concentración de Cu total y Cu disponible.

Aunque en la mayoría de estudios no se encuentran diferencias muy marcadas en los taxones detectados en la rizosfera de plantas hiperacumuladoras y no hiperacumuladoras resistentes a metal, sí que existen estudios en los que se ven diferencias significativas en las características de las comunidades fenotípicas. En distintos estudios realizados en los últimos años se ha demostrado que las plantas hiperacumuladoras como *Alyssum bertolonii*, *Alyssum serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*, *Alyssum serpyllifolium* subsp. *malacitanum*, *Sebertia acuminata* o *Noccaea caerulescens* subsp. *calaminaria*, albergan en la rizosfera una mayor densidad de bacterias resistentes a metal (Cd, Ni o Zn) que plantas no hiperacumuladoras o suelos no vegetados (Schlegel *et al.*, 1991, Delorme *et al.*, 2001, Mengoni *et al.*, 2001, Lodewyckx *et al.*, 2002, Becerra-Castro *et al.*, 2009, Álvarez-López *et al.*, 2016). Schlegel *et al.* (1991) encontraron una mayor proporción de bacterias resistentes a Ni en la proximidad de la hiperacumuladora de Ni *Sebertia acuminata* que en zonas más alejadas. Mengoni *et al.* (2001) también encontraron una mayor proporción de bacterias resistentes a Ni en la rizosfera de *A. bertolonii* que en el suelo no vegetado. Estos autores también observaron co-resistencia a un conjunto de metales y una alta resistencia en las bacterias aisladas de la rizosfera. *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* y *A. serpyllifolium* subsp. *malacitanum* también presentan proporciones más altas de bacterias tolerantes a Ni en la rizosfera que en el suelo no vegetado o en la rizosfera de plantas no acumuladoras (Becerra-Castro *et al.*, 2009, Álvarez-López *et al.*, 2016). Este enriquecimiento en bacterias tolerantes a Ni en la rizosfera de las hiperacumuladoras de Ni se ha correlacionado con un aumento de la fracción disponible de Ni en el suelo rizosférico (Becerra-Castro *et al.*, 2009, Álvarez-López *et al.*, 2016). Asimismo, en la rizosfera de la hiperacumuladora de Zn, *Noccaea caerulescens*, también se encontró una mayor fracción de bacterias resistentes a Zn que en suelo no rizosférico (Lodewyckx *et al.*, 2002, Abouddrar *et al.*, 2007).

En plantas metalófitas se observaron resultados similares, por ejemplo, Kunito *et al.* (2001) compararon la comunidad bacteriana rizosférica de la planta metalófito no hiperacumuladora, *Phragmites*, con la del suelo no rizosférico en una zona altamente contaminada con Cu y encontraron que en su rizosfera se detectaba mayor densidad de bacterias que en el suelo no rizosférico. Estos autores atribuyeron este resultado a las concentraciones de Cu inferiores o a la disponibilidad de exudados de la raíz. A su vez, el porcentaje de cepas resistentes a Cu fue mayor en la rizosfera que en suelo no rizosfera. En este estudio también demostraron que la comunidad bacteriana rizosférica asociada a plantas metalófito estaba enriquecida en bacterias estrategas de la r que crecen y utilizan los recursos rápidamente (Kozdrój, 1995).

Hay otros estudios en los que se analiza la funcionalidad u otras características generales de las comunidades de la rizosfera de las plantas hiperacumuladoras (Aboudrar *et al.*, 2007, Álvarez-López *et al.*, 2016). Aboudrar *et al.* (2007) encontraron que en la rizosfera de la hiperacumuladora de Ni, *Thlaspi caerulescens*, hay un mayor número de bacterias con capacidad para oxidar ácidos carboxílicos y aminoácidos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

1.6 Técnicas de remediación de suelos contaminados de bajo impacto

El suelo es un sistema muy complejo con una velocidad de formación extremadamente lenta, por lo que se considera un recurso no renovable, que desempeña funciones esenciales para la vida en el planeta. El suelo actúa como soporte y hábitat de numerosos organismos vivos y juega un papel fundamental en procesos esenciales como los ciclos del agua y de nutrientes, la filtración y depuración de muchas sustancias, como almacén y sumidero de carbono, etc. (Lorenz, 2013). La contaminación del suelo altera la calidad y las funciones del mismo, por lo que se pueden ver afectadas negativamente la calidad del agua, la biodiversidad, la seguridad alimentaria y/o la salud humana. La Unión Europea (UE), en su estrategia temática para la protección del suelo (Thematic Strategy for Soil Protection), considera la contaminación del suelo como una de las principales causas de degradación del mismo (COM, 2002).

El tratamiento de suelos contaminados puede abordarse empleando distintas técnicas, que se clasifican a menudo en tratamientos *in situ* y *ex situ*. Los métodos *ex situ* se caracterizan porque el suelo contaminado es extraído o excavado y tratado fuera del sitio y generalmente se aplican en áreas donde el suelo está fuertemente contaminado. Son técnicas de aplicación rápida; sin embargo, son altamente invasivas, tienden a generar una importante cantidad de residuos sólidos y es necesario almacenar y controlar los residuos extraídos (Wuana & Okieimen, 2011). Por el contrario, las técnicas *in situ* están diseñadas para extraer o estabilizar los contaminantes en el suelo en el lugar de origen, sin necesidad de excavación o remoción de suelo. Las ventajas de estas técnicas son su baja invasividad, generación de pocos residuos, su bajo coste y facilidad para establecerlas (Wuana & Okieimen, 2011). Por otra parte, el proceso de recuperación se aplica sólo a la capa superficial del suelo (Lenart-Boroń & Boroń, 2014).

Dentro de las técnicas *in situ* disponibles, se encuentran las tecnologías verdes (“Gentle soil Remediation Options” (GRO) en inglés), que incluyen opciones basadas en el uso de plantas y sus microorganismos asociados para el tratamiento de contaminantes *in situ* (Fitocorrección). Estas técnicas se benefician de la capacidad natural de las plantas para transformar, extraer, volatilizar o estabilizar los contaminantes y pueden llegar a restaurar las funciones y estructura del suelo (Cunningham & Ow, 1996, Salt *et al.*, 1998, Wenzel *et al.*, 1999, McGrath & Zhao, 2003, Pilon-Smits, 2005), además están consideradas como opciones rentables y menos invasivas que las técnicas convencionales basadas en métodos de ingeniería (Mench *et al.*, 2009, Vangronsveld *et al.*, 2009, Mench *et al.*, 2010, Greenland, 2014). Las tecnologías verdes pueden ser aplicadas para corregir áreas contaminadas tanto con contaminantes orgánicos como con elementos traza (Salt *et al.*, 1998, Wenzel *et al.*, 1999, Pilon-Smits, 2005, Chaney *et al.*, 2007, Kidd *et al.*, 2015).

Las técnicas de fitocorrección pueden subdividirse en dos grupos: de contención o de extracción. Los procesos de contención comprenden la fitoestabilización o fitoinmovilización cuyo objetivo primordial es reducir la biodisponibilidad, la movilidad y/o la toxicidad del contaminante en el ambiente. Por otra parte, los procesos de extracción comprenden la fitoextracción (uso de

plantas que extraen los contaminantes del suelo, concentrándolos en su parte aérea), la fitovolatilización (uso de plantas para volatilizar contaminantes) y la fitodegradación (uso de plantas y de los microorganismos asociados a las mismas para degradar contaminantes orgánicos) (Lombi *et al.*, 2001). Generalmente se utiliza el término fitodegradación (*in planta*) si la degradación del contaminante ocurre dentro de la planta y se usa el término rizodegradación o fitoestimulación (fitodegradación *ex planta*) en los casos en que la planta induce la biodegradación favoreciendo la actividad de los microorganismos rizosféricos (Salt *et al.*, 1998, Pilon-Smits, 2005) (Figura 1.7). Estas técnicas pueden combinarse con la adición de bacterias, como las PGPR, que pueden mejorar el crecimiento de la planta y su supervivencia, mediante la producción de por ejemplo fitohormonas (como ácido indolacético, etileno, citoquininas), y también pueden mejorar potencialmente la efectividad de las técnicas de fitocorrección ya que las PGPR pueden alterar la solubilidad, movilidad y disponibilidad de los elementos traza, liberando al medio agentes quelantes, sideróforos e incluso solubilizando fosfato, acidificando el medio y activando mecanismos de oxidación-reducción (Whiting *et al.*, 2001, Lasat, 2002, Abou-Shanab *et al.*, 2003, Kidd *et al.*, 2009). Recientemente la utilización de estos microorganismos asociados a planta han atraído la atención de muchos investigadores debido a su potencial aplicación en estrategias de fitocorrección (Brierley, 1990, Lovley & Coates, 1997, Wenzel *et al.*, 1999, Glick, 2003, Jing *et al.*, 2007, Kuffner *et al.*, 2008, Sessitsch & Puschenreiter, 2008, Kidd *et al.*, 2009, Vangronsveld *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2011, Sessitsch *et al.*, 2013, Kidd *et al.*, 2015) y en la última década un gran número de estudios se han dedicado a la búsqueda de bioinóculos con potencial aplicación en estas técnicas verdes (Abou-Shanab *et al.*, 2006, Becerra-Castro *et al.*, 2011, Sessitsch *et al.*, 2013, Cabello-Conejo *et al.*, 2014, Álvarez-López *et al.*, 2016, Kidd *et al.*, 2017).

Las técnicas de fitoestabilización y fitoextracción son las técnicas más comúnmente aplicadas en sitios contaminados con elementos traza y ambas pretenden disminuir la concentración de metal lábil en el suelo utilizando organismos vivos (Kidd *et al.*, 2015). La fitoextracción consiste en el cultivo de plantas tolerantes, que tienen la capacidad de acumular contaminantes del suelo en sus tejidos aéreos. Al final del período de crecimiento, la biomasa de la planta se cosecha. En los casos en los que el metal fitoextraído puede ser recuperado y

comercializado obteniendo un rendimiento económico, la técnica recibe el nombre de fitominería (Chaney *et al.*, 2007). En el caso de la fitoextracción, Salt *et al.* (1998) diferencia entre fitoextracción inducida, que usa compuestos químicos para aumentar la absorción y acumulación de contaminante en la planta, y fitoextracción continua que generalmente usa plantas hiperacumuladoras. Por otra parte, la fitoestabilización tiene como objetivo principal establecer una cubierta vegetal y progresivamente promover la inactivación *in situ* de los elementos traza en el suelo, combinando el uso de plantas exclusoras y enmiendas (Vangronsveld *et al.*, 1995, Mench *et al.*, 2006, Vangronsveld *et al.*, 2009). Aunque estas técnicas no permiten la limpieza total del suelo, mediante la alteración de la movilidad y especiación de los elementos traza, reducen el potencial impacto negativo que estos metales tienen sobre el medio ambiente.



Figura 1.7: Principales técnicas de fitocorrección (modificado de Pilon-Smits (2005)).

Se ha demostrado que el uso de GRO puede incrementar la diversidad microbiana del suelo y restaurar su funcionalidad, aplicando técnicas de

fitocorrección apropiadas a largo plazo (Mench *et al.*, 2006, Kumpiene *et al.*, 2009), debido a la reducción de la disponibilidad y toxicidad del metal y a la mejora de las propiedades químicas del suelo. Varios estudios analizaron el efecto de las estrategias de fitocorrección en las comunidades bacterianas del suelo. Juwarkar *et al.* (2007) analizó el efecto de las técnicas de fitocorrección, en concreto de la adición de moléculas biosurfactantes, en la comunidad bacteriana de dos sustratos, uno no contaminado y otro contaminado artificialmente con Cd y Pb. Los resultados que obtuvieron indican que la riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana en el suelo contaminado aumenta al disminuir la concentración de metal disponible en suelo debido a la complejación de elementos traza por parte de las moléculas biosurfactantes, lo que disminuirá la disponibilidad de metales en el medio y, por tanto, la toxicidad de los mismos para los microorganismos del suelo. Izquierdo *et al.* (2005) cultivaron dos especies de árboles, *Casuarina equisetifolia* y *Anacardium occidentale*, en suelos contaminados con elementos traza provocando un aumento en la diversidad y actividad enzimática de los microorganismos. Tipayno *et al.* (2012) utilizaron polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (T-RFLP) para determinar la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana y encontraron que los índices de riqueza y diversidad bacteriana fueron más altos en los suelos contaminados con elementos traza en donde se había implementado algún método de fitocorrección. Estos autores, sugirieron que podría ser debido a la presencia de exudados de raíz provenientes de las plantas cultivadas que mejoran las condiciones de supervivencia en el suelo. Chiellini *et al.* (2013) hicieron un seguimiento de la composición de las comunidades bacterianas presentes en sedimentos contaminados con elementos traza después de la aplicación de técnicas de fitocorrección durante tres años. Los resultados indicaron que la comunidad bacteriana consiguió estabilizarse después de un año desde el comienzo del tratamiento. Además, el proceso de fitocorrección permitió el desarrollo de una comunidad bacteriana completamente diferente de las comunidades bacterianas iniciales. Resultados similares se encontraron en otros estudios (Kim *et al.*, 2010, Yergeau *et al.*, 2014). En experiencias de fitoextracción se ha descrito que las plantas hiperacumuladoras cultivadas influyen en la comunidad bacteriana. Gremion *et al.* (2004) determinaron el impacto de los elementos traza y de las

prácticas de fitoextracción en la estructura de la comunidad bacteriana, para ello, cultivaron la hiperacumuladora de Zn y Cd, *Noccaea caerulea*, en macetas con suelo contaminado con Cu, Cd y Zn, y con suelo no contaminado. Estos autores observaron que la actividad enzimática del suelo aumentaba con el tiempo mientras que la estructura de la comunidad bacteriana no se recuperaba al estado inicial presente en el suelo no plantado. Cai *et al.* (2007) estudiaron el efecto de la fitocorrección en las comunidades microbianas asociadas a dos plantas hiperacumuladoras de Ni y a una planta tolerante a este elemento y encontraron que en el suelo, más cercano a las raíces de las tres plantas la riqueza, diversidad y biomasa de microorganismos era mayor que en el suelo no influenciado por las raíces.

La implementación de técnicas de fitocorrección, en muchos casos conlleva la aplicación de enmiendas que contribuyen o incluso son esenciales para el establecimiento de las especies vegetales que se van a implantar y para optimizar la eficacia del tratamiento. Las enmiendas más utilizadas pueden ser o bien inorgánicas (cal, minerales de fosfato, óxidos de Al y Fe) u orgánicas (lodos o biosólidos) (Knox *et al.*, 2000, Basta *et al.*, 2001). Varios estudios han demostrado que la adición de enmiendas orgánicas e inorgánicas a los suelos contaminados puede mejorar sus propiedades químicas, además de inducir un aumento en la funcionalidad, diversidad y biomasa microbianas (Chander & Joergensen, 2002, Perez-de-Mora *et al.*, 2006, Fernández *et al.*, 2012). Pérez-Mora *et al.* (2006) estudiaron en suelos contaminados con elementos traza en Aznalcollar, España, los efectos de distintos tratamientos *in situ* sobre algunas propiedades fisicoquímicas, actividad y diversidad microbianas del suelo. Estos autores encontraron que la actividad microbiana edáfica era mayor en los suelos donde se aplicaron técnicas de remedio que incluían la introducción de algún tipo de enmienda. Mench *et al.* (2006) evaluaron la efectividad de dos enmiendas para el tratamiento *in-situ* de un lugar contaminado con Cd y Ni y midieron la tasa de respiración diaria y la biomasa microbianas, la riqueza de especies bacterianas y las actividades de enzimas clave en el suelo. Los resultados indicaron que la biomasa y la tasa de respiración microbianas no se veían afectadas por la contaminación metálica ni por la adición de las enmiendas, pero apreciaron recuperación de la actividad de algunas de las enzimas analizadas. Kumpiene *et al.*

(2006) añadieron a suelos contaminados enmiendas con el fin de inmovilizar distintos elementos traza y encontraron un efecto positivo de las enmiendas sobre los microorganismos del suelo ya que en la mayoría de los casos se observó una reducción clara de la toxicidad y un aumento de la diversidad microbiana y la actividad enzimática. Resultados similares se encontraron en el estudio conducido por Kumpiene *et al.* (2009) que describieron un aumento de la biomasa microbiana, de la actividad enzimática y la respiración, además de una reducción clara en el estrés microbiano en suelos de escombrera enriquecidos en Cu del norte de Suecia en los que se añadieron distintas enmiendas orgánicas e inorgánicas (cenizas derivadas de la combustión de madera y carbón por una parte y por otra, musgo de turbera). Touceda-González *et al.* (2015) estudiaron los efectos sobre la estructura de la comunidad bacteriana de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en combinación con enmiendas inmovilizadoras de metal en el suelo. Los resultados mostraron importantes cambios en la composición de la comunidad en respuesta a las enmiendas y de menor intensidad en el caso de la inoculación bacteriana. Touceda-González *et al.* (2016) en una escombrera de mina con alto contenido de Cu tratada con residuos sólidos municipales compostados y en la que se plantaron tres especies vegetales (*Salix* spp., *Populus nigra* o *Agrostis capillaris*) observaron cambios importantes en la estructura de la comunidad bacteriana a lo largo de los tres años que duró el estudio.

Estos estudios demuestran que los cambios en las comunidades bacterianas después de la implementación de técnicas de fitocorrección dependen mayoritariamente del tipo de plantas y de enmienda utilizada (Kim *et al.*, 2010). Asimismo, indican que para el seguimiento de las técnicas de fitocorrección es de gran interés el estudio de la composición, estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas edáficas, ya que los microorganismos responden rápidamente a las alteraciones en el mismo (Gołębiewski *et al.*, 2014).

1.7 Metodología de estudio de la microbiota edáfica

El estudio de la enorme diversidad microbiana edáfica y el análisis de las diferencias entre las comunidades microbianas presentes en distintos suelos y horizontes así como de las variaciones inducidas por diferentes factores

(vegetación, clima, manejo, etc.) se aborda utilizando métodos que generalmente se subdividen en métodos dependientes de cultivo y métodos independientes de cultivo, entre los que se incluyen numerosos protocolos basados en el análisis de los ácidos nucleicos, principalmente ADN, cuyo uso se empezó a generalizar a mediados de la década de los 90 (Puglisi *et al.*, 2012).

1.7.1 Métodos dependientes de cultivo

Tradicionalmente se utilizaron técnicas dependientes de cultivo en el estudio de los microorganismos del suelo. Estas técnicas se basan en el análisis del crecimiento de microorganismos en el laboratorio en medios de cultivo líquidos o sólidos, con una composición muy variable y en muchos casos diseñada para favorecer el crecimiento de los microorganismos que se pretende estudiar.

El mayor problema asociado con el uso de estas técnicas es que tan solo se han podido cultivar entre un 0,001 y un 1% de los microorganismos vivos presentes en el medio ambiente (Torsvik *et al.*, 2003). En la tabla 1.2 pueden verse resultados de diferentes estudios en los que se determina la fracción de microorganismos cultivables respecto a la enumeración total realizada mediante microscopía de epifluorescencia.

Los estudios clásicos de diversidad microbiana basados únicamente en el cultivo de microorganismos permiten tener acceso a tan solo una pequeña parte de la diversidad real existente (Amann *et al.*, 1995). Aun así, se han hecho esfuerzos para crear nuevos medios y sistemas de cultivo que permitan conseguir información de microorganismos desconocidos, apoyándose en la información obtenida utilizando técnicas independientes de cultivo (Sait *et al.*, 2002, Joseph *et al.*, 2003, Ferrari *et al.*, 2005, Bollmann *et al.*, 2007). La importancia de aislar nuevas cepas es evidente, ya que una de las ventajas fundamentales de estas técnicas consiste en disponer de cultivos puros, útiles para aplicar en estudios posteriores y para conocer más sobre la actividad metabólica de estos microorganismos (Puglisi *et al.*, 2012, Visioli *et al.*, 2015).

1.7.2 Métodos independientes de cultivo

Los métodos independientes de cultivo no requieren ninguna etapa de cultivo y se basan en el estudio de las características bioquímicas y moleculares de los organismos, para caracterizar taxonómica y funcionalmente las comunidades microbianas. Este tipo de técnicas permiten obtener mucha más información de la diversidad microbiana existente en una muestra ambiental que las técnicas dependientes de cultivo (Amann *et al.*, 1995). Los métodos independientes de cultivo revolucionaron los cimientos de la microbiología convencional revelando una diversidad microbiana hasta entonces desconocida (Rappé & Giovannoni, 2003, Janssen, 2006). Aunque estas técnicas fueron diseñadas para obtener una perspectiva general de cada grupo biológico en una muestra, la complejidad de algunos hábitats y las limitaciones de los métodos a menudo dificultan ese objetivo. En este tipo de métodos se utilizan normalmente componentes celulares como por ejemplo ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Su *et al.*, 2012, Willers *et al.*, 2015). En muchos de los trabajos centrados en el estudio de las comunidades microbianas de suelos se han utilizado mayoritariamente los ácidos nucleicos, concretamente el ADN, aunque el ARN también ha sido utilizado comúnmente para obtener información de la comunidad microbiana activa (Rastogi & Sani, 2011, van Elsas & Boersma, 2011, Puglisi *et al.*, 2012, Su *et al.*, 2012, Lagos *et al.*, 2015, Visioli *et al.*, 2015).

Tabla 1.2: Proporción de organismos cultivables (%) en distintos ambientes (Viñas Canals, 2005).

Hábitat	Cultivables (%)	Referencias
Suelo	0,3	(Torsvik <i>et al.</i> , 1990)
Sedimentos	0,25	(Jones, 1977)
Lodos activados	1-15	(Wagner <i>et al.</i> , 1993, Wagner <i>et al.</i> , 1994)
Ecosistemas marinos	0,001-0,1	(Kogure <i>et al.</i> , 1979, Ferguson <i>et al.</i> , 1984)
Ecosistema aguas continentales	0,25	(Jones, 1977)
Lago mesofilo	0,1-1	(Staley & Konopka, 1985)
Estuarios	0,1-3	(Ferguson <i>et al.</i> , 1984)

En los métodos basados en el uso del ADN, la primera etapa consiste en la extracción de ADN de los componentes de las comunidades microbianas objeto de estudio. En el proceso de extracción se repiten siempre dos pasos esenciales, que son la lisis celular y la purificación del ADN. La metodología para realizar la lisis celular y extracción del ADN presenta variaciones en función del organismo del que queremos extraer el ADN, el tamaño de molécula que necesitemos para análisis posteriores y de las características del suelo (Hirsch *et al.*, 2010). Métodos de lisis como la agitación energética con microesferas que permiten la ruptura de la membrana y la pared celular de modo muy eficiente, aunque los fragmentos de ADN que se obtengan serán más pequeños (Yuan *et al.*, 2012). Hay otros métodos de lisis físicos que pueden ser utilizados, como es el caso de la sonicación, tratamiento con frío (congelado y descongelado), tratamiento con calor (Hirsch *et al.*, 2010). Estas técnicas pueden ser complementarias siendo común hoy en día la combinación de lisis física, con microesferas, y química utilizando detergentes. Alguno de los agentes químicos utilizados tradicionalmente en la lisis celular son el SDS, la Lisozima y la Proteinasa K. El dodecilsulfato sódico o SDS es un detergente iónico que se utiliza comúnmente con el fin de romper la envoltura celular y desnaturalizar y solubilizar proteínas (Natarajan *et al.*, 2016). La lisozima y la proteinasa K facilitan la ruptura de la membrana y la pared celular. La proteinasa K además puede inactivar las ARNasas y ADNasas que podrían dañar los ácidos nucleicos extraídos (Shahriar *et al.*, 2011). Los solventes orgánicos, fenol y cloroformo, son utilizados generalmente en extracciones de ADN y ARN para eliminar las proteínas y lípidos (Sambrook & Russell, 2006). Uno de los mayores problemas derivados del trabajo con muestras de suelo es que las sustancias húmicas, la materia orgánica y la arcilla pueden unirse al ADN y complicar el proceso de purificación del mismo (Hirsch *et al.*, 2010). Además, la purificación puede llevar a la pérdida del ADN extraído (van Elsas & Boersma, 2011). Hoy en día en la mayoría de laboratorios se utilizan kits comerciales de extracción de ADN como es el caso de “Powersoil” soil DNA extraction kits (MoBio, USA) y el Fast DNA Spin kit for soil (Bio101, USA) (van Elsas & Boersma, 2011). Estos kits incluyen generalmente etapas en las que se aplica una lisis física, generalmente por agitación energética con microesferas de vidrio o cerámica de alta dureza (“bead beating”), y una lisis con agentes químicos, que se

utilizan para precipitar sustancias que se co-extraen con el ADN, finalmente se usan materiales silíceos para adsorber el ADN que permiten la purificación de mismo mediante lavados con distintos solventes que eliminan contaminantes.

El protocolo de extracción de ADN utilizado va a condicionar los resultados obtenidos con las técnicas independientes de cultivo (Martin-Laurent *et al.*, 2001, Feinstein *et al.*, 2009, Delmont *et al.*, 2011). Por ejemplo, se sabe que las bacterias Gram-positivas son más difíciles de lisar que las Gram-negativas. También se detectó que las células más pequeñas (0,3-1,2 μ m) son más resistentes a la lisis y por lo tanto la extracción de sus ácidos nucleicos podría no ser eficiente del todo (Amann *et al.*, 1995). En el 2006 Philippot *et al.* vieron la necesidad de estandarizar los protocolos de extracción de ADN y presentaron una propuesta ante la Organización Internacional de Normalización (ISO) (Philippot *et al.*, 2010). Esta necesidad fue reconocida rápidamente por los miembros de la ISO y en el 2012 se publicó el protocolo estandarizado, ISO-11063 (ISO, 2012).

En una gran parte de los métodos moleculares disponibles, una vez obtenido el ADN de las comunidades objeto de estudio, se procede a amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los genes y/o fragmentos de interés para conseguir una cantidad suficiente de ADN para el análisis. La técnica de PCR presenta varias limitaciones intrínsecas que pueden condicionar la interpretación final de los resultados; algunas afectan especialmente en estudios como los basados en el análisis del gen ADNr 16S del (del que se amplía información más adelante), en los que la muestra de partida contiene numerosas copias de un gen, copias que presentan distintas secuencias según el organismo del que proceden. Estas limitaciones de la PCR plantean problemas metodológicos que pueden llevar a errores o interpretaciones erróneas de la diversidad de una comunidad microbiana. Entre las limitaciones más importantes se pueden mencionar: 1) La amplificación preferente de secuencias más abundantes y con bajo porcentaje de GC, debido a un fenómeno de inhibición competitiva de las secuencias menos frecuentes y a una mala separación de las cadenas de ADN de las secuencias ricas en guanina y citosina (GC) durante el proceso de desnaturalización (Reysenbach *et al.*, 1992); 2) La fidelidad de la Taq polimerasa que es diferente según el tipo de proveedor, la tasa de error por incorporación errónea de nucleótidos, oscila en un rango de 0,0002-1,3 % (Head *et al.*, 1998); 3) La formación de secuencias

quiméricas debido a la fusión entre fragmentos generados en la PCR a partir de distintas secuencias molde durante el proceso de amplificación (Liesack *et al.*, 1991, Muyzer *et al.*, 1998).

Los métodos independientes de cultivo se basan en su mayoría en el uso de genes de referencia. En el caso de los estudios de comunidades de bacterias y de arqueas del suelo el gen de uso más generalizado es el ARN ribosómico 16S (ADNr 16S), es decir, el ARN que se encuentra en la subunidad pequeña de los ribosomas de todas las bacterias y arqueas (ADNr 16S) (Kim & Chun, 2014). El análisis de la secuencia del gen ADNr 16S se convirtió en una herramienta común para caracterizar las comunidades bacterianas en ambientes complejos, debido a la gran disponibilidad de bases de datos públicas y al uso del 16S como estándar para el estudio taxonómico bacteriano (Olsen *et al.*, 1986, Riesenfeld *et al.*, 2004, Hartmann & Widmer, 2006). La secuencia de este gen varía entre especies diferentes; además en determinadas zonas, la secuencia es común a todas (o a la mayoría) de las bacterias conocidas y en otras áreas la secuencia la comparten miembros de determinados grupos bacterianos (por ejemplo, *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, etc.) o miembros de un género o de una especie (Clarridge, 2004, Kim & Chun, 2014). Esta característica permite que en muchos casos sea posible diseñar cebadores para amplificar solamente fragmentos del ADNr 16S de un grupo bacteriano de interés y, por tanto, se pueda obtener información a distintos niveles filogenéticos (Lane, 1991, Muyzer *et al.*, 1993, Baker *et al.*, 2003).

El resultado más sorprendente de los muchos estudios de diversidad bacteriana que han empleado métodos independientes de cultivo basados en el ADNr 16S, es la riqueza de las comunidades no cultivables. Según revisó Riesenfeld en 2004, después del 01 de abril de 2004, el GenBank tenía depositadas 21 466 secuencias del gen que codifica el ARNr 16S de procariotas cultivados y 54 655 de procariotas no cultivados. Cuando Woese (1987) propuso una filogenia basada en el ADNr 16S, se reconocieron 12 Fila bacterianos, todos ellos con representantes cultivados. Unos años más tarde, los análisis de las secuencias del ADNr 16S indicaron que existían al menos 56 Fila de los cuales 26 contenían únicamente bacterias no cultivadas, por lo tanto, la mitad de los Fila conocidos no tenían ningún representante cultivado hasta el momento (Rappé &

Giovannoni, 2003). En 2016 un estudio de Hug y colaboradores demostraba la existencia de al menos 92 Fila bacterianos (Hug *et al.*, 2016).

El uso del ADNr 16S para el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas también tiene su problemática asociada entre las que se puede mencionar que las distintas bacterias tienen un número diferente de copias de este gen y que las secuencias de las distintas copias en un mismo organismo a veces no son idénticas (Case *et al.*, 2007). Esto lleva a que no se puede relacionar directamente la abundancia de un determinado organismo con la cantidad de producto de PCR obtenido y que por ejemplo en la técnica de DGGE, que se describe más adelante, un mismo organismo puede dar lugar a más de una señal (Head *et al.*, 1998). Estos aspectos son especialmente importantes puesto que tal como se comentó anteriormente muchos métodos recurren a una etapa de amplificación por PCR a partir de ADN de las comunidades microbianas que se van a estudiar.

Hay métodos que se centran en el estudio de otros genes como es el caso de los genes funcionales. En la última década ha adquirido una creciente importancia el estudio de genes que codifican para enzimas implicadas en procesos clave del suelo y se han utilizado como indicadores de cambios en la diversidad funcional del mismo. Comúnmente se han utilizado los genes que codifican para la enzima amonio monooxigenasa de bacterias y arqueas, *amoA*, para la enzima metano monooxigenasa, *pmoA* y *mmoX*, para la nitrato reductasa, *narG* y para la nitrito reductasa, *nirK* y *nirS*, así como el gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa que se encuentra en bacterias que fijan nitrógeno atmosférico (Sørensen *et al.*, 2009, van Elsas & Boersma, 2011).

1.7.2.1 Técnicas de análisis de “huellas moleculares”

Las técnicas de “huellas moleculares” aplicadas a comunidades microbianas ambientales engloban una serie de métodos que permiten tener una visión rápida y global de la diversidad de una muestra y permiten hacer un seguimiento de los cambios en la comunidad a través del tiempo. Con estas técnicas se analizan cuantas variantes de un determinado gen (por ejemplo, de ADNr 16S) están presentes en una muestra ambiental. Desde finales de los 90 las técnicas de

“huellas moleculares”, también conocidas por su nombre en inglés “PCR-fingerprinting”, se han utilizado para estudiar la diversidad y estructura de las comunidades microbianas. La mayor ventaja derivada del uso de estas técnicas es que permiten, en poco tiempo, comparar y tener una perspectiva general de la composición y diversidad de la comunidad microbianas a estudiar (van Elsas & Boersma, 2011) así como, analizar un número elevado de muestras en paralelo. Sin embargo, estas técnicas solo detectan las bacterias dominantes en la comunidad (Lagos *et al.*, 2015). Existe un gran número de técnicas de “huella molecular” que permiten el estudio de fragmentos amplificados por PCR a partir del ADN ambiental, ejemplos muy utilizados son la DGGE, del inglés “denaturing gradient gel electrophoresis”, TGGE, del inglés “temperature gradient gel electrophoresis”, T-RFLP “terminal restriction fragment length polymorphism”, SSCP “single-strand conformational polymorphism”, RISA “ribosomal internal spacer analysis” y LH-PCR “length heterogeneity-PCR”. De entre todas ellas la técnica de DGGE ha sido la que mayor aceptación ha tenido (Rastogi & Sani, 2011, van Elsas & Boersma, 2011, Visioli *et al.*, 2015).

La DGGE es una técnica electroforética en gel de poliacrilamida con una concentración creciente de agente desnaturizante (urea-formamida) que permite separar moléculas de ADN de hasta 700 pares de bases (pb) de longitud, según sea su secuencia más rica en G/C o A/T (Fischer & Lerman, 1979, Muyzer *et al.*, 1993, Muyzer *et al.*, 1998, Kawai *et al.*, 2002). Cuando el gradiente de urea-formamida está optimizado se pueden separar moléculas con secuencias que difieren en tan solo una base (Muyzer *et al.*, 1993).

El método se basa en la preparación de geles de poliacrilamida con un gradiente desnaturizante de urea-formamida, de modo que la concentración de desnaturizante es máxima en la parte inferior del gel y mínima en la parte superior. Al preparar una electroforesis en vertical y cargar las muestras en la parte superior del gel, el ADN a medida que avanza se encuentra con una concentración creciente de urea-formamida, se va desnaturizando paulatinamente y, en consecuencia, su migración en el gel se va ralentizando (Muyzer *et al.*, 1993). La técnica se emplea para analizar muestras constituidas por fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con secuencia diferente. Los diferentes fragmentos de ADN de una muestra alcanzarán una posición en el gel

distinta que dependerá de su secuencia.

En estudios ambientales, esta técnica se aplica principalmente para el análisis de fragmentos de ADNr 16S amplificados por PCR. En la etapa de amplificación a partir de ADN ambiental uno de los dos cebadores empleados se sintetiza con un fragmento rico en GC en uno de los extremos (en posición 5'), de manera que el fragmento amplificado dispone de una pinza artificial rica en GC en un extremo, que tiene la función de evitar la desnaturalización completa del ADN durante la etapa de electroforesis (Myers *et al.*, 1985, Sheffield *et al.*, 1989, Muyzer *et al.*, 1993, Heuer *et al.*, 1997, Smalla *et al.*, 2001). El resultado final será un patrón de bandas diferencial para cada muestra analizada. Cada banda teóricamente equivaldría a una especie bacteriana distinta. Además, la DGGE tiene también la ventaja de que es posible recortar algunas bandas aisladas, reamplificarlas y secuenciarlas, con lo que se puede obtener información filogenética sobre los miembros de la comunidad (Muyzer *et al.*, 1998). Es un método particularmente útil para examinar series temporales y dinámicas de poblaciones microbianas. Por estos motivos la DGGE se convirtió en uno de los métodos más utilizados para el estudio de comunidades bacterianas (Yu & Morrison, 2004, van Elsas & Boersma, 2011).

Entre los inconvenientes de esta técnica de DGGE, se pueden mencionar la laboriosidad de la optimización del gradiente desnaturalizante, o en el caso del análisis de genes como el ADNr 16S el problema que se plantea por la obtención de patrones de bandas extremadamente complejos o con un número de bandas tan elevado, que no se puede observar un patrón claro sino únicamente bandas muy próximas que no se pueden distinguir (Yu & Morrison, 2004). Para tratar de paliar este problema, en algunos estudios se emplean cebadores que amplifican grupos bacterianos específicos, en lugar de cebadores “universales” que hibridan con el gen ADNr 16S de todos (o la mayoría) de los miembros de la comunidad bacteriana. También se observó que se puede producir comigración de los fragmentos, de modo que una sola banda está formada por fragmentos con diferente secuencia, y viceversa, un mismo organismo puede generar más de una banda (Head *et al.* 1998). Por otra parte, la longitud de los fragmentos que se pueden analizar por DGGE puede ser demasiado corta para obtener una información filogenética fiable y valiosa.

1.7.2.2 Técnicas de hibridación

La diversidad bacteriana en suelos también puede ser estudiada aplicando técnicas de hibridación en las que se puede evitar la amplificación por PCR y que emplean cebadores y sondas de oligonucleótidos que van a hibridar con secuencias de ARN ribosómico o de otros genes presentes en la muestra ambiental (Rastogi & Sani, 2011). Estas técnicas moleculares no basadas en PCR como son la hibridación *in situ* (FISH, del inglés Fluorescence In Situ Hybridization) y las micromatrices o chips de ADN también se aplican con frecuencia al estudio de comunidades microbianas en muestras ambientales (Su *et al.*, 2012). Estas técnicas tienen limitaciones asociadas, como que solo se pueden analizar genes u organismos para las cuales disponemos de una sonda, es decir se ha de conocer con anterioridad un fragmento de la secuencia característica de ese organismo o gen y no pueden detectarse aquellos que no tienen la sonda correspondiente (Su *et al.*, 2012).

La técnica de FISH posibilita la identificación filogenética *in situ* además de permitir la visualización de células microbianas individuales mediante hibridación de las células con sondas de oligonucleótidos complementarias (Amann *et al.*, 1995). Las sondas contienen un fluoróforo en el extremo que permite la detección de la sonda unida al ADN o ARN de la célula pudiéndolo visualizar con un microscopio de epifluorescencia. Además, en el caso de sondas de ADNr 16S la intensidad de señal va a estar correlacionada con el contenido de ARNr y las tasas de crecimiento bacteriano, que permiten conocer el estado metabólico de las mismas (Rastogi & Sani, 2011).

Las micromatrices o también llamados chips de ADN consisten en el marcaje del ADN con un fluoróforo y la puesta en contacto del mismo con la micromatriz. La micromatriz contiene hasta decenas de miles de sondas de oligonucleótidos compuestas por fragmentos del gen ADNr 16S (como en la micromatriz denominada Phylochip (Loy *et al.*, 2002)) o de genes funcionales (como en Geochip (He *et al.*, 2007)) (van Elsas & Boersma, 2011). Los fragmentos del ADN del suelo que son homólogos a las sondas del chip hibridan en sus posiciones complementarias dentro de la micromatriz y después de la hibridación, las señales en el chip se analizan digitalmente. De este modo se

obtiene información sobre la diversidad en la comunidad, así como también del potencial funcional de la misma (van Elsas & Boersma, 2011).

1.7.2.3 Técnicas basadas en la secuenciación de alto rendimiento

En la pasada década el método de análisis más utilizado para estudiar en detalle las comunidades microbianas en muestras ambientales ha sido la clonación de los fragmentos individuales del gen 16S ADNr amplificados por PCR, seguida de la secuenciación de Sanger (DeSantis *et al.*, 2007, Rosselli *et al.*, 2016). Las secuencias obtenidas se comparaban con otras secuencias conocidas en una base de datos pública y se asignaban a un filo, clase, orden, familia, subfamilia o especie. Las librerías de clones del gen ADNr 16S permiten en un primer momento conocer la diversidad en una muestra ambiental e identificar nuevos taxones, pero algunos estudios han demostrado que en muestras ambientales de suelo se pueden necesitar al menos 40 000 clones para recoger solamente el 50% de la riqueza de una muestra (Rastogi & Sani, 2011). Normalmente las librerías de clones de 16S contienen unas 1000 secuencias, por lo tanto, reflejan una porción pequeña de la diversidad microbiana presente en una muestra. Con la llegada de métodos de secuenciación más nuevos y de relativamente bajo coste, se han conseguido grandes avances en el análisis de diversidad microbiana (Su *et al.*, 2012). En los últimos años, el desarrollo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento o NGS (del inglés Next-generation sequencing) permiten el análisis a gran escala de las comunidades microbianas y da lugar a aplicaciones novedosas como la metagenómica, que consiste en el estudio del material génico obtenido directamente del medio ambiente, sin necesidad de amplificación de un gen o genes por PCR, proporcionando información de los microorganismos que están presentes en la muestra y de su potencial génico; o la metatranscriptómica que nos permite conocer los fragmentos de ARN transcritos presentes en muestras ambientales con lo que se consigue una perspectiva de la expresión génica de la comunidad y se pueden hacer deducciones sobre la funcionalidad de los genes transcritos (Xu, 2006, Lasken, 2007, Poretsky *et al.*, 2009, Su *et al.*, 2012). Las plataformas más comúnmente utilizadas en estos estudios de NGS son Roche 454 sequencing, Illumina (Solexa) sequencing, Ion torrent: Proton / PGM sequencing y

SOLiD sequencing. Estas técnicas se convirtieron rápidamente en el método de elección en estudios de ecología microbiana ya que permiten secuenciar ADN y ARN mucho más rápido y de modo más económico que la técnica utilizada anteriormente, la secuenciación de Sanger. En la mayoría de los estudios de comunidades microbianas edáficas en los que se emplean técnicas de secuenciación masiva, publicados en los últimos años, se recurre al uso de la pirosecuenciación o secuenciación 454 (Lauber *et al.*, 2009, Quince *et al.*, 2009, Uroz *et al.*, 2010, Nacke *et al.*, 2011, Ding *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012, Gołębiewski *et al.*, 2014, Lopes *et al.*, 2014, Schreiter *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2015, Touceda-González *et al.*, 2015, Kuppusamy *et al.*, 2016, Pascual *et al.*, 2016).

La pirosecuenciación permite una alta producción de datos en un corto período de tiempo, posee una gran precisión, los fragmentos secuenciados son de un tamaño mayor que con otras técnicas de NGS (aunque se han hecho avances muy importantes en el caso de Illumina (Illumina)) y los costes de la generación de datos son relativamente bajos. Esta técnica se basa en seguir la actividad de la ADN polimerasa, analizando el pirofosfato liberado durante el proceso de incorporación de nucleótidos en una hebra de ADN (Nyrén, 2007). El pirofosfato es transformado en ATP, que provoca la emisión de luz en el pocillo de reacción, en un proceso catalizado por una luciferasa (Metzker, 2010). El nombre de pirosecuenciación se debe al pirofosfato que se libera después de la incorporación de nucleótidos. La pirosecuenciación fue la primera alternativa comercial al método de secuenciación de Sanger (Ronaghi *et al.*, 1998, Nyrén, 2001). Esta técnica se puede usar en el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP), secuenciación marcada (tag-sequencing) (hasta 100 bases) y también en la secuenciación de genomas completos (Margulies *et al.*, 2005). La pirosecuenciación nos permite estudiar ampliamente una comunidad microbiana, es decir, desde las especies más abundantes a los microorganismos raros (Liu *et al.*, 2007, Roesch *et al.*, 2007). La gran ventaja de la pirosecuenciación es que, dado su alto rendimiento y sus pocas limitaciones, se descubren muchas secuencias nuevas, aumentando así el conocimiento que tenemos sobre la diversidad de las comunidades microbianas en suelo (Elshahed *et al.*, 2008).

La pirosecuenciación también presenta algunas limitaciones. Las secuencias que se producen son a menudo relativamente pequeñas (máximo 450 bp). El método es más propenso a tener errores que los métodos de secuenciación anteriores (basado en Sanger) y debido a estos errores son necesarios programas para detectarlos a posteriori (Quince *et al.*, 2009). Por último, la gran cantidad de datos producidos requerirá de softwares bioinformáticos muy específicos para seleccionar y analizar fácilmente las secuencias (van Elsas & Boersma, 2011). De estas limitaciones se pone de manifiesto la dificultad para estudiar las comunidades bacterianas en su conjunto. Sin embargo, la aplicación de técnicas moleculares en este campo supuso un avance importante en el conocimiento de estas comunidades.

1.7.2.4 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

En las últimas décadas se ha desarrollado y popularizado la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real que permite cuantificar con fiabilidad el número de copias de un fragmento de ADN de interés presentes en una muestra, aplicando la técnica de PCR. La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una herramienta altamente sensible capaz de cuantificar el producto de una reacción de PCR y relacionar este con el número de copias de ADN molde al inicio de la reacción. La cuantificación se realiza por medio de marcadores de fluorescencia presentes en la reacción de amplificación. El marcador fluorescente más comúnmente utilizado es el SYBR Green I, este posee la capacidad de intercalarse en la doble hélice de ADN de modo que, a medida que progresa la reacción de PCR y se genera mayor cantidad de ADN de doble cadena aumenta la fluorescencia (Thermo-Scientific). Además de reactivos que generan fluorescencia al intercalarse en ADN de doble cadena, también se emplean sondas que portan fluoróforos (sondas TaqMan, oligobalizas, etc.) que al hibridar con el fragmento objeto de estudio emiten fluorescencia. La señal emitida durante el desarrollo de la reacción de PCR se cuantifica y de este modo se puede detectar la fase exponencial de la reacción de PCR, fase en la que el primer incremento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con el número de copias de ADN molde de la muestra. El incremento significativo de la fluorescencia se detecta antes cuanto mayor es el

número de copias de ADN molde en la muestra. Para la cuantificación se preparan rectas de calibrado con ADN de referencia (Bustin *et al.*, 2012). En estudios edáficos la qPCR se emplea para la cuantificación de genes tales como ADNr 16S (para cuantificar las bacterias del suelo) o de genes funcionales como *amoA*, *nirK*, *nirS*, etc (van Elsas & Boersma, 2011, Bustin *et al.*, 2012)

1.8 Referencias

- Abou-Shanab RA, Angle JS, Delorme TA, Chaney RL, van Berkum P, Moawad H, Ghanem K & Ghazlan HA (2003) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytol* **158**: 219–224.
- Abou-Shanab RAI, Angle JS & Chaney RL (2006) Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biol Biochem* **38**: 2882-2889.
- Abou-Shanab RAI, van Berkum P & Angle JS (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* **68**: 360-367.
- Abou-Shanab RAI, van Berkum P, Angle JS, Delorme TA, Chaney RL, Ghazlan HA, Ghanem K & Moawad H (2010) Characterization of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale* by 16S rRNA gene sequence analysis. *World J Microbiol Biotechnol* **26**: 101-108.
- Abou-Shanab RI, Delorme TA, Angle JS, Chaney RL, Ghanem K, Moawad H & Ghazlan HA (2003) Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Int J Phytoremediation* **5**: 367-379.
- Aboudrar W, Schwartz C, Benizri E, Morel JL & Boulabah A (2007) Soil microbial diversity as affected by the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* under natural conditions. *Int J Phytoremediation* **9**: 41-52.
- Acea MJ & Carballas T (1986) Relationships among microbial groups in various humid zone soils, and the factors controlling their distribution. *Agrochimica* **34**: 1-14.
- Adriano DC (2001) *Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer-Verlag, New York, Berlin etc.
- Aguilar-Ruiz J, Calvo-de-Anta R, Fernández-Ondoño E & Macías-Vázquez F (1998) Geoquímica de la alteración y edafogénesis de rocas serpentinizadas de la Sierra Bermeja (Málaga). *Edafología* **5**: 135-152.
- Albarracín VH, Amoroso MJ & Abate CM (2005) Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains. *Chemie der Erde - Geochemistry* **65**: Supplement 1: 145-156.
- Alford É, Pilon-Smits EH & Paschke M (2010) Metallophytes—a view from the rhizosphere. *Plant Soil* **337**: 33-50.
- Almås ÅR, Mulder J & Bakken LR (2005) Trace metal exposure of soil bacteria depends on their position in the soil matrix. *Environ Sci Technol* **39**: 5927-5932.
- Álvarez-López V (2016) Plant-microbe-soil interactions and their role in phytotechnologies applied to trace metal-rich soils. Doctoral dissertation Thesis, Universidade de Santiago de Compostela (Spain).
- Álvarez-López V, Prieto-Fernández Á, Becerra-Castro C, Monterroso C & Kidd PS (2016) Rhizobacterial communities associated with the flora of three serpentine outcrops of the Iberian Peninsula. *Plant Soil* 1-20.

- Alloway BJ (1995) *Soil processes and the behaviour of heavy metals*. Chapman & Hall, New York.
- Alloway BJ (2013) Sources of heavy metals and metalloids in soils. *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*, (Alloway BJ, ed.) 11-50. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- Amir H & Pineau R (1998) Influence of plants and cropping on microbiological characteristics of some New Caledonian ultramafic soils. *Soil Research* **36**: 457-472.
- Andersen C, Hughes C & Koronakis V (2001) Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 412-416.
- Andreazza R, Pieniz S, Wolf L, Lee M-K, Camargo FAO & Okeke BC (2010) Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. *Sci Total Environ* **408**: 1501-1507.
- Bååth E (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Poll* **47**: 335-379.
- Badri DV & Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell Environ* **32**: 666-681.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 233-266.
- Baker AJM (1981) Accumulators and excluders - Strategies in the response of plants to heavy-metals. *J Plant Nutr* **3**: 643-654.
- Baker AJM & Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126.
- Baker AJM, Proctor J & Reeves RD (1992) The vegetation of ultramafic (serpentine) soils: Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology, University of California, Davis, 19-22 June 1991. Intercept, Andover, UK.
- Baker GC, Smith JJ & Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* **55**: 541-555.
- Bakker PAHM, Berendsen RL, Doornbos RF, Wintermans PCA & Pieterse CMJ (2013) The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front Plant Sci* **4**: 165.
- Basta N, Ryan J & Chaney R (2005) Trace element chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *J Environ Qual* **34**: 49-63.
- Basta NT, Gradwohl R, Snethen KL & Schroder JL (2001) Chemical immobilization of lead, zinc and cadmium in smelter contaminated soils using biosolids and rock phosphate. *J Environ Qual* **30**: 1222-1230.
- Baudoin E, Benizri E & Guckert A (2002) Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl Soil Ecol* **19**: 135-145.
- Beattie GA (2006) Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. *Plant-Associated Bacteria*, (Gnanamanickam SS, ed.) 1-56. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Becerra-Castro C, Monterroso C, Garcia-Leston M, Prieto-Fernandez A, Acea MJ & Kidd PS (2009) Rhizosphere microbial densities and trace metal tolerance of the nickel hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*. *Int J Phytoremediation* **11**: 525-541.
- Becerra-Castro C, Prieto-Fernández A, Álvarez-Lopez V, Monterroso C, Cabello-Conejo MI, Acea MJ & Kidd PS (2011) Nickel solubilizing capacity and characterization

- of rhizobacteria isolated from hyperaccumulating and non-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium*. *Int J Phytoremediation* **13**: 229-244.
- Becerra-Castro C, Monterroso C, Prieto-Fernández A, Rodríguez-Lamas L, Loureiro-Viñas M, Acea MJ & Kidd PS (2012) Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant–microorganism–rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *J Hazard Mater* **217–218**: 350-359.
- Becerra-Castro C, Kidd P, Kuffner M, Prieto-Fernández A, Hann S, Monterroso C, Sessitsch A, Wenzel W & Puschenreiter M (2013) Bacterially induced weathering of ultramafic rock and its implications for phytoextraction. *Appl Environ Microbiol* **79**: 5094-5103.
- Benizri E, Nguyen C, Piutti S, Slezack-Deschaumes S & Philippot L (2007) Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. *Soil Biol Biochem* **39**: 1230-1233.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ & Bakker PAHM (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* **17**: 478-486.
- Berg G & Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 1-13.
- Berg J, Brandt KK, Al-Soud WA, Holm PE, Hansen LH, Sorensen SJ & Nybroe O (2012) Selection for Cu-tolerant bacterial communities with altered composition, but unaltered richness, via long-term Cu exposure. *Appl Environ Microbiol* **78**: 7438-7446.
- Bert V, Macnair MR, de Laguerie P, Saumitou-Laprade P & Petit D (2000) Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). *New Phytol* **146**: 225-233.
- Bhattacharyya PN & Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* **28**: 1327-1350.
- Blom D, Fabbri C, Connor EC, Schiestl FP, Klauser DR, Boller T, Eberl L & Weiskopf L (2011) Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ Microbiol* **13**: 3047-3058.
- Boivin MEY, Greve GD, Kools SAE, van der Wurff AWG, Leeftang P, Smit E, Breure AM, Rutgers M & van Straalen NM (2006) Discriminating between effects of metals and natural variables in terrestrial bacterial communities. *Appl Soil Ecol* **34**: 103-113.
- Bollmann A, Lewis K & Epstein SS (2007) Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6386-6390.
- Bonfante P & Anca I-A (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Annu Rev Microbiol* **63**: 363-383.
- Bordez L, Jourand P, Ducouso M, Carriconde F, Cavaloc Y, Santini S, Claverie JM, Wantiez L, Leveau A & Amir H (2016) Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol Ecol* **25**: 2258-2272.
- Borges-Walmsley MI, McKeegan KS & Walmsley AR (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J* **376**: 313-338.
- Boyd RS & Martens SN (1994) Nickel hyperaccumulated by *Thlaspi montanum* var *montanum* is acutely toxic to an insect herbivore. *Oikos* **70**: 21-25.
- Boyd RS, Shaw JJ & Martens SN (1994) Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (*Brassicaceae*) against pathogens. *Am J Bot* **81**: 294-300.
- Brady KU, Kruckeberg AR & Bradshaw Jr HD (2005) Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. Vol. 36 243-266.

- Branco S (2010) Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Mol Ecol* **19**: 5566 - 5576.
- Brierley CL (1990) Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwater. *Geomicrobiol J* **8**: 201-223.
- Brimecombe M, De Leij F & Lynch J (2001) The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. *The rizosphere Biochemistry and Organic Substances at the soil -plant Interface* (Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P, eds.), 95-140. Marcel Dekker, New York.
- Brooks R (1994) Plants that hyperaccumulate heavy metals. *Plants and the chemical elements*, (Farago M, ed.) 87-105. Weinheim, Germany: VCH.
- Brooks R, Shaw S & Marfil A (1981) Some observations on the ecology, metal uptake and nickel tolerance of *Alyssum serpyllifolium* subspecies from the Iberian Peninsula. *Vegetatio* **45**: 183-188.
- Brooks RR (1987) *Serpentine and its vegetation: A multidisciplinary approach*. Dioscorides, Portland, OR.
- Brooks RR & Radford CC (1978) Nickel accumulation by european species of the genus *Alyssum*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **200**: 217-224.
- Brooks RR, Lee J, Reeves RD & Jaffre T (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *J Geochem Explor* **7**: 49-57.
- Brooks RR, Morrison RS, Reeves RD, Dudley TR & Akman Y (1979) Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum linnaeus* (Cruciferae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **203**: 387-403.
- Brown SL, Chaney RL, Angle JS & Baker AJM (1995) Zinc and Cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils. *Environ Sci Technol* **29**: 1581-1585.
- Bruins MR, Kapil S & Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **45**: 198-207.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P. (2012) Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**: 91-95.
- Bustin SA, Zaccara S & Nolan T (2012) An introduction to the real-time polymerase chain reaction (qPCR). *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*, (Filion M, ed.) Caister Academic Press.
- Cabello-Conejo MI, Becerra-Castro C, Prieto-Fernández A, Monterroso C, Saavedra-Ferro A, Mench M & Kidd PS (2014) Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. *Plant Soil* **379**: 35-50.
- Cai X, Qiu R, Chen G, Zeng X & Fang X (2007) Response of microbial communities to phytoremediation of nickel contaminated soils. *Front Agric China* **1**: 289-295.
- Calvo de Anta R, Álvarez Rodríguez E & López Mosquera E (1987) Primeros datos sobre la especiación de Cr, Ni y Cu existentes en suelos serpentínicos de Galicia. *El Suelo, Fertilidad y Fertilizantes*, 151-158. EFCE Publication.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF & Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* **73**: 278-288.
- Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**: 840-862.
- Collins YE & Stotzky G (1992) Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay minerals. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1592-1600.

- COM (2002) Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: Towards a thematic strategy for soil. COM (2002) 179- final.
- Compant S, Clément C & Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* **42**: 669-678.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C & Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4951-4959.
- Costa R, Götz M, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G & Smalla K (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol* **56**: 236-249.
- Cotelo-Neiva JM (1948) *Rochas e minérios da região de Bragança-Vinhais*.
- Crowley DE (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*, (Barton LL & Abadia J, eds.), 169-198. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Cunningham SD & Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol* **110**: 715-719.
- Curl EA & Truelove B (1986) The Rhizosphere. *Advanced Series in Agricultural Sciences* **15**: 288.
- Chander K & Joergensen RG (2002) Decomposition of ¹⁴C labelled glucose in a Pb-contaminated soil remediated with synthetic zeolite and other amendments. *Soil Biol Biochem* **34**: 643-649.
- Chaney RL, Angle JS, Broadhurst CL, Peters CA, Tappero RV & Sparks DL (2007) Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J Environ Qual* **36**: 1429-1443.
- Chiellini C, Iannelli R & Petroni G (2013) Temporal characterization of bacterial communities in a phytoremediation pilot plant aimed at decontaminating polluted sediments dredged from Leghorn harbor, Italy. *New Biotechnology* **30**: 772-779.
- Chien C, Kuo Y, Chen C, Hung C, Yeh C & Yeh W (2008) Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* **20**: 359-363.
- Chodak M, Gołębiewski M, Morawska-Płoskonka J, Kuduk K & Niklińska M (2013) Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Appl Soil Ecol* **64**: 7-14.
- Christensen H, Hansen M & Sørensen J (1999) Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1753-1761.
- de Souza MP, Chu D, Zhao M, Zayed AM, Ruzin SE, Schichnes D & Terry N (1999) Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiol* **119**: 565-574.
- De Weger LA, van der Vlugt CI, Wijffjes AH, Bakker PA, Schippers B & Lugtenberg B (1987) Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J Bacteriol* **169**: 2769-2773.
- DeAngelis KM, Brodie EL, DeSantis TZ, Andersen GL, Lindow SE & Firestone MK (2008) Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *ISME J* **3**: 168-178.
- DeGrood SH, Claassen VP & Scow KM (2005) Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biol Biochem* **37**: 1427-1435.
- Deka H, Deka S & Baruah CK (2015) Plant Growth Promoting Rhizobacteria for value addition: Mechanism of action. *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants*, (Egamberdieva D, Shrivastava S & Varma A, eds.), 305-321. Springer International Publishing, Cham.

- Dekkers LC, Phoelich CC, Van Der Fits L & Lugtenberg BJJ (1998) A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7051-7056.
- Delmont TO, Robe P, Clark I, Simonet P & Vogel TM (2011) Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J Microbiol Methods* **86**: 397-400.
- Delorme TA, Gagliardi JV, Angle JS & Chaney RL (2001) Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. and the non metal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations. *Can J Microbiol* **47**: 773-776.
- Dell'Amico E, Cavalca L & Andreoni V (2005) Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **52**: 153-162.
- Dell'Amico E, Mazzocchi M, Cavalca L, Allievi L & Andreoni V (2008) Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiol Res* **163**: 671-683.
- Deng L, Li Z, Wang J, Liu H, Li N, Wu L, Hu P, Luo Y & Christie P (2016) Long-term field phytoextraction of zinc/cadmium contaminated soil by *Sedum plumbizincicola* under different agronomic strategies. *Int J Phytoremediation* **18**: 134-140.
- Dennis PG, Miller AJ & Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 313-327.
- DeSantis TZ, Brodie EL, Moberg JP, Zubieta IX, Piceno YM & Andersen GL (2007) High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb Ecol* **53**: 371-383.
- Dias ACF, Hoogwout EF, Pereira e Silva MdC, Salles JF, van Overbeek LS & van Elsas JD (2012) Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* **50**: 85-95.
- Díaz-Raviña M & Bååth E (1996) Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2970-2977.
- Diels L, Dong Q, van der Lelie D, Baeyens W & Mergeay M (1995) The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J Ind Microbiol* **14**: 142-153.
- Diez-Lázaro J, Kidd PS & Monterroso-Martinez C (2006) A phytogeochemical study of the Tras-os-Montes region (NE Portugal): Possible species for plant-based soil remediation technologies. *Sci Total Environ* **354**: 265-277.
- Ding GC, Heuer H & Smalla K (2012) Dynamics of bacterial communities in two unpolluted soils after spiking with phenanthrene: Soil type specific and common responders. *Front Microbiol* **3**.
- Doelman P (1986) Resistance of soil microbial communities to heavy metals. *Microbial communities in soil*, (Jensen V, Kioller A & Sorensen CH, eds.), 369-384. Elsevier Applied Science Publishers.
- Doelman P, Jansen E, Michels M & van Til M (1994) Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol Fertility Soils* **17**: 177-184.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D & Glick BR (2014) Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* **106**: 85-125.
- Egamberdieva D, Renella G, Wirth S & Islam R (2011) Enzyme activities in the rhizosphere of plants. *Soil Enzymology*, (Shukla G & Varma A, eds.), 149-166. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

- Elshahed MS, Youssef NH, Spain AM, Sheik C, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Roe BA, Davis JP, Schloss PD, Bailey VL, Krumholz LR (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5422-5428.
- Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ & Fry JC (2003) Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3223-3230.
- EPA (2004) Abandoned Mine Lands Team - Reference Notebook. U.S. Environmental Protection Agency.
- European Commission E (2014) Progress in the management of contaminated sites in Europe. Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Fagan MJ & Saier MHJ (1994) P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol* **38**: 57-99.
- Feinstein LM, Sul WJ & Blackwood CB (2009) Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5428-5433.
- Ferguson RL, Buckley EN & Palumbo AV (1984) Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl Environ Microbiol* **47**: 49-55.
- Fernández-Calviño D & Bååth E (2016) Interaction between pH and Cu toxicity on fungal and bacterial performance in soil. *Soil Biol Biochem* **96**: 20-29.
- Fernández-Calviño D, Arias-Estévez M, Díaz-Raviña M & Bååth E (2012) Assessing the effects of Cu and pH on microorganisms in highly acidic vineyard soils. *Eur J Soil Sci* **63**: 571-578.
- Fernández DA, Roldán A, Azcón R, Caravaca F & Bååth E (2012) Effects of water stress, organic amendment and mycorrhizal inoculation on soil microbial community structure and activity during the establishment of two heavy metal-tolerant native plant species. *Microb Ecol* **63**: 794-803.
- Ferrari BC, Binnerup SJ & Gillings M (2005) Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8714-8720.
- Ferreira M (1965) Geologia e petrologia da regio de Rebordelo-Vinhais. Tese de Doutoramento Thesis, Universidad de Coimbra (Portugal).
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R & Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4117-4120.
- Fischer SG & Lerman LS (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**: 191-200.
- Freitas H, Prasad MNV & Pratas J (2004) Analysis of serpentinophytes from north-east of Portugal for trace metal accumulation - relevance to the management of mine environment. *Chemosphere* **54**: 1625-1642.
- Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* **122**: 109-119.
- Gadd GM (2007) Roles of micro-organisms in the environmental fate of radionuclides. *Ciba Foundation Symposium 203 - Health Impacts of Large Releases of Radionuclides*, 94-108. John Wiley & Sons, Ltd.
- Gao M, Teplitski M, Robinson JB & Bauer WD (2003) Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**: 827-834.
- Garbeva P, van Veen JA & van Elsas JD (2004) Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 243-270.
- Garbeva P, van Elsas JD & van Veen JA (2008) Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil* **302**: 19-32.

- Germida JJ & Siciliano SD (2001) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biol Fertility Soils* **33**: 410-415.
- Germida JJ, Siciliano SD, de Freitas JR & Seib AM (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol Ecol* **26**: 43-50.
- Gillan DC, Danis B, Pernet P, Joly G & Dubois P (2005) Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* **71**: 679-690.
- Giller KE, Witter E & McGrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* **30**: 1389-1414.
- Glandorf DCM, Peters LGL, Van Der Sluis I, Bakker PAHM & Schippers B (1993) Crop specificity of rhizosphere pseudomonads and the involvement of root agglutinins. *Soil Biol Biochem* **25**: 981-989.
- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv* **21**: 383-393.
- Glick BR (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv* **28**: 367-374.
- Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* **169**: 30-39.
- Goldberg M, Pribyl T, Juhnke S & Nies DH (1999) Energetics and topology of *czcA*, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem* **274**: 26065-26070.
- Gołębiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A & Wróbel B (2014) 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microb Ecol* **67**: 1-13.
- Gomes PC, Fontes MPF, Da Silva AG, De Mendonça ES & Netto AR (2001) Selectivity sequence and competitive adsorption of heavy metals by Brazilian soils. *Soil Sci Soc Am J* **65**: 1115-1121.
- Gomez-Balderas CDC, Cochet N, Bert V, Tarnaud E & Sarde C-O (2014) 16S rDNA analysis of bacterial communities associated with the hyper accumulator *Arabidopsis halleri* grown on a Zn and Cd polluted soil. *Eur J Soil Biol* **60**: 16-23.
- Gonzalez H & Jensen TE (1998) Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* **93**: 179-185.
- Gourmelon V, Maggia L, Powell JR, Gigante S, Hortal S, Gueunier C, Letellier K & Carriconde F (2016) Environmental and geographical factors structure soil microbial diversity in New Caledonian ultramafic substrates: A metagenomic approach. *PLoS One* **11**: e0167405.
- Grandlic CJ, Geib I, Pilon R & Sandrin TR (2006) Lead pollution in a large, prairie-pothole lake (Rush Lake, WI, USA): Effects on abundance and community structure of indigenous sediment bacteria. *Environ Pollut* **144**: 119-126.
- Granér G, Persson P, Meijer J & Alström S (2003) A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 269-276.
- Grass G, Grosse C & Nies DH (2000) Regulation of the *cnr* Cobalt and Nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* **182**.
- Grass G, Fan B, Rosen BP, Lemke K, Schlegel H-G & Rensing C (2001) *NreB* from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a Nickel-induced transporter conferring Nickel resistance. *J Bacteriol* **183**: 2803-2807.
- Grayston SJ & Campbell CD (1996) Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology* **16**: 1031-1038.

- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD & Edwards AC (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* **30**: 369-378.
- Greenland (2014) Gentle remediation of trace element contaminated land. Best practice guidance for practical application of gentle remediation options (GRO). <http://www.greenland-project.eu/downloads/Greenland%20best-practice%20guide%20final.pdf>.
- Gremion F, Chatzinotas A & Harms H (2003) Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol* **5**: 896-907.
- Gremion F, Chatzinotas A, Kaufmann K, Von Sigler W & Harms H (2004) Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 273-283.
- Gupta N, Ram H & Kumar B (2016) Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Rev Environ Sci Bio-Tech* **15**: 89-109.
- Haferburg G & Kothe E (2007) Microbes and metals: Interactions in the environment. *J Basic Microbiol* **47**: 453-467.
- Haichar FeZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T & Achouak W (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J* **2**: 1221-1230.
- Hanbo Z, Changqun D, Qiyong S, Weimin R, Tao S, Lizhong C, Zhiwei Z & Bin H (2004) Genetic and physiological diversity of phylogenetically and geographically distinct groups of *Arthrobacter* isolated from lead-zinc mine tailings. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 333-341.
- Haney CJ, Grass G, Franke S & Rensing C (2005) New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**: 215-226.
- Hannula SE, de Boer W & van Veen JA (2010) In situ dynamics of soil fungal communities under different genotypes of potato, including a genetically modified cultivar. *Soil Biol Biochem* **42**: 2211-2223.
- Harrison JJ, Tremaroli V, Stan MA, Chan CS, Vacchi-Suzzi C, Heyne BJ, Parsek MR, Ceri H & Turner RJ (2009) Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol* **11**: 2491-2509.
- Harrison S (1999) Local and regional diversity in a patchy landscape: native, alien and endemic herbs on serpentine soils. *Ecology* **80**: 70-80.
- Hartmann A, Schmid M, Tuinen Dv & Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321**: 235-257.
- Hartmann M & Widmer F (2006) Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7804-7812.
- Hassen A, Saidi N, Cherif M & Boudabous A (1998) Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour Technol* **64**: 7-15.
- He LY, Zhang YF, Ma HY, Su LN, Chen ZJ, Wang QY, Qian M & Sheng XF (2010) Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Appl Soil Ecol* **44**: 49-55.
- He Z, Gentry TJ, Schadt CW, Wu L, Liebich J, Chong SC, Huang Z, Wu W, Gu B, Jardine P, Criddle C, Zhou J (2007) GeoChip: A comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *ISME Journal* **1**: 67-77.
- Head IM, Saunders JR & Pickup RW (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* **35**: 1-21.

- Héry M, Nazaret S, Jaffré T, Normand P & Navarro E (2003) Adaptation to nickel spiking of bacterial communities in neocaledonian soils. *Environ Microbiol* **5**: 3-12.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K & Wellington EMH (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3233-3241.
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der DLG* **98** 59-78.
- Hinojosa MB, Carreira JA, García-Ruiz R & Dick RP (2005) Microbial response to heavy metal-polluted soils: Community analysis from phospholipid-linked fatty acids and ester-linked fatty acids extracts. *J Environ Qual* **34**: 1789-1800.
- Hinsinger P, Gobran G, R. , Gregory P, J. & Wenzel W, W. (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol* **168**: 293-303.
- Hirsch PR, Mauchline TH & Clark IM (2010) Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol Biochem* **42**: 878-887.
- Hirsch PR, Jones MJ, McGrath SP & Giller KE (1993) Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. *Soil Biol Biochem* **25**: 1485-1490.
- Hosni T, Moretti C, Devescovi G, Suarez-Moreno ZR, Fatmi MB, Guarnaccia C, Pongor S, Onofri A, Buonauro R & Venturi V (2011) Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *ISME* **5**: 1857-1870.
- Huang A, Teplitski M, Rathinasabapathi B & Ma L (2010) Characterization of arsenic-resistant bacteria from the rhizosphere of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Can J Microbiol* **56**: 236-246.
- Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q & Vivanco JM (2014) Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* **92**: 267-275.
- Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hemsdorf AW, Amano Y, Ise K, Suzuki Y, Dudek N, Relman DA, Finstad KM, Amundson R, Thomas BC, Banfield JF (2016) A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* **1**: 16048.
- Hur M, Kim Y, Song H-R, Kim JM, Choi YI & Yi H (2011) Effect of genetically modified poplars on soil microbial communities during the phytoremediation of waste mine tailings. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7611-7619.
- Huysman F, Verstraete W & Brookes PC (1994) Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biol Biochem* **26**: 103-110.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW & Sessitsch A (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2667-2677.
- Igbinosa EO (2015) Effect of cassava mill effluent on biological activity of soil microbial community. *Environ Monit Assess* **187**: 1-9.
- Illumina Long-Read Sequencing Technology. (<https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/long-read-sequencing-technology.html>, ed.).
- İnceoğlu Ö, van Overbeek LS, Falcão Salles J & van Elsas JD (2013) Normal operating range of bacterial communities in soil used for potato cropping. *Appl Environ Microbiol* **79**: 1160-1170.
- ISO (2012) Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples (ISO 11063:2012).
- Izquierdo I, Caravaca F, Alguacil MM, Hernández G & Roldán A (2005) Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after

- revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Appl Soil Ecol* **30**: 3-10.
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1719-1728.
- Jiang L, Song M, Yang L, Zhang D, Sun Y, Shen Z, Luo C & Zhang G (2016) Exploring the influence of environmental factors on bacterial communities within the rhizosphere of the Cu-tolerant plant, *Elsholtzia splendens*. *Sci Rep* **6**: 36302.
- Jing Y-d, He Z-l & Yang X-e (2007) Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science B* **8**: 192-207.
- Jing YX, Yan JL, He HD, Yang DJ, Xiao L, Zhong T, Yuan M, de Cai X & Li SB (2014) Characterization of bacteria in the rhizosphere soils of *Polygonum pubescens* and their potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Int J Phytoremediation* **16**: 321-333.
- Johnson JM & Church GM (1999) Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps1. *J Mol Biol* **287**: 695-715.
- Jones DL & Hinsinger P (2008) The rhizosphere: complex by design. *Plant Soil* **312**: 1-6.
- Jones DL, Hodge A & Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol* **163**: 459-480.
- Jones JG (1977) The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwat Biol* **7**: 67-91.
- Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA & Janssen PH (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7210-7215.
- Jousset A, Lara E, Wall LG & Valverde C (2006) Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7083-7090.
- Juwarkar AA, Nair A, Dubey KV, Singh SK & Devotta S (2007) Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere* **68**: 1996-2002.
- Kabata-Pendias A & Pendias H (1999) *Biogeochemistry of trace elements*. Warsaw: PWN Scientific Publishing House.
- Kardol P, Cornips NJ, van Kempen MML, Bakx-Schotman JMT & van der Putten WH (2007) Microbe-mediated plant-soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecol Monogr* **77**: 147-162.
- Kawai M, Matsutera E, Kanda H, Yamaguchi N, Tani K & Nasu M (2002) 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **68**: 699-704.
- Kelly JJ, Häggblom M & Tate Iii RL (1999) Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol Biochem* **31**: 1455-1465.
- Kenarova A, Radeva G, Traykov I & Boteva S (2014) Community level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites. *Ecotoxicol Environ Saf* **100**: 226-232.
- Khan S, Cao Q, Hesham AEL, Xia Y & He Jz (2007) Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *J Environ Sci* **19**: 834-840.
- Kidd P, Barceló J, Bernal MP, Navari-Izzo F, Poschenrieder C, Shilev S, Clemente R & Monterroso C (2009) Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ Exp Bot* **67**: 243-259.

- Kidd P, Mench M, Álvarez-López V, Bert V, Dimitriou I, Friesl-Hanl W, Herzig R, Janssen JO, Kolbas A, Müller I, Neu S, Renella G, Ruttens A, Vangronsveld J, Puschenreiter M (2015) Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *Int J Phytoremediation* **17**: 1005-1037.
- Kidd PS, Álvarez-López V, Becerra-Castro C, Cabello-Conejo M & Prieto-Fernández Á (2017) Potential role of plant-associated bacteria in plant metal uptake and implications in phytotechnologies. *Adv Bot Res* **83**: 87-126.
- Kim J-S, Lee KC, Kim D-S, Ko S-H, Jung M-Y, Rhee S-K & Lee J-S (2015) Pyrosequencing analysis of a bacterial community associated with lava-formed soil from the Gotjawal forest in Jeju, Korea. *MicrobiologyOpen* **4**: 301-312.
- Kim M & Chun J (2014) Chapter 4 - 16S rRNA gene-based identification of *Bacteria* and *Archaea* using the EzTaxon server. *Methods in Microbiology*, Vol. Volume 41 (Michael Goodfellow IS & Jongsik C, eds.), 61-74. Academic Press.
- Kim S, Baek K & Lee I (2010) Phytoremediation and microbial community structure of soil from a metal-contaminated military shooting range: Comparisons of field and pot experiments. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **45**: 389-394.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H & Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* **58**: 169-188.
- Knox AS, Seaman JC, Mench MJ & Vangronsveld J (2000) Remediation of metal- and radionuclides-contaminated soils by in situ stabilization techniques. *Environmental Restoration of Metals-Contaminated Soils*, (Iskandar I-K, ed.) 21-60. Lewis Publishers, New York.
- Kogure K, Simudu U & Taga N (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol* **26**: 318-323.
- Kozdrój J (1995) Microbial responses to single or successive soil contamination with Cd or Cu. *Soil Biol Biochem* **27**: 1459-1465.
- Kozdrój J & van Elsas JD (2000) Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biol Biochem* **32**: 1405-1417.
- Kozdrój J & van Elsas JD (2001) Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Appl Soil Ecol* **17**: 31-42.
- Krämer U (2010) Metal hyperaccumulation in plants. Vol. 61 517-534.
- Kruckeberg AR (1984) *California serpentine: Flora, vegetation, geology, soils, and management problems*. Univ. of California Press, Berkeley.
- Kuffner M (2007) Identification of specific interactions between bacteria and heavy metal accumulating plants. Thesis, Universität für Bodenkultur Wien (BOKU) (Austria).
- Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M & Sessitsch A (2008) Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* **304**: 35-44.
- Kuffner M, De Maria S, Puschenreiter M, Fallmann K, Wieshammer G, Gorfer M, Strauss J, Rivelli AR & Sessitsch A (2010) Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *J Appl Microbiol* **108**: 1471-1484.
- Kumpiene J, Ore S, Renella G, Mench M, Lagerkvist A & Maurice C (2006) Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper, and arsenic in soil. *Environ Pollut* **144**: 62-69.
- Kumpiene J, Guerri G, Landi L, Pietramellara G, Nannipieri P & Renella G (2009) Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**: 115-119.

- Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H & Matsumoto S (2001) Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur J Soil Biol* **37**: 95-102.
- Küpper H, Lombi E, Zhao F-J & McGrath PS (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**: 75-84.
- Kuppusamy S, Thavamani P, Megharaj M, Venkateswarlu K, Lee YB & Naidu R (2016) Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in soils contaminated long-term with PAHs and heavy metals: Implications to bioremediation. *J Hazard Mater* **317**: 169-179.
- Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, Dunbar JM, Davis JA, Barns SM & Belnap J (2002) Comparison of soil bacterial communities in rhizosphere of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1854-1863.
- Lagos L, Maruyama F, Nannipieri P, Mora ML, Ogram A & Jorquera MA (2015) Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini review. *Jsoil sci plant nutri* **15**: 504-523.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, (Stackerbrandt E & Goodfellow M, eds.), 115-175. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England.
- Lasat MM (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J Environ Qual* **31**: 109-120.
- Lasken RS (2007) Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Curr Opin Microbiol* **10**: 510-516.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R & Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5111-5120.
- Law CJ, Maloney PC & Wang D-N (2008) Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* **62**: 289-305.
- Lebeau T, Braud A & Jézéquel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environ Pollut* **153**: 497-522.
- Lemanceau P, Corberand T, Gardan L, Latour X, Laguerre G, Boeufgras J & Alabouvette C (1995) Effect of two plant species, Flax (*Linum usitatissimum* L.) and Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent Pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1004-1012.
- Lenart-Boroń A & Boroń P (2014) The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils — A Review. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* (Hernandez-Soriano MC, ed.) InTech.
- Lenart A & Wolny-Koładka K (2013) The effect of heavy metal concentration and soil pH on the abundance of selected microbial groups within ArcelorMittal Poland steelworks in Cracow. *Bull Environ Contam Toxicol* **90**: 85-90.
- Leyval C & Berthelin J (1989) Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil* **117**: 103-110.
- Leyval C & Berthelin J (1993) Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. *Biol Fertility Soils* **15**: 259-267.
- Liesack W, Weyland H & Stackebrandt E (1991) Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb Ecol* **21**: 191-198.
- Lipman CB (1926) The bacterial flora of serpentine soils. *J Bacteriol* **12**: 315-318.
- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD & Knight R (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: e120.

- Lodewyckx C, Mergeay M, Vangronsveld J, Clijsters H & Van der Lelie P (2002) Isolation, characterization and identification bacteria associated with the zinc hiperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *Int J Phytoremediation* **4**: 101-115.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ & McGrath SP (2000) Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol* **145**: 11-20.
- Lombi E, Wenzel WW, Gobran GR & Adriano DC (2001) Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: A review. *Trace Elements in the Rhizosphere*, (Gobran GR, Wenzel WW & Lombi E, eds.), 3-24. Crc Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Lone MI, He Z-l, Stoffella PJ & Yang X-e (2008) Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University Science B* **9**: 210-220.
- Lopes AR, Manaia CM & Nunes OC (2014) Bacterial community variations in an alfalfa-rice rotation system revealed by 16S rRNA gene 454-pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol* **87**: 650-663.
- López-González G (1975) Contribución al estudio florístico y fitosociológico de Sierra de Aguas. *Acta botánica malacitana* **1**: 81-205.
- Lorenz K (2013) Ecosystem carbon sequestration. *Ecosystem services and carbon sequestration in the biosphere*, (Lal R, Lorenz K, Hüttl RF, Schneider BU & von Braun J, eds.), 39-62. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Lorenz N, Hintemann T, Kramarewa T, Katayama A, Yasuta T, Marschner P & Kandeler E (2006) Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. *Soil Biol Biochem* **38**: 1430-1437.
- Lovley DR & Coates JD (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr Opin Biotechnol* **8**: 285-289.
- Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J, Schleifer KH & Wagner M (2002) Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5064-5081.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**: 86-90.
- Lynch JM & Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**: 1-10.
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M & Freitas H (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv* **29**: 248-258.
- Maas JL & Stuntz DE (1969) Mycoecology on serpentine soil. *Mycologia* **61**: 1106 - 1116.
- Macías Vázquez F & Calvo de Anta R (1992) Suelos de la provincia de La Coruña. *Diputación Provincial de A Coruña Imprenta Provincial*.
- Malik A (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int* **30**: 261-278.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley

- RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376-380.
- Marrero-Coto J, Díaz-Valdivia A & Coto-Pérez O (2010) Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* **41**: 67-78.
- Marrero J, Auling G, Coto O & Nies DH (2007) High-level resistance to Cobalt and Nickel but probably no transenvelope efflux: Metal resistance in the Cuban *Serratia marcescens* strain C-1. *Microb Ecol* **53**: 123-133.
- Marschner H, Römheld V, Horst WJ & Martin P (1986) Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Z Pflanzenernähr Bodenkd* **149**: 441-456.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G & Catroux G (2001) DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2354-2359.
- Martos S, Gallego B, Sáez L, López-Alvarado J, Cabot C & Poschenrieder C (2016) Characterization of zinc and cadmium hyperaccumulation in three *Noccaea* (*Brassicaceae*) populations from non-metalliferous sites in the eastern pyrenees. *Front Plant Sci* **7**.
- Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri DV, Vivanco JM & Ramos-González MI (2010) *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ Microbiol Rep* **2**: 381-388.
- McGrath SP & Zhao F-J (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 277-282.
- McGrath SP & Zhao FJ (2015) Concentrations of metals and metalloids in soils that have the potential to lead to exceedance of maximum limit concentrations of contaminants in food and feed. *Soil Use and Manage* **31**: 34-45.
- McLaren RG, Clucas LM & Taylor MD (2005) Leaching of macronutrients and metals from undisturbed soils treated with metal-spiked sewage sludge. 3. Distribution of residual metals. *Soil Research* **43**: 159-170.
- McLaughlin MJ, Hamon RE, McLaren RG, Speir TW & Rogers SL (2000) Review: A bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Soil Research* **38**: 1037-1086.
- Meerts P & Van Isacker N (1997) Heavy metal tolerance and accumulation in metalcolous and non-metalcolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecol* **133**: 221-231.
- Mench M, Renella G, Gelsomino A, Landi L & Nannipieri P (2006) Biochemical parameters and bacterial species richness in soils contaminated by sludge-borne metals and remediated with inorganic soil amendments. *Environ Pollut* **144**: 24-31.
- Mench M, Vangronsveld J, Bleeker P, Ruttens A, Gebelen W & Lepp N (2006) Phytostabilisation of metal-contaminated sites. *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, Vol. 68 (Morel J-L, Echevarria G & Goncharova N, eds.), 109-190. Springer Netherlands.
- Mench M, Schwitzguebel JP, Schroeder P, Bert V, Gawronski S & Gupta S (2009) Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ Sci Pollut Res* **16**: 876-900.
- Mench M, Lepp N, Bert V, Schwitzguébel J-P, Gawronski SW, Schröder P & Vangronsveld J (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J Soils Sed* **10**: 1039-1070.
- Mendez MO & Maier RM (2008) Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev Environ Sci Bio-Tech* **7**: 47-59.

- Menezes de Sequeira E & Pinto da Silva AR (1991) Ecology of serpentinized areas of north-east Portugal. *The ecology of areas with serpentinized rocks A world view*, (Roberts BA & Proctor J, eds.), 169-197. Kluwer Academic, The Netherlands.
- Mengoni A, Schaat H & Vangronsveld J (2010) Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant Soil* **331**: 5-16.
- Mengoni A, Barzanti R, Gonnelli C, Gabbrielli R & Bazzicalupo M (2001) Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environ Microbiol* **3**: 691-698.
- Mengoni A, Grassi E, Barzanti R, Biondi EG, Gonnelli C, Kim CK & Bazzicalupo M (2004) Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb Ecol* **48**: 209-217.
- Mergeay M (1991) Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends Biotechnol* **9**: 17-24.
- Mertens J, Springael D, De Troyer I, Cheyns K, Wattiau P & Smolders E (2006) Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environ Microbiol* **8**: 2170-2178.
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies [mdash] the next generation. *Nat Rev Genet* **11**: 31-46.
- Miethling R, Wieland G, Backhaus H & Tebbe CC (2000) Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microb Ecol* **40**: 43-56.
- Miller MB & Bassler BL (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.
- Milling A, Smalla K, Maidl FX, Schloter M & Munch JC (2005) Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant Soil* **266**: 23-39.
- Moffett BF, Nicholson FA, Uwakwe NC, Chambers BJ, Harris JA & Hill TCJ (2003) Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 13-19.
- Montalbán B, Croes S, Weyens N, Lobo MC, Pérez-Sanz A & Vangronsveld J (2016) Characterization of bacterial communities associated with *Brassica napus* L. growing on a Zn-contaminated soil and their effects on root growth. *Int J Phytoremediation* **18**: 985-993.
- Monterroso C & Macías F (1998) Drainage waters affected by pyrite oxidation in a coal mine in Galicia (NW Spain): Composition and mineral stability. *Sci Total Environ* **216**: 121-132.
- Muehe EM, Weigold P, Adaktylou IJ, Planer-Friedrich B, Kraemer U, Kappler A & Behrens S (2015) Rhizosphere microbial community composition affects Cadmium and Zinc uptake by the metal-hyperaccumulating plant *Arabidopsis halleri*. *Appl Environ Microbiol* **81**: 2173-2181.
- Mulrooney SB & Hausinger RP (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 239.
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S & Sørensen SJ (2001) The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 11-19.
- Munkelt D, Grass G & Nies DH (2004) The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol* **186**: 8036-8043.
- Muyzer G, Dewaal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.

- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schafer H & Wawer C (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis in microbial ecology. *Molecular Microbial ecology manual* 3.4.4/1-27.
- Myers RM, Fischer SG, Lerman LS & Maniatis T (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **13**: 3131-3145.
- Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, Will C, Hodac L, Herold N, Schöning I, Schrupf M & Daniel R (2011) Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in german forest and grassland soils. *PLoS One* **6**: e17000.
- Nascimento AM & Chartone-Souza E (2003) Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Gen Mol Res* **31**: 92-101.
- Natarajan VP, Zhang X, Morono Y, Inagaki F & Wang F (2016) A modified SDS-based DNA extraction method for high quality environmental DNA from seafloor environments. *Front Microbiol* **7**: 986.
- Neal AL, Ahmad S, Gordon-Weeks R & Ton J (2012) Benzoxazinoids in root exudates of Maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS One* **7**: e35498.
- Nies D & Silver S (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* **14**: 186-199.
- Nies DH (1992) Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* **27**: 17-28.
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730-750.
- Nies DH (2000) Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: Molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia sp.* CH34. *Extremophiles* **4**: 77-82.
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313-339.
- Normander B & Prosser JI (2000) Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4372-4377.
- Nyrén P (2001) Method for sequencing DNA based on the detection of the release of pyrophosphate and enzymatic nucleotide degradation. Patents: US 6 258 568B1 and WO98/28440.
- Nyrén P (2007) The history of pyrosequencing®. *Pyrosequencing® Protocols*, (Walker JM & Marsh S, eds.), 1-13. Humana Press, Totowa, NJ.
- Oline D (2006) Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and non serpentine soils. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6965-6971.
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR & Stahl DA (1986) Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* **40**: 337-365.
- Osborn AM, Bruce KD, Strike P & Ritchie DA (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 239-262.
- Pal A, Wauters G & Paul AK (2007) Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant Soil* **293**: 37-48.
- Pal A, Dutta S, Mukherjee PK & Paul AK (2005) Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. *J Basic Microbiol* **45**: 207-218.
- Park JE, Schlegel HG, Rhie HG & Lee HS (2004) Nucleotide sequence and expression of the *ncr* nickel and cobalt resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **7**: 27-34.
- Parker SP (1989) McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms. (McGraw-Hill NY, ed.).

- Pascual J, Blanco S, García-López M, García-Salamanca A, Bursakov SA, Genilloud O, Bills GF, Ramos JL & van Dillewijn P (2016) Assessing bacterial diversity in the rhizosphere of *Thymus zygis* growing in the Sierra Nevada National Park (Spain) through culture-dependent and independent approaches. *PLoS One* **11**: e0146558.
- Paulsen IT & Saier J, M.H. (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **156**: 99-103.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES & Ley RE (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 6548-6553.
- Pennanen T, Frostegard A, Fritze H & Baath E (1996) Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl Environ Microbiol* **62**: 420-428.
- Pereira SIA & Castro PML (2014) Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environ Sci Pollut Res* **21**: 14110-14123.
- Pereira SIA, Pires C, Henriques I, Correia A, Magan N & Castro PML (2015) Assessment of rhizospheric culturable bacteria of *Phragmites australis* and *Juncus effusus* from polluted sites. *J Basic Microbiol* **55**: 1179-1190.
- Perez-de-Mora A, Burgos P, Madejon E, Cabrera F, Jaekel P & Schloter M (2006) Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biol Biochem* **38**: 327-341.
- Pérez-Latorre AV, Hidalgo-Triana N & Cabezudo B (2013) Composition, ecology and conservation of the south-Iberian serpentine flora in the context of the Mediterranean basin. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **70**: 62-71.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P & Van Der Putten WH (2013) Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* **11**: 789-799.
- Philippot L, Abbate C, Bispo A, Chesnot T, Hallin S, Lemanceau P, Lindström K, Pandard P, Romero E, Schloter M, Simonet P, Smalla K, Wilke BM, Petric I, Martin-Laurent F (2010) Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction. *J Soils Sed* 1-2.
- Pierson LS & Pierson EA (2007) Roles of diffusible signals in communication among plant-associated bacteria. *Phytopathology* **97**: 227-232.
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 15-39.
- Pini F, Spini G, Galardini M, Bazzicalupo M, Benedetti A, Chiancanesi M, Florio A, Lagomarsino A, Migliore M, Mocali S, Mengoni M (2014) Molecular phylogeny of the nickel-resistance gene *nreB* and functional role in the nickel sensitive symbiotic nitrogen fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Soil* **377**: 189-201.
- Pinto da Silva AR (1970) A flora e a vegetação das áreas ultrabásicas do Nordeste Transmontano. Subsídios para o seu estudo. *Agron Lusit* **30**: 175-364.
- Piotrowska-Seget Z, Cycoń M & Kozdrój J (2005) Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl Soil Ecol* **28**: 237-246.
- Podile AR & Kishore GK (2006) Plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria*, 195-230.
- Pollard AJ & Alan JMB (1997) Deterrence of herbivory by Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytol* **135**: 655-658.
- Pollard AJ, Reeves RD & Baker AJM (2014) Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Sci* **217-218**: 8-17.
- Poretzky RS, Gifford S, Rinta-Kanto J, Vila-Costa M & Moran MA (2009) Analyzing gene expression from marine microbial communities using environmental transcriptomics. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 1086.

- Porter SS, Chang PL, Conow CA, Dunham JP & Friesen ML (2017) Association mapping reveals novel serpentine adaptation gene clusters in a population of symbiotic *Mesorhizobium*. *ISME J* **11**: 248-262.
- Poschenrieder C, Tolrà R & Barceló J (2006) Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci* **11**: 288-295.
- Proctor J (1999) Toxins, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *Trends Ecol Evol* **14**: 334-335.
- Proctor J & Whitten K (1971) A population of the valley pocket gopher (*Thomomys bottae*) on a serpentine soil. *Am Midl Nat* **85**: 517 - 521.
- Proctor J & Roberts BA (1992) *The ecology of areas with serpentinized rocks: A world view (Geobotany)*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Puglisi E, Hamon R, Vasileiadis S, Coppolecchia D & Trevisan M (2012) Adaptation of soil microorganisms to trace element contamination: A review of mechanisms, methodologies, and consequences for risk assessment and remediation. *Crit Rev Environ Sci Technol* **42**: 2435-2470.
- Puschenreiter M, Schnepf A, Millan IM, Fitz WJ, Horak O, Klepp J, Schrefl T, Lombi E & Wenzel WW (2005) Changes of Ni biogeochemistry in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Plant Soil* **271**: 205-218.
- Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF & Sloan WT (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Meth* **6**: 639-641.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C & Moënne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **321**: 341-361.
- Rajapaksha RMCP, Tobor-Kaplon MA & Bååth E (2004) Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2966-2973.
- Rappé MS & Giovannoni SJ (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**: 369-394.
- Rastogi G & Sani RK (2011) Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications* (Ahmad I, Ahmad F & Pichtel J, eds.), 29-57. Springer New York, New York, NY.
- Reeves RD & Brooks RR (1983) Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from mining areas of Central Europe. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* **31**: 277-285.
- Reeves RD, Baker AJM, Borhidi A & Berazain R (1996) Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytol* **133**: 217-224.
- Renella G, Mench M, Gelsomino A, Landi L & Nannipieri P (2005) Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biol Biochem* **37**: 1498-1506.
- Renella G, Egamberdiyeva D, Landi L, Mench M & Nannipieri P (2006) Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. *Soil Biol Biochem* **38**: 702-708.
- Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS & Pace NR (1992) Differential amplification of ribosomal-DNA genes by polymerase chain-reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3417-3418.
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Funct Plant Biol* **28**: 897-906.
- Richardson AE & Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol* **156**: 989-996.
- Riesenfeld CS, Schloss PD & Handelsman J (2004) Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* **38**: 525-552.

- Roberts BA & Proctor J (1992) *The ecology of areas with serpentinized rocks: A world view*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Robinson BH, Brooks RR, Kirkman JH, Gregg PEH & Gremigni P (1996) Plant-available elements in soils and their influence on the vegetation over ultramafic ("serpentine") rocks in New Zealand. *JR Soc NZ* **26**: 457-468.
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG & Triplett EW (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* **1**: 283-290.
- Ronaghi M, Uhlén M & Nyrén P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**: 363.
- Ross S (1994) *Toxic metals in soil-plant systems*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Rosselli R, Romoli O, Vitulo N, Vezzi A, Campanaro S, de Pascale F, Schiavon R, Tiarca M, Poletto F, Concheri G, Valle G, Squartina A (2016) Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. *Sci Rep* **6**: 32165.
- Rosselló-Mora R & Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 39-67.
- Rubio-Sanz L, Prieto RI, Imperial J, Palacios JM & Brito B (2013) Functional and expression analysis of the metal-inducible *dmeRF* system from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 6414-6422.
- Ruggerone P, Murakami S, Pos KM & Vargiu AV (2013) RND efflux pumps: structural information translated into function and inhibition mechanisms. *Curr Top Med Chem* **13**: 3079-3100.
- Ryan P, Dessaux Y, Thomashow L & Weller D (2009) Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil* **321**: 363-383.
- Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, Reddy MS, Wei H-X, Paré PW & Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4927-4932.
- Saier MH (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 354-411.
- Saier MH (2003) Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol Microbiol* **48**: 1145-1156.
- Saier MH, Tam R, Reizer A & Reizer J (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11**: 841-847.
- Sait M, Hugenholtz P & Janssen PH (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol* **4**: 654-666.
- Salt DE, Smith RD & Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 643-668.
- Sambrook J & Russell DW (2006) Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols* **2006**: pdb.prot4455.
- Sandaa RA, Torsvik V & Enger Ø (2001) Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol Biochem* **33**: 287-295.
- Sandaa RA, Torsvik V, Enger Ø, Daae FL, Castberg T & Hahn D (1999) Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 237-251.
- Schechter S & Branco S (2014) The ecology and evolution of mycorrhizal fungi in extreme soils. *Plant Ecology and Evolution in Harsh Environments*, 33-52.
- Schechter SP & Bruns TD (2008) Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol Ecol* **17**: 3198 - 3210.

- Schlegel HG, Cosson JP & Baker AJM (1991) Nickel-hyperaccumulating plants provide a niche for nickel-resistant bacteria. *Botanical acta* **104**: 18-25.
- Schmidt T & Schlegel HG (1994) Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* **176**: 7045-7054.
- Schmidt T, Stoppel RD & Schlegel HG (1991) High-level nickel resistance in *Alcaligenes xylosoxydans* 31A and *Alcaligenes eutrophus* KTO2. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3301-3309.
- Schnitzer SA, Klironomos JN, HilleRisLambers J, Kinkel LL, Reich PB, Xiao K, Rillig MC, Sikes BA, Callaway RM, Mangan SA, van Nes EH, Scheffer M (2011) Soil microbes drive the classic plant diversity–productivity pattern. *Ecology* **92**: 296-303.
- Schreiter S, Ding GC, Grosch R, Kropf S, Antweiler K & Smalla K (2014) Soil type-dependent effects of a potential biocontrol inoculant on indigenous bacterial communities in the rhizosphere of field-grown lettuce. *FEMS Microbiol Ecol* **90**: 718-730.
- Schreiter S, Ding GC, Heuer H, Neumann G, Sandmann M, Grosch R, Kropf S & Smalla K (2014) Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front Microbiol* **5**.
- Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47-56.
- Sessitsch A & Puschenreiter M (2008) Endophytes and rhizosphere bacteria of plants growing in heavy metal-containing soils. *Microbiology of Extreme Soils*, Vol. 13 (Dion P & Nautiyal C, eds.), 317-332. Springer Berlin Heidelberg.
- Sessitsch A, Kuffner M, Kidd P, Vangronsveld J, Wenzel WW, Fallmann K & Puschenreiter M (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol Biochem* **60**: 182-194.
- Shahriar M, Haque MR, Kabir S, Dewan I & Bhuyian MA (2011) Effect of Proteinase-K on genomic DNA extraction from Gram-positive strains. *Stamford J Pharm Sci* **4**: 5.
- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS & Myers RM (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 232-236.
- Sheik CS, Mitchell TW, Rizvi FZ, Rehman Y, Faisal M, Hasnain S, McInerney MJ & Krumholz LR (2012) Exposure of soil microbial communities to Chromium and Arsenic alters their diversity and structure. *PLoS One* **7**: e40059.
- Silver S & Walderhaug M (1992) Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* **56**: 195-228.
- Simons M, Permentier HP, De Weger LA, Wijffelman CA & Lugtenberg BJJ (1997) Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 102-106.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H & Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4742-4751.
- Smit E, Leeftang P & Wernars K (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **23**: 249-261.
- Sørensen J (1997) The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms *Modern Soil Microbiology* (Van Elsas JD, Trevors JT & Wellington EMH, eds.), 21–45. Marcel Dekker Inc., New York.

- Sørensen J, Haubjerg Nicolaisen M, Ron E & Simonet P (2009) Molecular tools in rhizosphere microbiology—from single-cell to whole-community analysis. *Plant Soil* **321**: 483-512.
- Staley JT & Konopka A (1985) Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321-346.
- Steer J & Harris JA (2000) Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biol Biochem* **32**: 869-878.
- Stemmer M, Watzinger A, Blochberger K, Haberhauer G & Gerzabek MH (2007) Linking dynamics of soil microbial phospholipid fatty acids to carbon mineralization in a ¹³C natural abundance experiment: Impact of heavy metals and acid rain. *Soil Biol Biochem* **39**: 3177-3186.
- Stoppel RD & Schlegel HG (1995) Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2276-2285.
- Su C, Lei L, Duan Y, Zhang KQ & Yang J (2012) Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 993-1003.
- Subrahmanyam G, Shen J-P, Liu Y-R, Archana G & Zhang L-M (2016) Effect of long-term industrial waste effluent pollution on soil enzyme activities and bacterial community composition. *Environ Monit Assess* **188**: 1-13.
- Subrahmanyam G, Hu H-W, Zheng Y-M, Gattupalli A, He J-Z & Liu Y-R (2014) Response of ammonia oxidizing microbes to the stresses of arsenic and copper in two acidic alfisols. *Appl Soil Ecol* **77**: 59-67.
- Sumner ME (2000) Beneficial use of effluents, wastes, and biosolids. *Commun Soil Sci Plant Anal* **31**: 1701-1715.
- Taghavi S, Delanghe H, Lodewyckx C, Mergeay M & van der Lelie D (2001) Nickel-resistance-based minitransposons: New tools for genetic manipulation of environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1015-1019.
- Taj ZZ & Rajkumar M (2016) Perspectives of Plant Growth-Promoting Actinomycetes in Heavy Metal Phytoremediation. *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*, (Subramaniam G, Arumugam S & Rajendran V, eds.), 213-231. Springer Singapore, Singapore.
- Tate RL (2000) *Soil microbiology*. Hoboken: John Wiley and Sons Inc. USA.
- Thermo-Scientific Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X).
- Tian J, Wu N, Li J, Liu Y, Guo J, Yao B & Fan Y (2007) Nickel-resistant determinant from *Leptospirillum ferriphilum*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2364-2368.
- Tipayno S, Kim C-G & Sa T (2012) T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *Appl Soil Ecol* **61**: 137-146.
- Torsvik V, Goksoyr J & Daae FL (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**: 782-787.
- Torsvik V, Øvreås L & Thingstad TF (2003) Prokaryotic diversity—Magnitude, dynamics, and controlling factors *Science* **296** 1064 - 1066.
- Touceda-González M, Brader G, Antonielli L, Ravindran VB, Waldner G, Friesl-Hanl W, Corretto E, Campisano A, Pancher M & Sessitsch A (2015) Combined amendment of immobilizers and the plant growth-promoting strain *Burkholderia phytofirmans* PsJN favours plant growth and reduces heavy metal uptake. *Soil Biol Biochem* **91**: 140-150.
- Touceda-González M, Álvarez-López V, Prieto-Fernández Á, Rodríguez-Garrido B, Trasar-Cepeda C, Mench M, Puschenreiter M, Quintela-Sabarís C, Macías-García F & Kidd PS (2016) Aided phytostabilisation reduces metal toxicity, improves

- soil fertility and enhances microbial activity in Cu-rich mine tailings. *J Environ Manage.*
- Tsai Y-P, You S-J, Pai T-Y & Chen K-W (2005) Effect of cadmium on composition and diversity of bacterial communities in activated sludges. *Int Biodeterior Biodegrad* **55**: 285-291.
- Turgay OC, Görmez A & Bilen S (2012) Isolation and characterization of metal resistant-tolerant rhizosphere bacteria from the serpentine soils in Turkey. *Environ Monit Assess* **184**: 515-526.
- Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J, Heavens D, Alston M, Swarbreck D, Osbourn A, Grant A & Poole PS (2013) Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J* **7**: 2248-2258.
- Uren NC (2000) Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. *The Rhizosphere: Biochemistry, and Organic Substances at the Soil Interface* (Pinton R, Varani Z & Nanniperi P, eds.), 19-40. Marcel Dekker Inc., New York.
- Uroz S, Buée M, Murat C, Frey-Klett P & Martin F (2010) Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ Microbiol Rep* **2**: 281-288.
- van der Ent A, Baker AJM, van Balgooy MMJ & Tjoa A (2013) Ultramafic nickel laterites in Indonesia (Sulawesi, Halmahera): Mining, nickel hyperaccumulators and opportunities for phytomining. *J Geochem Explor* **128**: 72 - 79.
- van Elsas JD & Boersma FGH (2011) A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *Eur J Soil Biol* **47**: 77-87.
- Van Loon LC, Bakker PAHM & Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Vol. 36 453-483.
- Vangronsveld J & Clijsters H (2008) Toxic effects of metals. *Plants and the Chemical Elements*, 149-177. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Vangronsveld J, Van Assche F & Clijsters H (1995) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: In situ metal immobilization and revegetation. *Environ Pollut* **87**: 51-59.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res* **16**: 765-794.
- Vassilev A, Schwitzguébel J-P, Thewys T, van der Lelie P & Vangronsveld J (2004) The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *ScientificWorldJournal* **4**.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**: 571-586.
- Viñas Canals M (2005) Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis Doctoral Thesis, Universitat de Barcelona.
- Visioli G, D'Egidio S & Sanangelantoni AM (2015) The bacterial rhizobiome of hyperaccumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Front Plant Sci* **5**.
- Vivas A, Moreno B, del Val C, Macci C, Masciandaro G & Benitez E (2008) Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *J Environ Monit* **10**: 1287-1296.
- Wagner M, Amann R, Lemmer H & Schleifer KH (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1520-1525.
- Wagner M, Erhart R, Manz W, Amann R, Lemmer H, Wedi D & Schleifer KH (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus

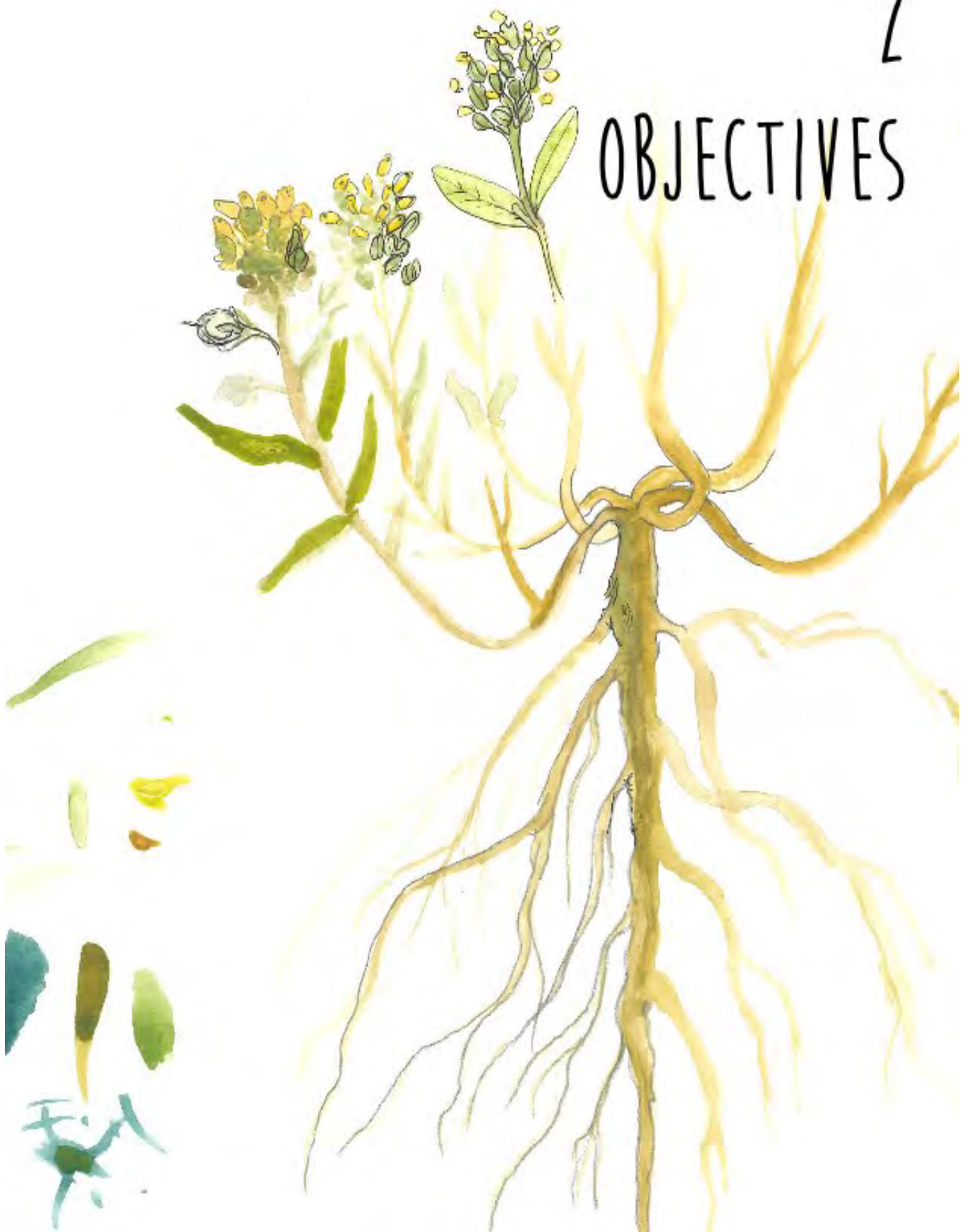
- Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **60**: 792-800.
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E & Vivanco JM (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* **132**: 44-51.
- Wang F, Yao J, Si Y, Chen H, Russel M, Chen K, Qian Y, Zaray G & Bramanti E (2010) Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity. *J Hazard Mater* **173**: 510-516.
- Wang G, Xu Y, Jin J, Liu J, Zhang Q & Liu X (2008) Effect of soil type and soybean genotype on fungal community in soybean rhizosphere during reproductive growth stages. *Plant Soil* **317**: 135-144.
- Wang Y, Shi J, Wang H, Lin Q, Chen X & Chen Y (2007) The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf* **67**: 75-81.
- Weinberg ED (1990) Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism. *Biol Met* **2**: 191-196.
- Wenzel WW, Adriano DC, Salt D & Smith R (1999) Phytoremediation: A plant-microbe-based remediation system. *Bioremediation of Contaminated Soils*, (Adriano DC, Bollag JM, Frankenberger WT & Sims RC, eds.), 457-508. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Whiting SN, De Souza MP & Terry N (2001) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ Sci Technol* **35**: 3144-3150.
- Whiting SN, Reeves RD & Richards D (2004) Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restor Ecol* **12**: 106 - 116.
- Whittaker RH (1954) The ecology of serpentine soils. *Ecology* **35**: 258-288.
- Willers C, Jansen van Rensburg PJ & Claassens S (2015) Microbial signature lipid biomarker analysis - an approach that is still preferred, even amid various method modifications. *J Appl Microbiol* **118**: 1251-1263.
- Winding A, Hund-Rinke K & Rutgers M (2005) The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicol Environ Saf* **62**: 230-248.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Wong MH (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* **50**: 775-780.
- Wuana RA & Okieimen FE (2011) Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* **2011**: 20.
- Wuertz S & Mergeay M (1997) The impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities. *Modern soil microbiology*, (Elsas JDvT, J. T.; Wellington, E. M. H., ed.) 607-642
- Xu J (2006) INVITED REVIEW: Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Mol Ecol* **15**: 1713-1731.
- Yergeau E, Sanschagrin S, Maynard C, St-Arnaud M & Greer CW (2014) Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. *ISME J* **8**: 344-358.
- Yu ZT & Morrison M (2004) Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4800-4806.
- Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z & Forney LJ (2012) Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One* **7**: e33865.
- Zgurskaya HI & Nikaido H (2000) Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* **37**: 219-225.

- Zgurskaya HI & Nikaido H (2000) Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 4264-4267.
- Zhang C, Nie S, Liang J, Zeng G, Wu H, Hua S, Liu J, Yuan Y, Xiao H, Deng L, Xiang H (2016) Effects of heavy metals and soil physicochemical properties on wetland soil microbial biomass and bacterial community structure. *Sci Total Environ* **557-558**: 785-790.
- Zhang J, Wang L-H, Yang J-C, Liu H & Dai J-L (2015) Health risk to residents and stimulation to inherent bacteria of various heavy metals in soil. *Sci Total Environ* **508**: 29-36.
- Zhang T, Shao M-F & Ye L (2012) 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J* **6**: 1137-1147.
- Zhang W-h, Huang Z, He L-y & Sheng X-f (2012) Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead-zinc mine tailings. *Chemosphere* **87**: 1171-1178.
- Zhu J, Zhang J, Li Q, Han T, Xie J, Hu Y & Chai L (2013) Phylogenetic analysis of bacterial community composition in sediment contaminated with multiple heavy metals from the Xiangjiang River in China. *Mar Pollut Bull* **70**: 134-139.



2

OBJECTIVES





Soil microorganisms are key players in biogeochemical cycles of trace elements (TE), decomposition and mineralisation of organic matter and organic pollutants, stabilisation of soil structure, etc., and are therefore essential for the correct functioning of soil ecosystems. The study of microbial communities associated with plants, especially of the microorganisms present in the rhizosphere, has increased markedly in the last decade. The rhizosphere, defined as the portion of soil directly influenced by the root activity, is characterised by physicochemical properties which differ from the surrounding soil and hosts specific microbial communities that are influenced by both the soil type and the plant. Rhizodeposits, mainly as root exudates, serve as signalling molecules and constitute an important source of energy and nutrients which affect the indigenous soil microbial populations and shapes the structure and function of the rhizosphere microbial community. Rhizosphere microbial communities are therefore dependent on the plant species but also on the subspecies or ecotype. Microorganisms inhabiting the rhizosphere are particularly important for plant establishment and growth and play important roles in nutrient and mobilisation, control of pathogens, improving resistance to stress, etc.

The work carried out in this thesis was focused on the study of microbial communities in the rhizosphere of plants growing in soils naturally enriched or contaminated in TE. TE are present in most soils in very low concentrations; however, in some areas, as in ultramafic soils, the concentration of some elements, such as Ni, Cr and Co, is naturally high because of the particular composition of the underlying ultramafic rocks. Plants have developed different strategies to cope with such naturally high metal concentrations: (hyper)accumulation (absorption and concentration in aboveground part of plants of large amounts of metals such as Ni and exclusion (reducing translocation of heavy metals to the aerial part) are opposing strategies to deal with the high metal concentrations in soils. In the ultramafic soils of the Iberian Peninsula examples of these two contrasting strategies can be found in two Ni-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium* (*lusitanicum* and *malacitanum*) and the metal-excluder *Dactylis glomerata*. Most of the published studies on the bacterial communities associated with hyperaccumulating plants has focused on culturable bacteria, which are known to represent only a minor fraction of soil bacterial communities. Moreover,

comparative studies analysing the rhizosphere microbiota of metal hyperaccumulators and excluders are scarce. Metal hyperaccumulators are of special interest for their use in phytoextraction or phytomining techniques. The detailed characterisation of the microorganisms inhabiting their rhizosphere and the comparison with those in the rhizosphere of non-accumulating plants can offer useful information for improving phytoextraction efficiency.

On the other hand, contaminated soils with high levels of TE due to anthropogenic activity are a worldwide problem. The treatment of this contaminated soil is necessary to prevent metal transfer to the food chain and to other ecosystem compartments. Among the remediation techniques used for this purpose, phytoremediation approaches based on the use of plants and their associated microorganisms can be applied to extensive areas and allows for the improvement or restoration of soil fertility and ecosystem functions. Depending on the characteristics of the site and the TE present, phytoremediation can be implemented to remove the contaminants via plant uptake (phytoextraction) using metal hyperaccumulators or high biomass-producing metal-accumulating plants or to immobilise metals (phytostabilisation) using metal-tolerant and often excluder plants (frequently in combination with soil amendments).

Soil microorganisms are very sensitive to changes in soil properties induced by contamination management. The study of microbial communities in phytomanaged sites is of great importance for monitoring the progress of the remediation and the improvement of soil properties and functionality.

The overall objectives of this thesis were i) to characterise and compare the bacterial communities associated with Ni-hyperaccumulating and metal excluding plants growing in ultramafic soils naturally enriched in TE and, ii) to analyse bacterial communities in soils contaminated with TE and treated with phytoremediation strategies. On one hand, the work planned aimed to obtain information about bacteria potentially involved in the mechanisms of TE (hyper) accumulation and/or exclusion and, on the other hand, to study the relationships between the bacterial communities and the changes induced in soil properties by phytomanagement. To achieve these objectives, the following studies were carried out in two different scenarios:

Scenario 1. Soils naturally rich in trace metals: Ultramafic soils.

The objective of the first study (**Chapter 3**) was to characterise and compare the bacterial communities in non-vegetated soil with rhizosphere bacterial communities associated with either the Ni-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium* (subsp. *lusitanicum* and subsp. *malacitanum*) or the metal-excluder *Dactylis glomerata* growing in different ultramafic soils of the Iberian Peninsula. The study was carried out in four serpentine areas of the Iberian Peninsula (Barazón, Morais, Samil and Sierra Bermeja) and the bacterial communities were studied using a culture-independent method, the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments. The PCR amplification addressed the total bacterial community and three bacterial groups (*Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomyetaceae*). Prominent DGGE bands of interest were excised, cloned and sequenced to identify relevant members of the bacterial communities analysed.

The following study (**Chapter 4**) aimed to further characterise the bacterial community in the rhizosphere of the two Ni- hyperaccumulating subspecies, *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* and *A. serpyllifolium* subsp. *malacitanum*. For this purpose, rhizosphere soil samples of the two Ni-hyperaccumulating plant subspecies and of non-vegetated soil were collected in two serpentine areas of the Iberian Peninsula (Barazón and Sierra Bermeja). The rhizosphere bacterial communities were characterised using two culture independent techniques, DGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing of 16S rDNA bacterial fragments. Additionally, the copy number of the gene *nccA* coding a subunit of a bacterial extrusion pump associated with tolerance to Cd, Co and Ni (*nccA*) was quantified by qPCR.

The study presented in **Chapter 5** was designed to analyse the bacterial colonisation of the rhizosphere of the two Ni-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium*, and of the Ni-excluder *Dactylis glomerata*. For this purpose, seedlings of *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* and subsp. *malacitanum* and of *Dactylis glomerata* were transplanted into pots filled with sterile substrate

enriched with ultramafic rock. During plant growth, the substrate was colonised by microbiota from underlying fresh ultramafic soil. The bacterial communities in planted and non-planted substrates were analysed by 16S rDNA PCR-DGGE of fragments amplified from the total bacterial community as well as from Alphaproteobacterial, Actinobacterial and *Streptomycetaceae* communities. The densities of heterotrophic bacteria and of Ni-tolerant bacteria were also determined using culture dependent methods.

Scenario 2. Soils contaminated by human activities

Finally, in **Chapter 6** the effect of phytomanagement on the microbial community structure, diversity and activity was investigated in six TE contaminated sites across Europe where different phytoremediation options were implemented. These sites have been managed for at least eight years using phytoextraction, aided phytostabilisation, and *in situ* stabilisation/phytoexclusion. The microbial community was investigated by applying 16S rDNA PCR-DGGE, and qPCR was used to quantify the copy number of genes involved in key processes of the soil N cycle (ammonia oxidation and denitrification). Moreover, the microbial biomass and activities of enzymes involved in C, P, N and S cycles was assessed.



RESULTS AND DISCUSSION





Chapter 3

BACTERIAL COMMUNITIES IN THE RHIZOSPHERE OF DIFFERENT POPULATIONS OF THE NI-HYPERACCUMULATOR *Alyssum serpyllifolium* and the metal-excluder *Dactylis glomerata* growing in ultramafic soils.

ABSTRACT

Ultramafic soils are characteristically deficient in nutrients, present low Ca/Mg ratios and high concentrations of trace elements (TE), and often support a unique flora. (Hyper)accumulation and exclusion are among the plant mechanisms developed to cope with excess metal concentrations. Hyperaccumulating plants are particularly interesting because of their potential application in phytoextraction. The present study used DGGE analysis of 16S rRNA gene fragments of the total bacterial community and of *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomyetaceae* to carry out a comparative study on bacterial communities in non-vegetated soils and in the rhizosphere of two subspecies of the Ni-hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* and of the Ni-excluder *Dactylis glomerata* growing in four serpentinitic sites of the Iberian Peninsula.

The rhizosphere bacterial communities were significantly different from communities in non-vegetated soils; this was observed in the four studied sites and at different taxonomic levels. Differences were generally more pronounced for *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* than for the total bacterial community. Moreover, the rhizobacterial communities associated with the hyperaccumulators and excluder plants also differed significantly. The dissimilarities were maximal in the case of Alphaproteobacterial communities. The CCA results indicate that in the non-vegetated soil the *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomyetaceae* communities are significantly influenced by intrinsic soil properties (such as total Ni or organic C content) while in the rhizosphere soil these factors were replaced by parameters related to nutrient availability (CEC or K availability) or, in the case of the excluder, the TE availability. The sequences of bands characteristic of *Alyssum* rhizosphere DGGE profiles indicated that *Actinobacteria* of the family *Geodermatophilaceae* (genera *Blastococcus*, *Geodermatophilus*, or *Modestobacter*) and of genera *Rhodococcus* and *Pseudonocardia*, as well as *Alphaproteobacteria* of genera *Devosia* and *Hyphomicrobium* are likely relevant members of the rhizobacterial community associated with this hyperaccumulator.



The manuscript of this study is in preparation for submission:

Touceda-González M, Kidd PS, Smalla K, Prieto-Fernández A 2018 Bacterial communities in the rhizosphere of different populations of the Ni-hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* and the metal-excluder *Dactylis glomerata* growing in ultramafic soils.

Chapter 4

SOIL AND RHIZOSPHERE BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH Ni-hyperaccumulating populations of *Alyssum serpyllifolium* in the Iberian Peninsula.

ABSTRACT

Ultramafic soils are characterised by low nutrient and organic matter contents, low Ca/Mg ratios, and high concentrations of trace elements. These soils constitute a hostile environment for plant growth and often support a unique flora with particular adaptations, such as mechanisms for (hyper)accumulation of trace elements (such as Ni). The study of the rhizobacterial communities associated with hyperaccumulating species is particularly interesting because of their potential role in the Ni-resistance and Ni-hyperaccumulation processes. In this study the diversity and structure of the rhizosphere bacterial communities of two Ni-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium* (endemic to the Iberian Peninsula) and of non-vegetated soil were characterised. The abundance of a gene coding Ni-Co-Cd extrusion pumps was also determined. The bacterial communities from all studied soils were dominated by *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* and *Firmicutes*. At high taxonomic level several of the most abundant bacterial taxa were significantly enriched in the rhizosphere of the two populations of *Alyssum* studied (*Acidobacteria* group 10, *Bacteroidetes* and *Alphaproteobacteria*) while other taxa showed a significantly higher abundance in non-vegetated soils (*Acidobacteria* group 1 and *Firmicutes*). At the family and genus level, the rhizosphere of both populations of *Alyssum* was remarkably enriched in members of *Blastococcus*, *Pseudonocardia*, *Methylobacterium* and of the *Rhodobacteraceae* family. Conversely, in the non-vegetated soils the relative abundance of OTUs affiliated to *Cohnella*, *Paenibacillus* and *Anaeromyxobacter* was higher than in the rhizosphere of *Alyssum*.

The bacterial communities in the two ultramafic sites analysed showed significant differences and these were more pronounced in the non-vegetated soils than in the rhizosphere. The relative abundance of *Acidobacteria* and *Actinobacteria* was higher in Barazón than in Sierra Bermeja and the opposite was observed for *Firmicutes* and *Alphaproteobacteria*. At a lower taxonomic level the main differences between the sites analysed was the enrichment in *Oxalobacteriaceae* and in members of the Actinobacterial genus *Illumatobacter* in Sierra Bermeja. The rhizosphere soil presented a high abundance of *nccA* gene copy numbers which is related to bacterial resistance to Cd, Ni or Co.



The manuscript of this study is in preparation for submission:

Touceda-González M, Kidd PS, Ding GC, Sessitsch A, Brader G, Smalla K, Prieto-Fernández A 2018 Soil and rhizosphere bacterial communities associated with Ni-hyperaccumulating populations of *Alyssum serpyllifolium* in the Iberian Peninsula.

Chapter 5

BACTERIAL COMMUNITIES COLONISING THE RHIZOSPHERE OF THE NI-HYPERACCUMULATOR *Alyssum serpyllifolium* and the Ni-excluder *Dactylis glomerata*.

ABSTRACT

Ultramafic soils, characterized by low levels of some nutrients, low Ca/Mg ratios and high concentrations of trace elements (TE), often support a unique flora. (Hyper) accumulation and exclusion are contrasting plant mechanisms which have been developed to cope with excess TE. Hyperaccumulator plants are of particular interest because of their potential application in phytoextraction or phytomining techniques. Plant roots act selectively on the composition and structure of the microbial community in their vicinity. Bacteria associated with hyperaccumulators have been suggested to influence metal mobility, thus also affecting plant metal uptake and accumulation.

The objective of this study was to compare the bacterial community initially colonising the rhizosphere of Ni-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium* with that of the Ni-excluder *Dactylis glomerata*. For this, young plants were transplanted to a sterile substrate enriched with ultramafic rock. During plant growth, the substrate was colonised by microbiota from the underlying fresh ultramafic soil. Bacterial community structure of planted and non-planted (control) substrates were analysed by 16S rRNA DGGE targeting *Bacteria*, *Alpha*- and *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomycetaceae*. The densities of heterotrophic bacteria and of Ni-tolerant bacteria were also determined using culture dependent methods.

Plants did not have significant effects on the culturable heterotrophic bacterial densities in the rhizosphere. However, the hyperaccumulator hosted a significantly higher density of Ni-tolerant bacteria in the rhizosphere compared to the Ni-excluder or control substrate. DGGE analysis of the total bacterial community and of specific groups revealed significant differences between control and planted substrates and between the rhizosphere soils of *Alyssum* and *Dactylis*. Some separation of rhizosphere fingerprints was also detected amongst the hyperaccumulating subspecies. A band from an organism phylogenetically related to *Gemmatimonas aurantica* was detected in the rhizosphere of *Alyssum* subspecies.



The manuscript of this study is in preparation for submission:

Touceda-González M, Casal-Lourido P, Kidd PS, Prieto-Fernández A 2018
Bacterial communities colonising the rhizosphere of the Ni-hyperaccumulator
Alyssum serpyllifolium and the Ni-excluder *Dactylis glomerata*.

Chapter 6

MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE AND ACTIVITY IN TRACE ELEMENT-CONTAMINATED SOILS (PHYTO)MANAGED BY *Gentle Remediation Options* (GRO).

ABSTRACT

Gentle remediation options (GRO) are based on the combined use of plants, associated microorganisms and/or soil amendments, which can potentially restore soil functions and quality. We studied the effects of three GRO [aided phytostabilisation, *in situ* stabilisation and phytoexclusion, and (aided) phytoextraction] on the soil microbial biomass and respiration, the activities of hydrolase enzymes involved in the biogeochemical cycles of C, N, P, and S, and bacterial community structure of trace element contaminated soils (TECS) from six field trials across Europe. Community structure was studied using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting of Bacteria, *Alpha*- and *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomyetaceae*, and sequencing of DGGE bands characteristic of specific treatments. The number of copies of genes involved in ammonia oxidation and denitrification were determined by qPCR.

Phytomanagement increased soil microbial biomass at three sites and respiration at the Biogeco site (France). Enzyme activities were consistently higher in treated soils compared to untreated soils at the Biogeco site. Phytomanagement induced shifts in the bacterial community structure at both, the total community and functional group levels, and generally increased the number of copies of genes involved in the N cycle (*nirK*, *nirS*, *nosZ*, and *amoA*). The influence of the main soil physico-chemical properties and trace element availability were assessed and eventual site-specific effects elucidated. Overall, our results demonstrate that phytomanagement of TECS influences soil biological activity in the long term.



This study formed part of the following publication:

Touceda-González M, Prieto-Fernández Á, Renella G, Giagnoni, L, Sessitsch A, Brader G, Kumpiene J, Dimitriou J, Eriksson J, Friesl-Hanl W, Galazka R, Janssen J, Mench M, Müller I, Neu S, Puschenreiter M, Siebielec G, Vangronsveld J, Kidd PS 2017 Microbial community structure and activity in trace element-contaminated soils (phyto)managed by Gentle Remediation Options (GRO). *Environmental pollution* 231: 237-251.

6.1 Introduction

Trace elements (TE), both metals and metalloids, are among the most frequently occurring soil contaminants at polluted sites across Europe (EEA, 2014). Excess TE concentrations have been identified by the European Commission (EC) as one of the eight major threats to European soils in line with food safety, animal and human health, and ecosystem services (COM, 2002). TE accumulation in soil has negative impacts on key ecological functions such as soil organic matter (SOM) decomposition, nutrient mineralization and specific groups of soil microorganisms (D'Ascoli *et al.*, 2006, Gomes *et al.*, 2010). Gentle soil Remediation Options (GRO) have been developed to (phyto)manage trace element contaminated soils (TECS) (Kidd *et al.*, 2015). GRO include *in situ* stabilisation (inactivation) and plant-based (generally termed phytoremediation) options, and refer to technologies which decrease the labile (bioavailable) pool and/or total content of TE in the soil. These techniques are mainly based on the use of plants and soil microorganisms, also aided by organic or inorganic amendments and soil management, which effectively reduce pollutant linkages associated with TECS while preserving the soil resource, and restoring the soil microbial diversity and ecological functions (Vangronsveld *et al.*, 2009). Phytoextraction aims to remove the most labile TE fractions from soils through their uptake and accumulation in harvestable plant parts, whereas (aided) phytostabilisation aims to establish a vegetation cover and progressively promote *in situ* inactivation of metal(loid)s by combining the use of TE-excluding plants sequestering high TE concentrations in their roots and soil amendments (Mench *et al.*, 2009, Vangronsveld *et al.*, 2009, Mench *et al.*, 2010). In TE-contaminated agricultural soils, risks of TE transfer through the food web can be minimised through the use of *in situ* stabilisation combined with phytoexclusion. Soil amendments and excluder-phenotype crops are used to restore and provide security for plant production and decrease TE transfer to humans, animals or the ecosystem to common requirements (Friesl-Hanl *et al.*, 2009).

Numerous studies have shown a reduction in the density, metabolic activity and diversity of microbial communities after long-term exposure to TE (Giller *et al.*, 1998, Kozdrój & van Elsas, 2000, Lorenz *et al.*, 2006, Renella *et al.*, 2006). Metal(loid)s in excess typically induce a shift in species composition and the

selection of TE-tolerant bacteria (Giller *et al.*, 1998, Kelly *et al.*, 1999, Mertens *et al.*, 2006, Pereira & Castro, 2014). Soil hydrolase enzyme activities are related to the mineralisation of nutrients and are highly sensitive to excess concentrations of soluble TE. They have been recommended as biochemical indicators for assessing evolution in soil quality during the remediation of TECS (Renella *et al.*, 2006, Renella *et al.*, 2011). Rapid positive responses of soil microbial activity and diversity in TECS cultivated with various pseudo-metallophytes and (hyper) accumulator plants have been reported (Epelde *et al.*, 2012, Xue *et al.*, 2015). Trace elements can have different impacts on specific groups of soil microorganisms (Gomes *et al.*, 2010), but the long term effects of various soil phytomanagement options on these have been less studied; indeed, the activity and composition of the soil microbial communities are key points for a full ecological restoration of TECS due to their role in nutrient cycling and availability (e.g. N, P) to plants. Within the N cycle, nitrification and denitrification are known to be sensitive soil microbial processes to excessive metal(loid) exposure (Gremion *et al.*, 2004, Broos *et al.*, 2005, Mertens *et al.*, 2009, Coppolecchia *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2014). Trace metal toxicity can reduce soil nitrification rates through negative effects on the diversity of *amo* genes and ammonia monooxygenase activity and consequent inhibition of ammonia oxidation rates (Broos *et al.*, 2005, Park & Ely, 2008, Liu *et al.*, 2014). Nitrification in soil is performed by both ammonia-oxidising bacteria and ammonia-oxidising archaea (AOB and AOA), but, to date, knowledge on the relative contributions of these two groups to N cycling in TECS under phytomanagement is poor.

The analysis of soil microbial community structure and functional activity can provide indications concerning the effectiveness of soil remediation practices and their long-term environmental sustainability. The aim of this study was to analyse the bacterial community structure, the diversity and number of copies of genes involved in key processes of the soil N cycle (ammonia oxidation and denitrification) and the microbial biomass and several enzymatic activities of soil from six TECS across Europe. Sites have been managed from mid- to long-term with phytoextraction, aided phytostabilisation, and *in situ* stabilisation/phytoexclusion.

6.2 Material and methods

6.2.1 Sites and soil sampling procedure

Soil samples were collected from untreated and treated plots of six European field trials in the EU GREENLAND project (FP7-KBBE-266124). Site conditions and soil physicochemical properties are presented in Table 6.1, 6.2, 6.3 and 6.4 (and also in (Kumpiene *et al.*, 2014)). At each site, three to five replicate soil samples were collected from the upper 20 cm layer per treatment (Table 6.1). Fresh soil samples were sieved to <2 mm and stored at 4 °C for biochemical analyses or at -60 °C until DNA extraction and molecular analyses.

6.2.2 Soil respiration, microbial biomass and enzyme activity

For measurement of soil respiration, samples of 10 g were incubated for 24 h at 25°C in 1 L air tight jars provided with a three-way valve for headspace gas sampling. The CO₂-C concentration was determined by gas chromatography (Blackmer & Bremner, 1977). Soil microbial biomass was estimated by measuring the ATP content according to Ciardi and Nannipieri (1990). Arylesterase activity was determined as described by Zornoza *et al.* (2009). Acid and alkaline phosphomonoesterase activities were assayed according to Tabatabai and Bremner (1969), and phosphodiesterase activity as reported by Browman and Tabatabai (1978). Arylsulfatase and β-glucosidase activities were determined according to Tabatabai (1982). All hydrolase activities were determined at 37 °C for 1 h, followed by centrifugation at 6000 x g at 4 °C. Concentrations of p-nitrophenol (p-NP) produced in the assays of arylesterase, acid and alkaline phosphomonoesterase, phosphodiesterase, arylsulfatase and β-glucosidase were determined by spectrophotometry (Lambda 2, Perkin Elmer) at 400 nm. Urease activity was determined according to Nannipieri *et al.* (1974), and the released NH₄⁺-N was extracted with 1M KCl and quantified by spectrophotometry at 660 nm after reaction with the Nessler reagent. Protease activity was determined using Na-caseinate as a substrate for 2 h at 50°C. Aromatic amino acids released during the assay were measured spectrophotometrically at 700 nm using the Folin–Ciocalteu reagent and the protease activity was expressed as mg of tyrosine per kg of soil per h⁻¹ using standard tyrosine solution for calibration. Biochemical soil properties were analysed by the group of Prof. Dr. Renella in the University degli studi di Firenze.

Table 6.1. Site descriptions.

Site/ management strategy	Country	TE	Description	Abbreviations
(Aided) phytoextraction				
Biogeco	France	Cu	GRO: Aided phytoextraction (since 2008) amendments: compost (5% w/w) plus dolomitic limestone (0.2% w/w) (OMDL); soil management crop rotation with tobacco and sunflower	BIOGECO_UNT BIOGECO_OMDL
Freiberg- Halsbrücke	Germany	As, Cd, Pb	GRO: Phytoextraction (since 2005) Soil amendments: none Soil management short rotation coppice (SRC) of <i>Salix</i> clone <i>Tora</i> for biomass production and TE extraction	FREI_UNT FREI_S
Högbytorp	Sweden	(Cd), Cr, Zn	GRO: Phytoextraction (since 1997) Soil amendments: none Soil management short rotation coppice (SRC) of <i>Salix</i> clone <i>Tora</i> for biomass production and TE extraction	HÖG_UNT HÖG_S
Lommel	Belgium	Cd, Zn, Pb	GRO: Phytoextraction (since 2005) Soil amendments: none Soil management short rotation coppice (SRC) of <i>Salix</i> clone <i>Tora</i> for biomass production and TE extraction	LOM_UNT LOM_S

***In situ* stabilisation / phytoexclusion**

Arnoldstein	Austria	As, Cd, Zn, Pb	GRO: <i>in situ</i> stabilisation/phytoexclusion (since 2003 ARN_D, 2006 ARN_B) Soil amendments: gravel sludge (GS), siderite-bearing materials (E), loamy powder (LP) or red mud (RM) in different combinations to immobilise TE in contaminated soil. Soil management: cultivated with maize and barley cultivars with different metal uptake characteristics (ARN_B) and grassland (ARN_D)	ARN_D_UNT ARN_D_GS+RM ARN_B_UNT ARN_B_GS+E ARN_B_LP
Pickary	Poland	Zn, Cd, Pb	GRO: stabilisation/phytoexclusion (since 1997) Soil amendments: by-product limestone (L) and municipal biosolids (B), at two rates (low -L and high -H) Soil management: site revegetation with a mixture of grasses.	PAS_UNT PAS_LB PAS_LB+LL PAS_HB+HL
Biogeco	France	Cu	GRO: aided phytostabilization (since 2006) Soil amendment: 2% of zerovalent iron grit and 5% of compost (OMZ) Soil management: revegetation by <i>Cytisus striatus</i> , <i>Populus nigra</i> , <i>Rumex acetosella</i> , <i>Agrostis capillaris</i> , <i>Agrostis gigantea</i> and other grasses	BIOGECO_UNT BIOGECO_OMZ

Table 6.2. Physicochemical properties of the untreated and treated soils of the Biogeco field site (France) where aided-phytoextraction and aided-phytostabilisation were implemented. Values are means \pm standard deviation (n=3).

Site	Biogeco		
Treatment	BIO_UNT	BIO_OMZ	BIO_OMDL
pH _{H2O}	7.8 \pm 0.1	7.5 \pm 0.0	7.1 \pm 0.0
pH _{KCl}	6.5 \pm 0.1	6.3 \pm 0.1	6.4 \pm 0.0
Available P ($\mu\text{g g}^{-1}$)	15.2 \pm 1.5	21.2 \pm 1.5	29.0 \pm 1.9
CEC ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	7.7 \pm 3.3	6.1 \pm 0.6	6.4 \pm 0.3
C (g kg^{-1})	8.4 \pm 0.5	16.7 \pm 2.9	15.4 \pm 1.0
N (g kg^{-1})	0.5 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0
C/N	15.9 \pm 0.2	17.4 \pm 0.6	16.7 \pm 0.8
<i>Pseudo-total and available Cu concentrations (mg kg^{-1})</i>			
Cu _T (mg kg^{-1})	1259 \pm 379	1861 \pm 40	1139 \pm 163
Cu _{H2O} (mg kg^{-1})	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.7 \pm 0.0
Cu _{EDTA} (mg kg^{-1})	893.5 \pm 99.6	865.3 \pm 8.6	718.0 \pm 31.5
Cu _{NH4NO3} (mg kg^{-1})	19.1 \pm 4.8	5.9 \pm 0.6	5.6 \pm 0.3

6.2.3 Microbial community structure

Total soil DNA was extracted using the FastDNA[®] SPIN Kit for soil (BIO101, Vista, CA). Briefly, 0.5 g of soil were treated with sodium phosphate buffer, TM buffer and PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol, 25:24:1 (v/v)) prior to three bead beating cycles (FastPrep FP120 disrupter, QBiogene, Irvine, CA). Pooled supernatants were extracted twice with PCI and once with chloroform-isoamyl (24:1 v/v) and thereafter the extraction continued according to the manufacturer instructions. DNA was further purified in low-melt agarose plugs (DNA: 1.6% agarose), which were submerged in TE buffer to allow the diffusion of inhibiting substances.

Amplification of 16S rRNA gene fragments of *Alpha*- and *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomycetaceae* was carried out using a (semi)-nested PCR approach. In the first PCR round group-specific primers were used (listed in Table 3.2 in the Chapter 3 of this thesis). In the second PCR round, the amplified PCR fragments were re-amplified using the bacterial primer pair F984GC/R1378 targeting the variable regions V6 to V8 of the 16S rRNA gene

(Table 3.2, Chapter 3). Primer pair F984GC/R1378 was also used in a non-nested approach to amplify 16S rDNA fragments of the total bacterial community. For the first PCR round a Hot Start Taq was used. The reaction mixture (50 μ L) contained 2 μ L DNA extract 1:10 diluted, 1.25 Units TrueStart Taq DNA Polymerase (Fermentas), 1x TrueStart Taq Buffer, 0.1 mM of each dNTP, 0.1 μ M of each primer, 2.5 mM MgCl₂, 4% (v/v) DMSO and 1.25 μ g/mL BSA. In the second PCR round, the reaction mixture (50 μ L) contained 2 μ L PCR product of the first reaction, 1.25 units DreamTaq Polymerase (Fermentas), 1x DreamTaq Buffer, 0.1 mM of each dNTP and 0.2 μ M of each primer. Thermal cycling conditions for each bacterial group are listed in Table 3.2 in the Chapter 3.

Table 6.3. Physicochemical properties of the untreated and treated soils at sites where phytoextraction was implemented. Values are means \pm standard deviation (n=3).

Site	Freiberg		Högbytorp*		Lommel	
Treatment	FREI_UNT	FREI_S	HÖG_UNT	HÖG_S	LOM_UNT	LOM_S
pH _{H2O}	6.0 \pm 0.2	6.1 \pm 0.1	6.9 \pm 0.1	7.4 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	6.8 \pm 0.4
pH _{KCl}	5.3 \pm 0.4	5.4 \pm 0.5	5.8 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1	6.0 \pm 0.5	5.7 \pm 0.1
Available P (μ g g ⁻¹)	29.3 \pm 4.7	16.1 \pm 5.7	21.6 \pm 10.3	48.8 \pm 1.3	59.4 \pm 5.1	52.5 \pm 7.3
CEC (cmol _c kg ⁻¹)	9.2 \pm 2.0	8.4 \pm 1.4	23.5 \pm 2.0	31.4 \pm 1.5	6.4 \pm 0.3	6.2 \pm 1.0
C (g kg ⁻¹)	2.7 \pm 0.5	2.1 \pm 0.4	34.5 \pm 0.9	54.0 \pm 2.7	22.0 \pm 0.2	19.0 \pm 1.7
N (g kg ⁻¹)	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	2.2 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3	0.8 \pm 0.0	0.8 \pm 0.2
C/N	12.1 \pm 0.9	12.5 \pm 1.6	15.8 \pm 1.8	15.6 \pm 1.9	28.7 \pm 0.7	24.4 \pm 3.0
<i>Pseudo-total metal concentration (mg kg⁻¹)</i>						
As _T	128.3 \pm 18.1	122.0 \pm 11.9	---	---	---	---
Cd _T	3.4 \pm 0.4	3.1 \pm 0.3	0.3*	0.2*	10.9 \pm 0.9	8.9 \pm 1.1
Cr _T	---	---	45.2*	36.5*	---	---
Pb _T	301.6 \pm 53.3	335.6 \pm 60.1	---	---	238.3 \pm 19.6	182.4 \pm 37.2
Zn _T	---	---	123.7*	95.1*	682.1 \pm 64.4	579.8 \pm 61.4
<i>EDTA-extractable metal concentration (mg kg⁻¹)</i>						
As _{EDTA}	1.0 \pm 0.1	1.2 \pm 0.3	---	---	---	---
Cd _{EDTA}	1.8 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	0.4 \pm 0.5	0.2 \pm 0.0	6.2 \pm 0.4	5.0 \pm 0.2
Pb _{EDTA}	165.2 \pm 4.9	195.8 \pm 22.6	---	---	203.5 \pm 20.3	151.2 \pm 4.1
Zn _{EDTA}	---	---	3.3 \pm 1.5	2.4 \pm 0.0	308.8 \pm 22.9	248.2 \pm 6.8

*No replicates available

Table 6.4. Physicochemical properties of the untreated and treated soils at the sites where *in situ* stabilisation and phytoexclusion were implemented. Values are means \pm standard deviation (n=3).

Site	Arnoldstein B						Arnoldstein D						Piekary								
	ARN B_UNT	ARN B_GSE	ARN B_LP	ARN D_UNT	ARN D_GSR	PAS UNT	ARN B_UNT	ARN B_GSE	ARN B_LP	ARN D_UNT	ARN D_GSR	PAS UNT	ARN B_UNT	ARN B_GSE	ARN B_LP	ARN D_UNT	ARN D_GSR	PAS UNT	PAS LB	PAS LB+LL	PAS HB+HL
pH _{H2O}	5.7±0.4	5.9±1.2	6.9±0.9	6.7±0.3	7.1±0.2	8.1±0.0	7.7±0.1	7.9±0.1	7.7±0.1	7.9±0.1	7.7±0.1	7.7±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	8.2±0.1
pH _{KCl}	5.3±0.9	5.9±0.1	5.5±0.2	5.4±0.5	6.3±0.1	7.9±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.9±0.1	6.3±0.1	7.9±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.7±0.1	8.0±0.1
Available P ($\mu\text{g g}^{-1}$)	11.3±1.0	8.8±0.3	10.3±0.3	8.2±1.2	8.6±0.3	2.3±1.2	5.0±2.2	5.0±2.2	2.3±1.2	8.6±0.3	2.3±1.2	5.0±2.2	5.0±2.2	5.0±2.2	5.0±2.2	5.0±2.2	5.0±2.2	5.0±2.2	5.0±2.2	3.1±0.6	2.5±0.3
CEC ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	6.7±0.6	12.8±0.7	13.0±0.1	17.6±0.8	24.2±0.9	50.4±2.2	45.2±8.8	45.2±8.8	50.4±2.2	24.2±0.9	50.4±2.2	45.2±8.8	45.2±8.8	45.2±8.8	45.2±8.8	45.2±8.8	45.2±8.8	45.2±8.8	45.2±8.8	50.5±5.4	56.0±1.7
C (g kg^{-1})	22.6±1.8	24.6±0.6	24.9±1.4	44.7±5.4	53.3±3.5	45.2±15.9	69.0±22.2	69.0±22.2	45.2±15.9	53.3±3.5	45.2±15.9	69.0±22.2	69.0±22.2	69.0±22.2	69.0±22.2	69.0±22.2	69.0±22.2	69.0±22.2	107.6±52.8	114.8±9.6	
N (g kg^{-1})	1.7±0.2	1.9±0.1	2.0±0.2	3.1±0.3	3.6±0.3	1.4±0.2	2.5±0.8	2.5±0.8	1.4±0.2	3.6±0.3	1.4±0.2	2.5±0.8	2.5±0.8	2.5±0.8	2.5±0.8	2.5±0.8	2.5±0.8	2.5±0.8	2.6±0.3	2.9±0.7	
C/N	13.0±0.5	12.9±0.7	12.4±0.9	14.4±0.2	15.0±0.4	32.8±14.2	29.0±11.2	29.0±11.2	32.8±14.2	15.0±0.4	32.8±14.2	29.0±11.2	29.0±11.2	29.0±11.2	29.0±11.2	29.0±11.2	29.0±11.2	29.0±11.2	40.1±20.0	41.8±13.4	
<i>Pseudo-total metal concentration (mg kg⁻¹)</i>																					
Cd _T	2.9±0.3	3.1±0.2	3.2±0.8	12.3±0.6	13.0±3.0	515±169	329±92	329±92	515±169	13.0±3.0	515±169	329±92	329±92	329±92	329±92	329±92	329±92	329±92	377±94	137±38	
Pb _T	575.8±73.3	649.6±8.6	628.1±10.7	1183±58	1213±290	13066±1601	6148±2249	6148±2249	13066±1601	1213±290	13066±1601	6148±2249	6148±2249	6148±2249	6148±2249	6148±2249	6148±2249	6148±2249	6897±1167	3006±705	
Zn _T	391.8±23.9	421±6.3	405.3±7.0	1967±126	2017±401	41751±11872	30434±4179	30434±4179	41751±11872	2017±401	41751±11872	30434±4179	30434±4179	30434±4179	30434±4179	30434±4179	30434±4179	30434±4179	30477±5706	22293±2780	
<i>EDTA-extractable metal concentration (mg kg⁻¹)</i>																					
Cd _{EDTA}	---	---	---	---	---	102.4±34.8	92.5±7.4	92.5±7.4	102.4±34.8	---	102.4±34.8	92.5±7.4	92.5±7.4	92.5±7.4	92.5±7.4	92.5±7.4	92.5±7.4	92.5±7.4	51.7±9.6	19.8±2.1	
Pb _{EDTA}	---	---	---	---	---	3013.2±495.6	3821.2±449.4	3821.2±449.4	3013.2±495.6	---	3013.2±495.6	3821.2±449.4	3821.2±449.4	3821.2±449.4	3821.2±449.4	3821.2±449.4	3821.2±449.4	3821.2±449.4	1780.2±396.7	578.1±105.1	
Zn _{EDTA}	---	---	---	---	---	2203.0±669.0	2130.7±67.9	2130.7±67.9	2203.0±669.0	---	2203.0±669.0	2130.7±67.9	2130.7±67.9	2130.7±67.9	2130.7±67.9	2130.7±67.9	2130.7±67.9	2130.7±67.9	1799.0±492.2	2196.7±280.1	

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed using a phorU₂ apparatus (Ingeny, Goes, The Netherlands). A double gradient (acrylamide and denaturant) was used for both community and group-specific 16S rRNA gene fragment separation. The gradient was composed of 46.5 to 65.0% of denaturant (100% denaturant corresponds to 7 M urea and 40% (v/v) formamide) and 6.2 to 9.0% acrylamide (Gomes *et al.*, 2005). The gels were run in 1× TAE buffer at a constant voltage of 140 V for 17 h at 58°C, and then stained following a conventional silver staining procedure. A marker composed of 16S rRNA gene fragments of 7 previously isolated bacterial strains was used.

DGGE bands of interest were excised and sequenced. Band sequences were aligned and compared with those of bacterial type strains using the tools available in the ribosomal database project (Cole *et al.*, 2014), except in the case of sequences < 200 bp which were compared with those in public databases using blast algorithm. Band sequences are available in the EMBL-EBI database (www.ebi.ac.uk) under the accession numbers given in Table 6.5.

Table 6.5. Phylogenetic affiliation and origin of the excised DGGE gel bands.

DGGE source	Sample	Closest sequence	Similarity	Accession number	Nomenclature
Biogeco					
Beta	OMDL	<i>Herbaspirillum sp.</i>	98	AB094401	BIOGECO1
Beta	OMDL	Sequence identical to Biogeco 3		DQ256728	BIOGECO2
Beta	OMZ	<i>Chitinimonas sp.</i>	97	DQ256728	BIOGECO3
Actino	OMDL	<i>Streptomyces prunicolor</i>	100	DQ026659	BIOGECO4
Actino	OMZ	<i>Amycolatopsis tolypomycina</i>	100	AJ293757	BIOGECO5
Actino	OMZ	<i>Mycobacterium sp.</i> *	90	AF480599	BIOGECO6
Piekary					
Alpha	LB	<i>Hyphomicrobium sp.</i>	96	AB543807	PAS 1
Alpha	LB+LL	<i>Hyphomicrobium sp.</i> *	97	Y14303	PAS 2
Actino	HB+HL	<i>Streptomyces sp.</i> *	99	NR112457.1	PAS 3
Actino	HB+HL	<i>Skermania sp.</i> *	90	Z35435	PAS 4
Strepto	UNT	<i>Streptomyces arenae</i>	100	AJ399485	PAS 5
Strepto	UNT	<i>Streptomyces galbus</i>	100	X79852	PAS 6
Strepto	LB	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i>	100	AB184208	PAS 7
Strepto	HB+HL	<i>Streptomyces umbrinus</i> *	99	EU834344.1	PAS 8
Arnoldstein					
Strepto	GS+RM	<i>Streptomyces cyaneus</i>	99	AF346475	ARN1

* For sequences <200bp, closest sequence in public databases is indicated. Percentage shown correspond to identity calculated with BLAST

6.2.4 Quantitative PCR analysis of genes *nirK*, *nirS*, *nosZ* and *amoA* genes

The abundance of the genes *nirK* and *nirS* (Cu and cytochrome *cd*₁ containing nitrate reductase genes, respectively), *nosZ* (N₂O reductase gene) and *amoA* genes (both bacterial and archaeal ammonia monooxygenase) was assessed by quantitative PCR (qPCR). qPCR amplification reactions were carried out with 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) master mix (Solis ByoDyne) on a Bio-Rad iQ5 Real Time PCR machine (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). An oligonucleotide primer concentration of 100 nM was used to amplify *nirK*, *nosZ* and bacterial *amoA* genes and 500 nM to amplify *nirS* and archaeal *amoA* genes. The degenerated primers and PCR cycling conditions used for the quantification of the different genes are given in Table 6.6. Aliquots of DNA from all soil samples studied were pooled and used as a template for primer evaluation. PCR products, with the expected size, were cloned with a StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) and 15 positive clones per gene were sequenced to verify that the amplified fragment corresponded to the target genes (LGC genomics, Belin, Germany). Cloned fragments of each gene were used as standards for preparing calibration curves for quantification as follows. PCR products from cloned fragments were purified with the kit MSB® Spin PCRapace (Stratec molecular, Berlin, Germany), quantified with NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) and the gene copy numbers were calculated with scienceprimer (<http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realttime-pcr>). Ten-fold serial dilutions of each PCR product were prepared and used to generate the qPCR standard curve.

The quantification of genes in soil samples was carried out with 4 µL of 1:40 diluted soil DNA added to the PCR master mix in 96 well plates. Negative controls without DNA template were included in all plates. Melting curves were evaluated to confirm the purity of the amplified products. Results are presented as the logarithm of the gene copy number per gram dry soil.

Table 6.6. Primer sequences and cycling conditions used for qPCR amplification of genes involved in the nitrogen cycle.

Target and primer set	Sequence (5'-3')	Cycling conditions	References
<i>nirK</i>			
nirK2F	GC(C/G)(C/A)T(C/G)ATGGT(C/G)CTGCC	94 °C 15 min. (1 cycle); 95 °C 1 min.,	(Braker et al., 1998)
nirK3R	GAACTTGCCGGT(A/C/G)G(C/T)CCAGAC	60 °C 1 min., 72 °C 45s (40 cycles)	
<i>nirS</i>			
nirS1F	CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T	94 °C 15 min. (1 cycle); 95 °C 1 min.,	(Braker et al., 1998)
nirS3R	GCCGCCGTC(A/G)TG(A/C/G)AGGAA	60 °C 1 min., 72 °C 45s (40 cycles)	
<i>nosZ</i>			
nosZF	CG(C/T)IGTTC(A/C)TCGACAGCCAG	94 °C 15 min. (1 cycle); 95 °C 1 min.,	(Kloos et al., 2001)
nosZ1662R	CG(G/C)ACCTT(G/C)TTGCC(G/C)T(C/T)GCG	60 °C 1 min., 72 °C 45s (40 cycles)	(Throbäck et al., 2004)
<i>amoA</i> Bacteria			
amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	94 °C 15 min. (1 cycle); 95 °C 1 min.,	(Mao et al., 2011)
amoA2R	CCCCTC(G/T)G(G/C)AAAGCCTTCTTC	60 °C 1 min., 72 °C 45s (40 cycles)	
<i>amoA</i> Archaea			
Arch-amoAF	(G/C)TAATGGTCTGGCTTAGACG	94 °C 15 min. (1 cycle); 95 °C 1 min.,	(Mao et al., 2011)
Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTAATG	56 °C 1 min., 72 °C 45s (40 cycles)	

6.2.5 Data analysis

Differences between treatments in soil respiration, microbial biomass, enzyme activities, and the abundance of nitrification and denitrification genes were assessed using the Students t-test for independent means (Freiberg, Högbytorp and Lommel) and a one-way analyses of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison of means using the *post-hoc* Least Significance Difference (LSD) Fisher test (Arnoldstein, Biogeco and Piekary). The statistical analysis was performed using STATISTICA 6 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma).

Analysis of DGGE profiles was performed using the GelCompar II program, version 6.0 (Applied Maths, Ghent, Belgium). The pairwise similarities of lanes were calculated for each gel using the Pearson correlation coefficient. Similarity matrices were used for cluster analysis by the unweighted pair-group method using average linkages (UPGMA). The statistical significance of the clusters was tested by a permutation test (Kropf *et al.*, 2004). Canonical Correspondence Analysis (CCA) were performed using the CANOCO 5 software (Microcomputer Power, USA) to relate DGGE fingerprinting or the abundance of nitrification and denitrification genes with physico- and bio-chemical soil properties (explanatory variables). Explanatory variables included in both CCA analyses were selected by manual forward selection including the permutation test (Monte Carlo permutations test). All the soil properties and biochemical and microbiological parameters for which the null hypothesis was excluded ($P < 0.05$) were included in the ordination. The DGGE bands which were best explained by the model (FitE values $> 75\%$) are represented in the CCA ordination plots and indicated in the DGGE dendrograms.

Bacterial diversity indices were calculated: richness (S) was the number of bands in each lane, and the Shannon-Wiener index (H') was calculated as $H' = -\sum P_i \log P_i$ (Shannon, 1948), where P_i of each band was n_i/N (n_i is the peak area of a band and N is the sum of all peak areas in the densitometric curve). Evenness (E) was calculated as $E = H'/H'_{\max}$, where $H'_{\max} = \log S$ (Pielou, 1969). Only those bands with a peak area exceeding 7.0 % of the strongest band in each lane (after normalization of the gels) were included for the calculation of diversity indices. Differences in H' and E were assessed using a Students t-test as above. Richness

indices were analysed using the Mann-Whitney U test. The statistical analysis was performed using STATISTICA 6 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma).

6.3 Results

6.3.1 Soil ATP content, respiration and enzyme activities

The ATP contents for the Biogeco, Lommel and Freiberg sites significantly increased ($P < 0.05$) in the phytomanaged soils (by 1.3- to 3.4-fold). In contrast, the ATP content for the Högbytorp site was significantly lower in the phytomanaged soil (by 1.3-fold; $P < 0.05$) (Figure 6.1). Soil basal respiration was only significantly increased in the Biogeco soils under aided phytostabilisation (OMZ) and aided phytoextraction (OMDL) (Figure 6.1).

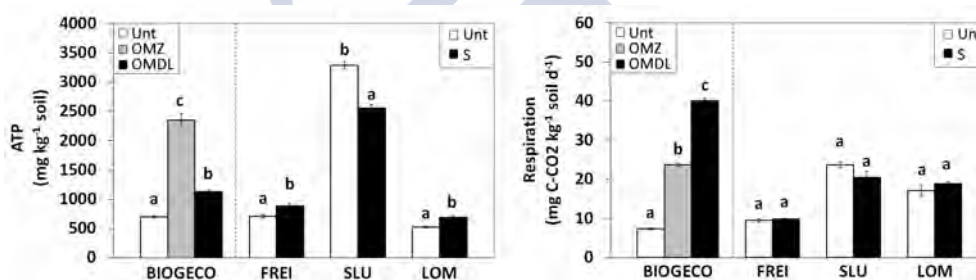


Figure 6.1. ATP content and basal respiration of untreated and phytomanaged soils in France (Biogeco), Germany (Frei), Sweden (HÖG) and Belgium (Lom). A different letter shows a significant difference between the untreated and phytomanaged soils at each site using one-way analysis of variance (ANOVA) with the Fisher's LSD *post hoc* test ($P < 0.05$), when assumptions of the ANOVA were not fulfilled, data were analyzed using Mann-Whitney *U* *post hoc* tests.

The effects of phytomanagement on the soil enzyme activities were generally site-specific. In the Biogeco phytomanaged soils, all soil enzyme activities increased, with the largest differences for urease and arylsulfatase activities (Figure 6.2). For the soils under phytoextraction with short rotation coppice (SRC), significant increases ($P < 0.05$) were observed for the acid and alkaline phosphomonoesterases and urease at Freiberg, and for arylsulfatase and protease activities at Lommel (Figure 6.2). For Högbytorp, the arylsulfatase, protease, acid phosphomonoesterase and β -glucosidase activities were lower in the SRC-phytomanaged soil than in untreated soil, whereas the phosphodiesterase activity was higher in the SRC-phytomanaged soil (Figure 6.2).

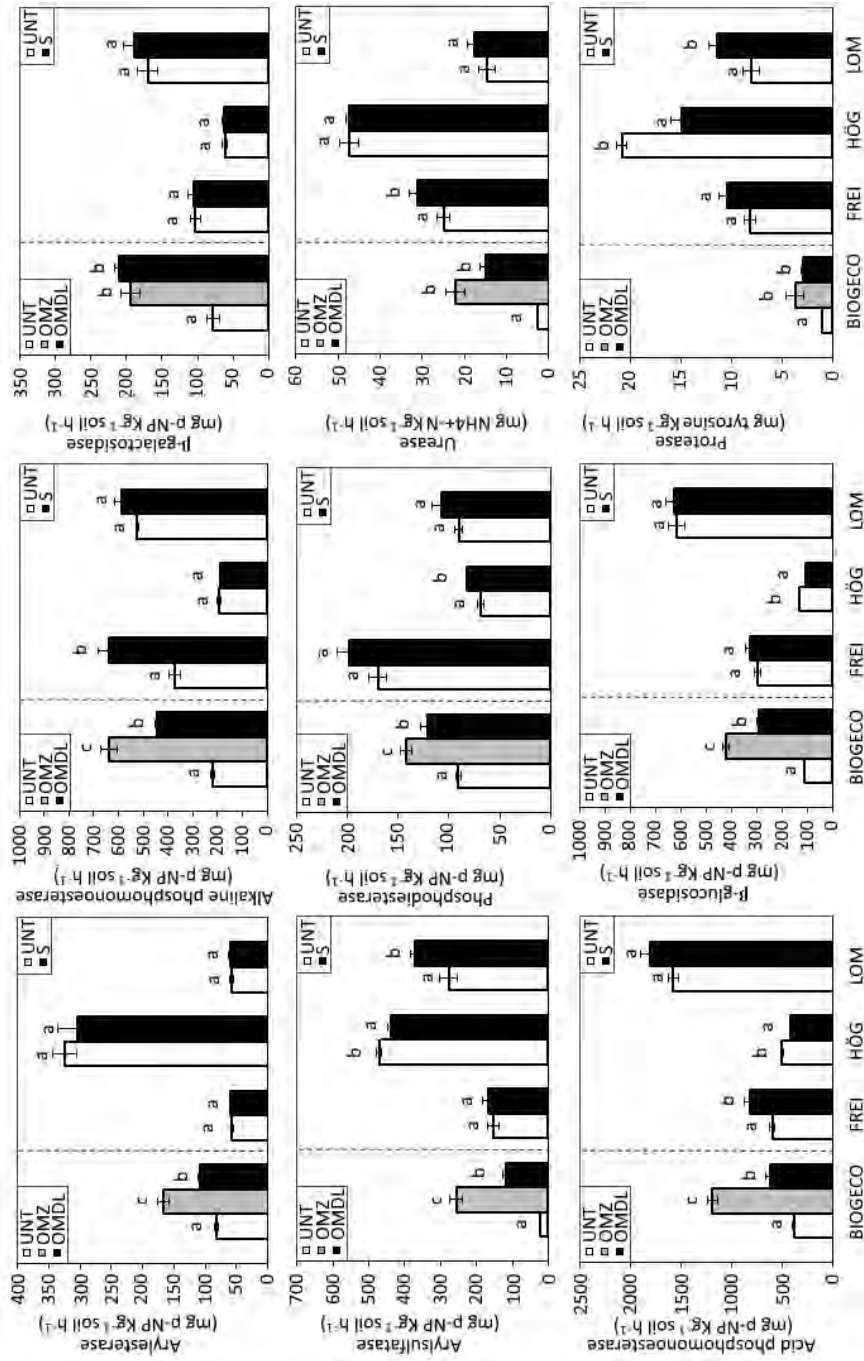


Figure 6.2. Enzyme activities of untreated and phytomanaged soils in France (Biogeco), Germany (Frei), Sweden (HÖG) and Belgium (Lom). A different letter shows a significant difference between the untreated and phytomanaged soils at each site using ANOVA with the Fisher's LSD *post hoc* test ($P < 0.05$), when assumptions of the ANOVA were not fulfilled, data were analyzed using Mann-Whitney *U* post hoc tests.

Significant correlations were found between soil ATP content, soil respiration, soil enzyme activities and soil physico-chemical properties (Table 6.2 to 6.4). For instance, ATP content and all soil enzyme activities were positively correlated with soil pH_{H2O} (P <0.01). Soil total and pore water Cu concentrations were negatively correlated with soil respiration. The water-extractable As in soil from the Freiberg site was positively correlated with ATP content (P <0.01).

Finally, both total and NH₄NO₃-extractable concentrations of Cd, Pb and Zn in the Lommel soil were negatively correlated with the activities of alkaline phosphatase and phosphodiesterase (P <0.01).

6.3.2 Bacterial diversity and community structures

6.3.2.1 Biogeco field site: (aided) phytoextraction and (aided) phytostabilisation

The similarity dendrogram based on bacterial DGGE profiles revealed a strong separation in community structure of untreated and phytomanaged soils which formed two distinct clusters with a similarity of less than 30% (Figure 6.3). Distinct DGGE clusters were also formed for either OMDL or OMZ treatments, sharing less than 50% similarity. Similar separations were observed on a phylogenetic group level, with a similarity of <30% (*Actinobacteria*), <40% (*Betaproteobacteria*) or <60% (*Alphaproteobacteria*), and <70% (*Streptomyetaceae*) between untreated and phytomanaged soils (Figures 6.4 to 6.7). As for whole bacterial communities, an effect of OMDL and OMZ amendments on distinct phylogenetic groups was found, particularly for *Betaproteobacteria* with a similarity between both groups of <40 % (Figure 6.5). Compared to the untreated soil, the Shannon diversity index was significantly higher in OMZ (*Actinobacteria*), the evenness index was significantly higher in both OMZ and OMDL (*Actinobacteria* and *Streptomyetaceae* (only OMDL)), and the richness index was significantly higher in OMZ (*Alphaproteobacteria*) and OMDL (*Betaproteobacteria*) (data not shown).

The permutation test indicated significant differences in the DGGE fingerprints between untreated soil and, either OMDL- or OMZ-amended soils (generally to a level of P <0.01; Table 6.7). This occurred when DGGE

fingerprints for the whole bacterial community were assessed, as well as those targeting individual groups. At the phylogenetic group level, differences were generally most pronounced for *Actinobacteria* and *Betaproteobacteria* (d values comparing the untreated soil with the treated soils ranged from 48 to 55 and 18 to 28, respectively). The DGGE fingerprints also differed significantly between OMDL and OMZ, and this was most pronounced for the total bacterial community and *Betaproteobacteria* (d values of 18 and 25; Table 6.7).

Table 6.7. Dissimilarity values obtained using the Kropf permutation test between 16S rRNA DGGE patterns of untreated soils (UNT) and soils where GRO were implemented ((aided) phytoextraction, (aided) phytostabilisation, *in situ* stabilisation and phytoexclusion). In those sites where more than one treatment was implemented the soils are compared on a pair-wise basis for each possible combination. Asterisks indicate the statistical significance of the clusters obtained when comparing treatments.

Site	Total	Alpha	Beta	Actino	Streptomyces
BIOGECO (France)					
UNT vs. OMZ	38.9**	14.3**	28.2**	47.8**	18.6**
UNT vs. OMDL	32.9**	19.9**	17.8*	55.3**	15.7**
OMZ vs. OMDL	25.5**	8.9**	25.1**	13.7**	12.4*
FREI (Germany)					
UNT vs. S	4.9	3.1	4.5	7.9*	4.5
HOG (Sweden)					
UNT vs. S	22.9**	10.6**	3.8*	11.1**	2.6**
LOM (Belgium)					
UNT vs. S	14.3	6.7	7.8	6.6	29.2
ARN_B (Austria)					
UNT vs. GS+E	11.2*	11.9*	33.3**	22.2**	5.5**
UNT vs. LP	7.7**	6.6**	27.1**	23.7**	8.1**
GS+E vs. LP	4.2**	2.6**	1.9*	6.8*	9.6**
ARN_D (Austria)					
UNT vs. GS+RM	9.3**	12.0**	25.3**	11.3**	22.9**
PAS (Poland)					
UNT vs. LB	31.6**	29.6**	9.4**	27.6**	48.3**
UNT vs. LB+LL	36.5**	23.7**	16.0**	30.4**	54.8**
UNT vs. HB+HL	39.5**	20.1**	16.7**	37.4**	61.1*
LB vs. LB+LL	45.6**	10.4**	2.1	12.4**	2.1*
LB vs. HB+HL	40.3**	16.2*	12.0**	32.7**	10.5*
LB+LL vs. HB+HL	16.9**	17.3**	11.2**	9.0*	7.0**

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

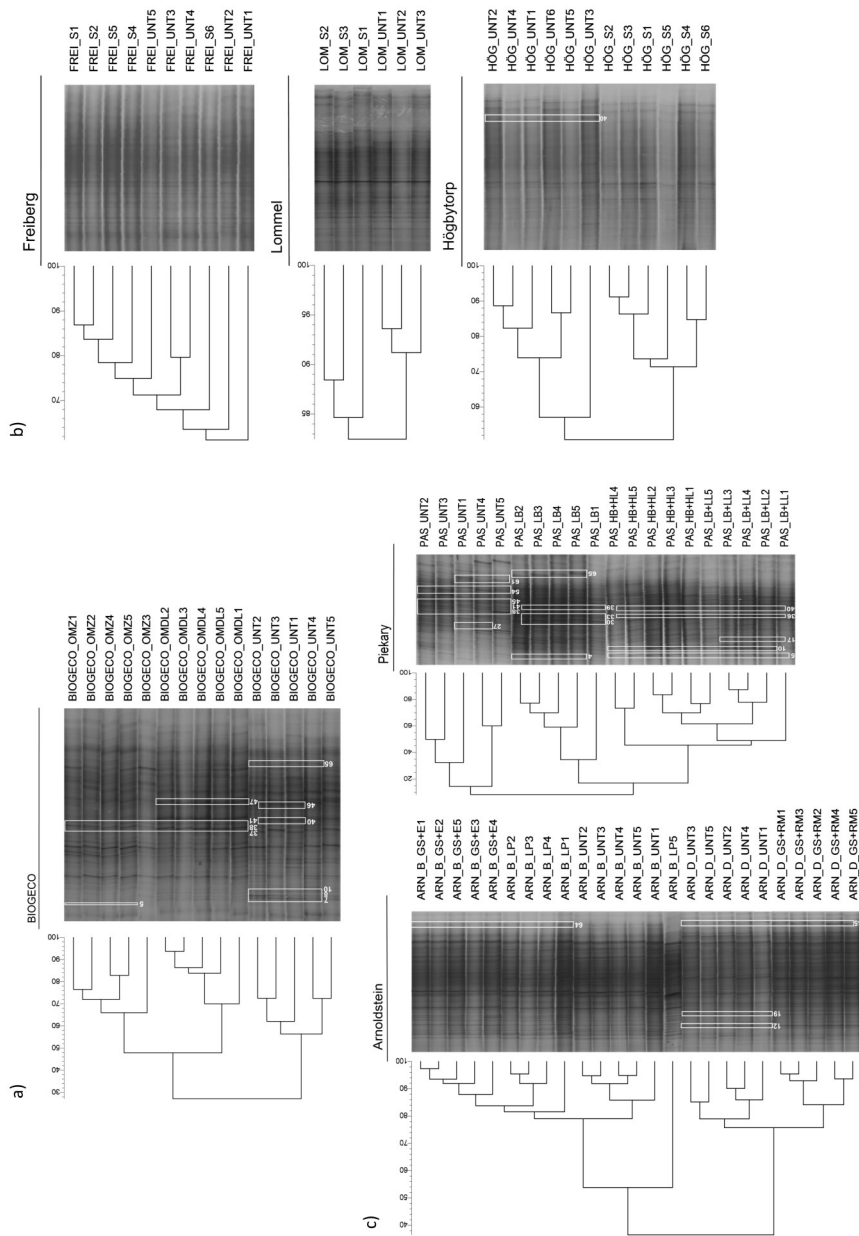


Figure 6.3. UPGM dendrogram based on Pearson's correlation similarity matrices of soil bacterial communities from untreated soils and soils where GRO were implemented. a) Biogeco site where aided-phytoextraction and aided-phytostabilisation was implemented; b) Freiberg, Högbytorp and Lommel sites where phytoextraction was implemented; and c) Arnoldstein and Piekary sites where *in situ* stabilisation and phytoexclusion was implemented. The numbered bands were found to have more influence in the model obtained in the CCA analysis.

A dominant band found in the OMZ and OMDL Betaproteobacterial DGGE profiles showed a sequence similar to *Chitinimonas* sp., while the sequence of a second discrete band in OMDL was similar to *Herbaspirillum* sp. Regarding the actinobacterial profiles, *Streptomyces prunicolor* was detected in OMDL and *Amycolatopsis tolypomycina* was distinctive of OMZ soils (Table 6.5).

6.3.2.2 Soils under phytoextraction (willow SRC)

For the Freiberg site, the genetic fingerprinting of the untreated and treated soils did not differ (ca. 80% similarity; Figure 6.3). A similar trend was observed in all the studied phylogenetic groups (Figures 6.4 to 6.7). However, permutation tests showed a significant between-group (untreated-treated soil) difference for *Actinobacteria* (d value of 8, Table 6.7).

For the Högbytorp soils, a clear separation between untreated and treated soils was observed, with <50% similarity (Figure 6.3). The same clustering of treated and untreated soils was observed for the studied phylogenetic groups, although the similarity values were approximately 80% (Figures 6.4 to 6.7). The Shannon diversity index was significantly higher in treated than in untreated soil for *Alphaproteobacteria*, whereas the evenness index was significantly reduced in the treated soil for *Betaproteobacteria* ($P < 0.05$; data not shown). Permutation tests showed that the differences between untreated and treated soils in DGGE profiles were statistically significant (d values varied from 3.8 to 22.9; $P < 0.001$, Table 6.7).

For the Lommel soil, the untreated and treated soils shared a similarity of bacterial profiles lower than 70% (Figure 6.3). For *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Actinobacteria* similarity was ca. 85%, whereas for the *Streptomyces* community it was less than 60% (Figures 6.4 to 6.7). Based on permutation tests, differences between the untreated and treated soils were not significant (Table 6.7). The Shannon diversity index was significantly higher in the treated soil compared to the untreated soil for *Alphaproteobacteria*, while the opposite was observed for *Betaproteobacteria*. Likewise, the evenness index was significantly increased in the treated soil for *Alphaproteobacteria*, but the richness index was significantly lower in the treated soil for *Betaproteobacteria* ($P < 0.05$).

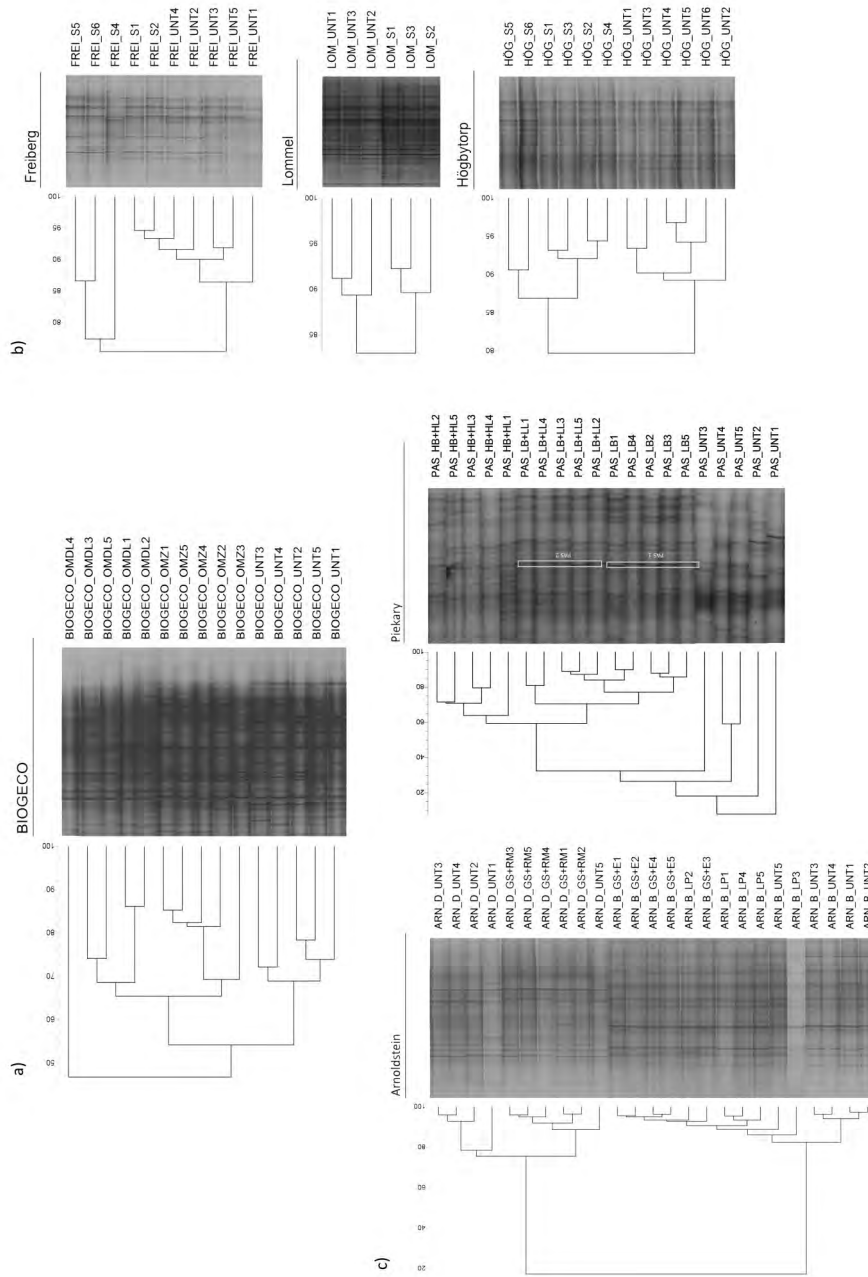


Figure 6.4. UPGM dendrogram based on Pearson's correlation similarity matrices of *Alphaproteobacteria* communities from untreated soils and soils where GRO were implemented. a) Biogeco site where aided-phytoextraction and aided-phytostabilisation was implemented; b), Freiberg, Högbytorp and Lommel sites where phytoextraction was implemented; and c) Arnoldstein and Piekary sites where *in situ* stabilisation and phytoexclusion was implemented. The numbered bands were found to have more influence in the model obtained in the CCA analysis.

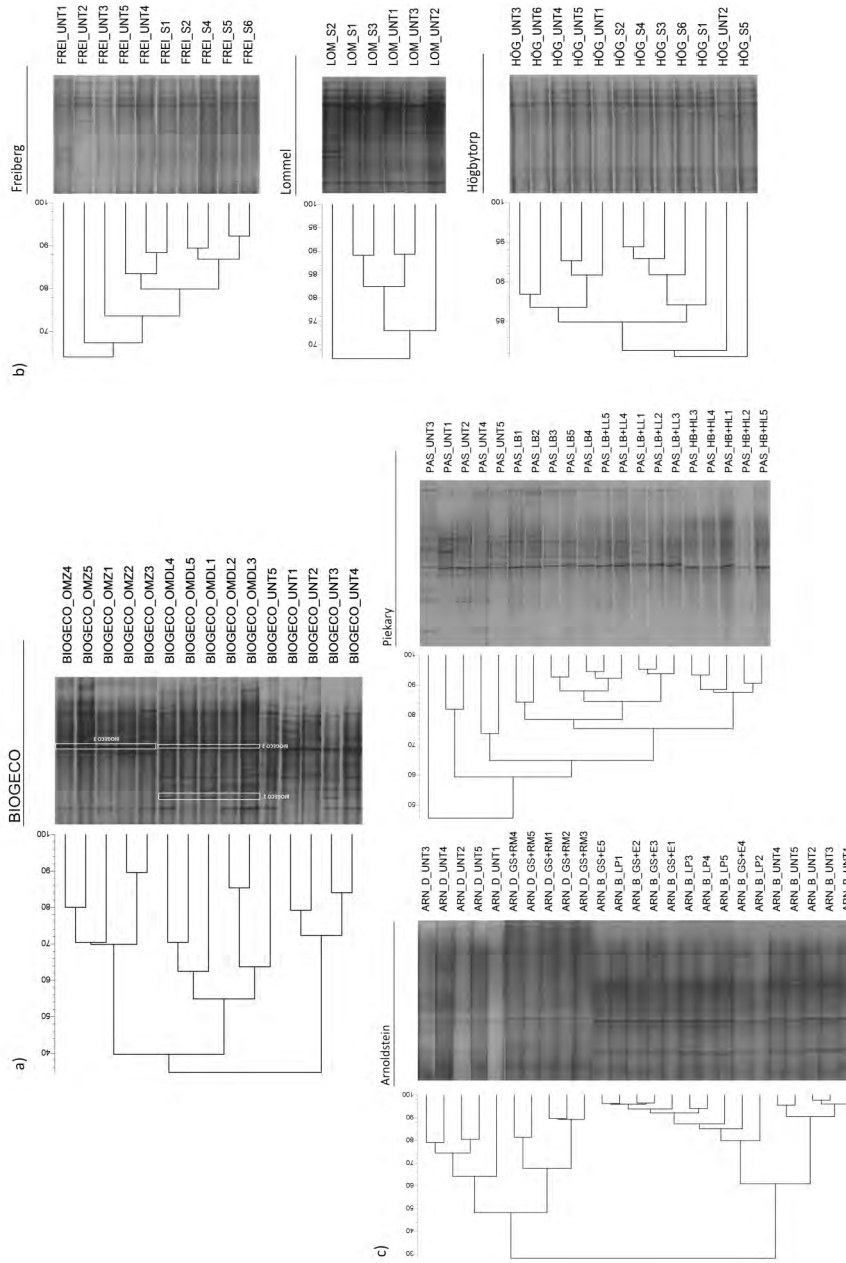


Figure 6.5. UPGM dendrogram based on Pearson's correlation similarity matrices of *Betaproteobacteria* communities from untreated soils and soils where GRO were implemented. a) Biogeco site where aided-phytoextraction and aided-phytostabilisation were implemented; b), Freiberg, Högytorp and Lommel sites where phytoextraction was implemented; and c) Arnoldstein and Pickary sites where *in situ* stabilisation and phytoexclusion was implemented. The numbered bands were found to have more influence in the model obtained in the CCA analysis.

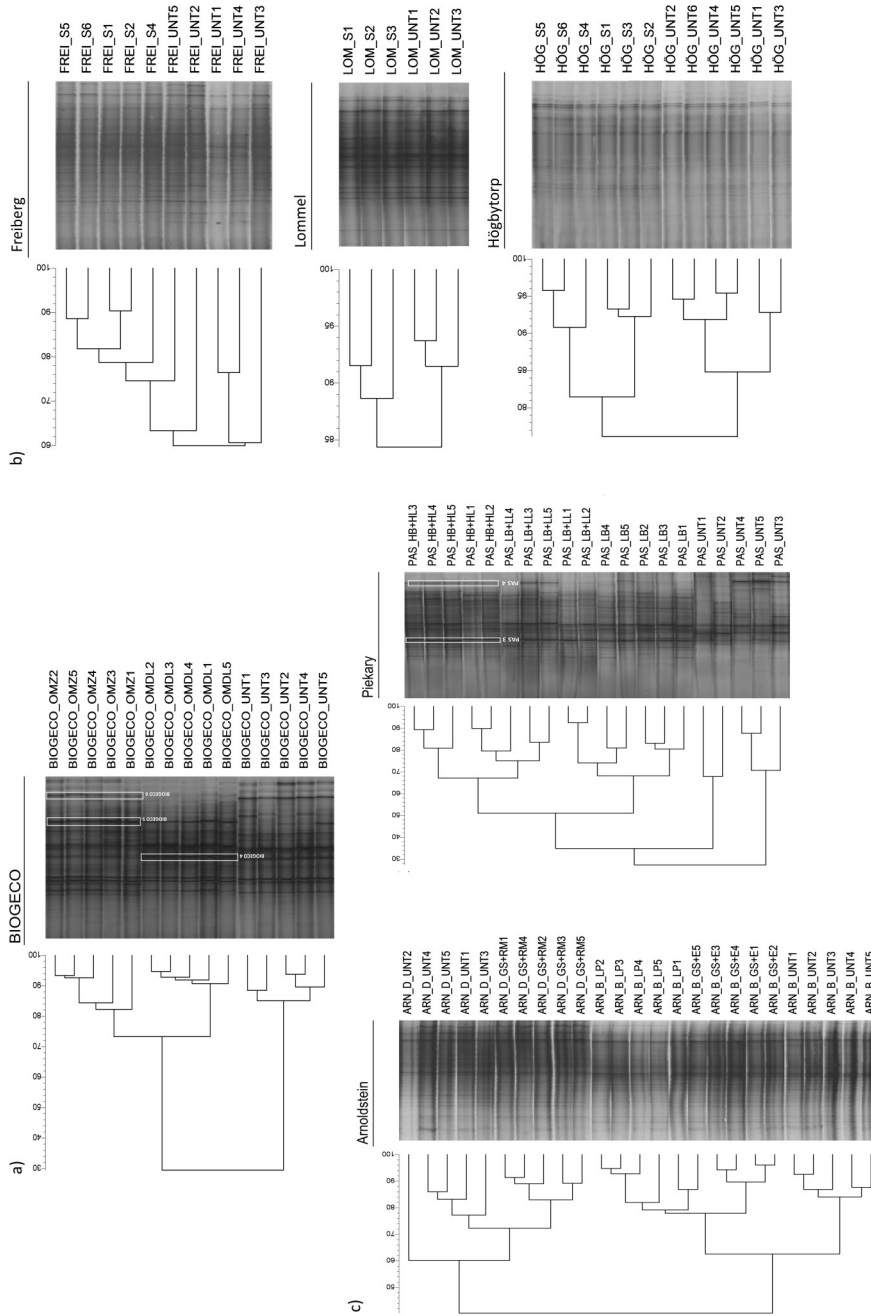


Figure 6.6. UPGM dendrogram based on Pearson's correlation similarity matrices of *Actinobacteria* communities from untreated soils and soils where GRO were implemented. a) Biogeco site where aided-phytoextraction and aided-phytostabilisation were implemented; b), Frelberg, Högbytorp and Lommel sites where phytoextraction was implemented; and c) Arnoldstein and Piekary sites where *in situ* stabilisation and phytoexclusion was implemented. The numbered bands were found to have more influence in the model obtained in the CCA analysis.

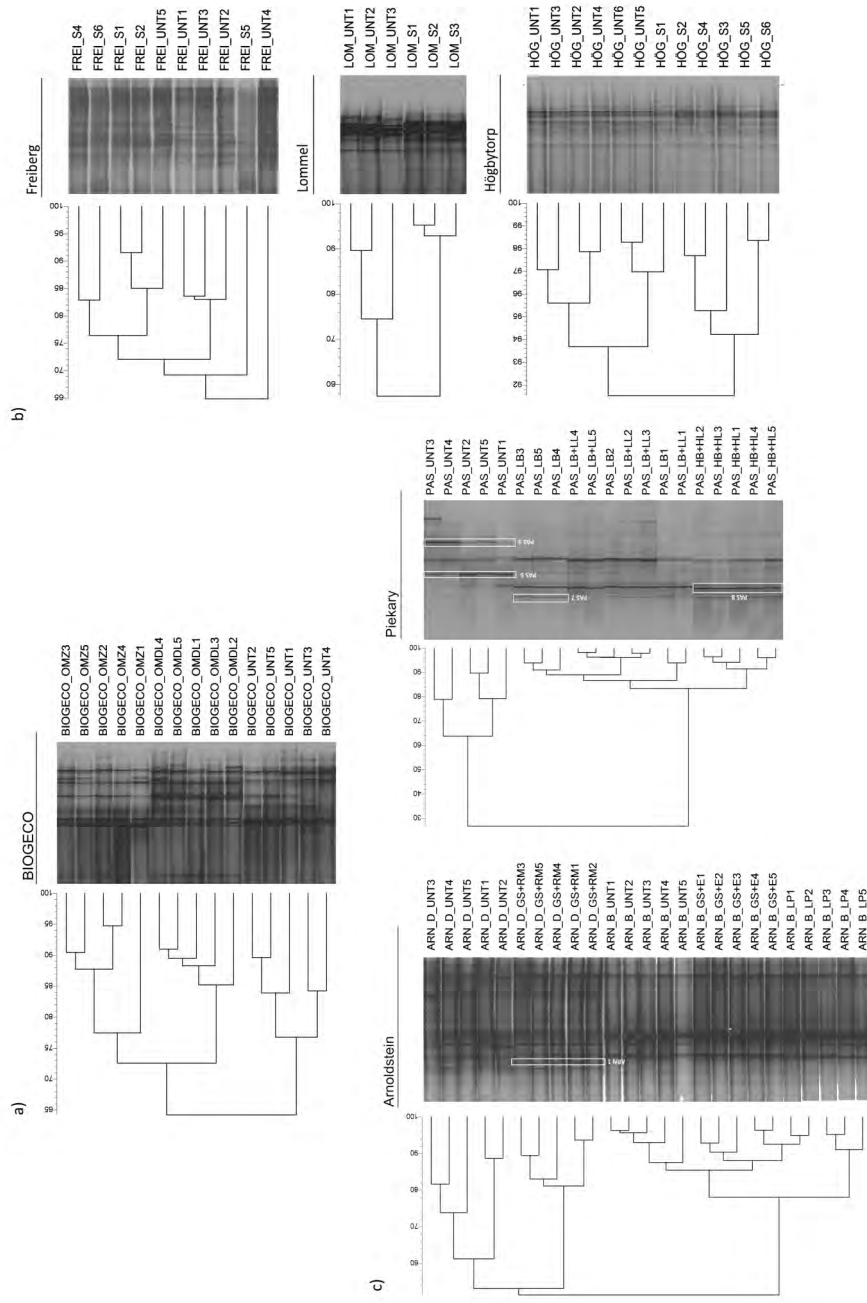


Figure 6.7. UPGM dendrogram based on Pearson's correlation similarity matrices of Streptomyces communities from untreated soils and soils where GRO were implemented. a) Biogeco sites where aided-phytoextraction and aided-phytostabilisation were implemented; b), Freiberg, Högbyttorp and Lommel sites where phytoextraction was implemented; and c) Arnoldstein and Piekary sites where *in situ* stabilisation and phytoexclusion was implemented. The numbered bands were found to have more influence in the model obtained in the CCA analysis.

6.3.2.3 Soils under in situ stabilisation and phytoexclusion

For the Arnoldstein soils, a strong separation in bacterial communities of soils from both studied sites, i.e. ARN_B (Cambisol, arable land) and ARN_D (Leptosol, grassland) either treated or untreated was observed, with similarities ranging from <20 to 50%, depending on the bacterial group (Figures 6.3 to 6.7). For the ARN_D soil, two separate clusters were formed, corresponding with untreated soil or ARN_D GS+RM. The similarity between both groups was <75% for the whole bacterial community and *Alphaproteobacteria*, <70 % in *Actinobacteria*, and <50 % for *Betaproteobacteria* and *Streptomycetaceae* (Figures 6.3 to 6.7). One band from the *Streptomycetaceae* profile of ARN_D soil treated with GS+RM was identified as *Streptomyces cyaneus* (similarity of 99 %; Table 6.5). Permutation tests showed significant differences between all treated and untreated soils for both ARN_D and ARN_B soils (generally to a level of $P < 0.01$), and between both treatments in ARN_B (GS+E vs. LP). This occurred for all studied bacterial groups (Table 6.7).

The Shannon diversity index was significantly lower in ARN_D GS+RM compared to the untreated soil, and the richness index was also lower in this treated soil for *Alphaproteobacteria* (data not shown). The evenness increased in ARN_D GS+RM soil as compared to ARN_D UNT (data not shown). In the ARN_B soil, the DGGE profiles of the ARN_B GS+E and ARN_B LP soils were more similar between them than to the untreated soil (Figures 6.3 to 6.7). For *Actinobacteria* and *Streptomycetaceae* differences between the ARN_B GS+E and ARN_B LP were larger. The Shannon index was significantly lower in the ARN_B LP soil than in untreated soil or ARN_B GS+E for *Bacteria*. In contrast, it was significantly higher in treated soils compared to untreated soils for *Betaproteobacteria* or *Streptomycetaceae* (only GS+E). The richness index increased in both treated soils compared to the untreated soil in *Betaproteobacteria*.

For the Piekary soils, the DGGE fingerprints showed a strong separation between untreated and treated soils (Figures 6.3 to 6.7). With the exception of the *Betaproteobacteria* the similarity between untreated and treated samples was generally <15 to 30%. The replicates of the untreated soils showed a high variability with a similarity of 20 to 60% between them. The bacterial

communities of the soils amended with biosolids and lime (PAS_HB+HL and PAS_LB+LL) were more similar to each other than those of the PAS_LB treatment (Figure 6.3). The similarity of the phylogenetic groups ranged between 70 and 90%, being higher for *Betaproteobacteria* and *Actinobacteria* (Figures 6.5 and 6.6). Moreover, for the *Streptomyetaceae* the Shannon index of untreated soil was significantly lower than that of treated soils (PAS_LB, PAS_LB+LL or PAS_HB+HL), increasing from 0.54 to 0.73-0.79. Based on permutation tests, separations between untreated-treated soils, as well as within treatments, were significant ($P < 0.01$; Table 6.7).

For the *Alphaproteobacteria* profiles, two bands characteristic of the treatments PAS_LB and PAS_LB+LL showed a sequence affiliated with the genus *Hyphomicrobium* sp. One band from the *Actinobacteria* profiles, characteristic of PAS_HB+HL, was affiliated with the genus *Streptomyces* sp. In *Streptomyetaceae* profiles, two bands characteristic of the untreated soil were identified as *Streptomyces arenae* and *Streptomyces galbus*, one band from the LB treatment was identified as *Streptomyces ciscaucasicus*, and one band from the HB+HL treatment as *Streptomyces tauricus* (Table 6.5).

6.3.3 Abundance of *nirK*, *nirS*, *nosZ*, AOB and AOA genes

The OMZ and OMDL amendments in the Biogeco soils significantly increased the copy numbers of *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes, with no significant differences in gene abundance between treatments (Figure 6.8). In contrast, these soil amendments did not affect the abundance of AOB and AOA nitrification genes (Figure 6.9). Significant positive correlations were found between pH and CEC in the Biogeco soils and the abundance of bacterial *amoA* ($P < 0.01$). In addition, total Cu soil pore water concentrations were negatively correlated with the abundances of *nirK*, *nirS* and *nosZ*.

Minor differences were observed between untreated and treated soils for the three sites where phytoextraction was implemented. The abundance of *nirS* increased in Högbytorp soil and that of *nirK* in both Freiberg and Högbytorp soils under SRC (Figure 6.8), whereas no differences were found between the Lommel treated and untreated soils. The abundance of bacteria and archaea *amoA* genes did not differ in untreated and treated soils under SRC phytoextraction

management. For the Högbytorp soil, the soil pH value and total TE concentrations were positively correlated with the abundances of *nirK* and *nirS* genes. The NH_4NO_3 -extractable TE concentrations were positively correlated with the *nosZ* gene in the Lommel soils and with *nirK* and *nirS* genes in the Högbytorp soils ($P < 0.01$).

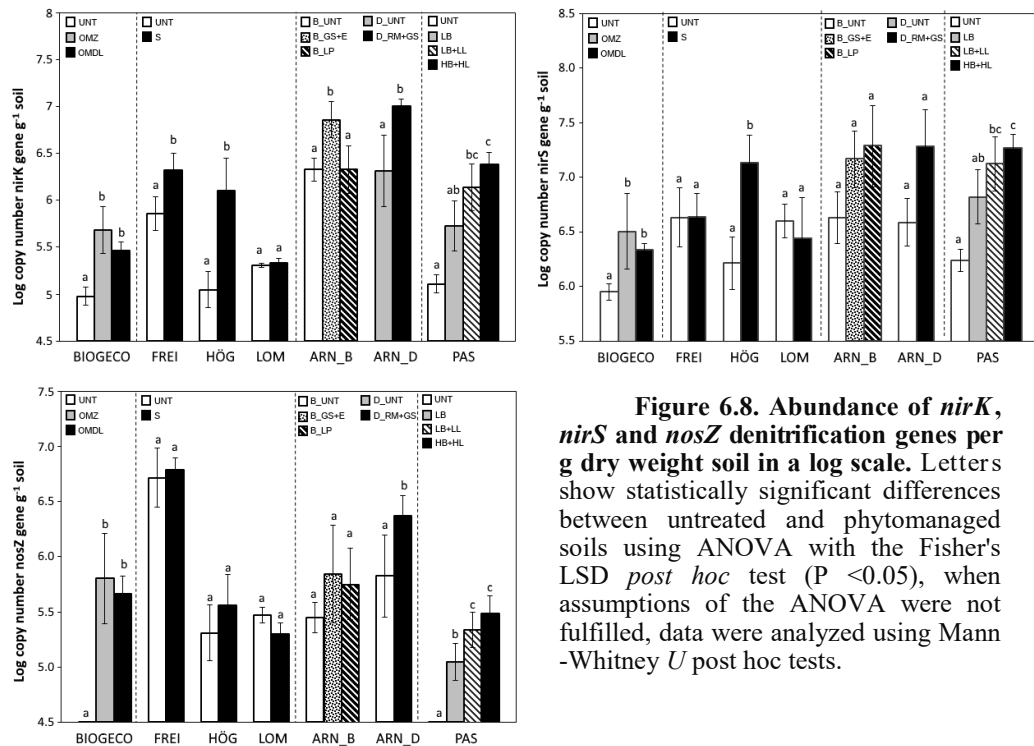


Figure 6.8. Abundance of *nirK*, *nirS* and *nosZ* denitrification genes per g dry weight soil in a log scale. Letters show statistically significant differences between untreated and phytomanaged soils using ANOVA with the Fisher's LSD *post hoc* test ($P < 0.05$), when assumptions of the ANOVA were not fulfilled, data were analyzed using Mann-Whitney *U* post hoc tests.

Differences were observed in copies of both denitrification and nitrification genes in the Arnoldstein and Piekary soils, both managed with *in situ* stabilisation and phytoexclusion (Figures 6.8 and 6.9). The abundances of these genes were not correlated to total soil TE concentrations, and for the Arnoldstein soils the gene copies did not differ between ARN_B_UNT and ARN_D_UNT. Soil treatments at the Arnoldstein site significantly increased the *nirK* gene copy number in the ARN_B_GS+E soil and the *nirK* and *nosZ* gene copies in the ARN_D_RM+GS soil (Figure 6.8), whereas no differences were observed in the abundance of *amoA* genes in these soils. The abundance of the archaeal *amoA* gene was only significantly increased for the ARN_B_LP soil (Figure 6.9). The abundances of *nirK* and *nosZ* genes were positively correlated with the soil CEC ($P < 0.01$). Soil

organic C and total N showed positive and negative correlations, respectively, with *nosZ* and bacterial *amoA* genes, whereas the NH_4NO_3 -extractable concentrations of Cd and Zn were negatively correlated with *nirK*, *nirS*, *nosZ* and archaeal *amoA*, but not with bacterial *amoA* ($P < 0.01$).

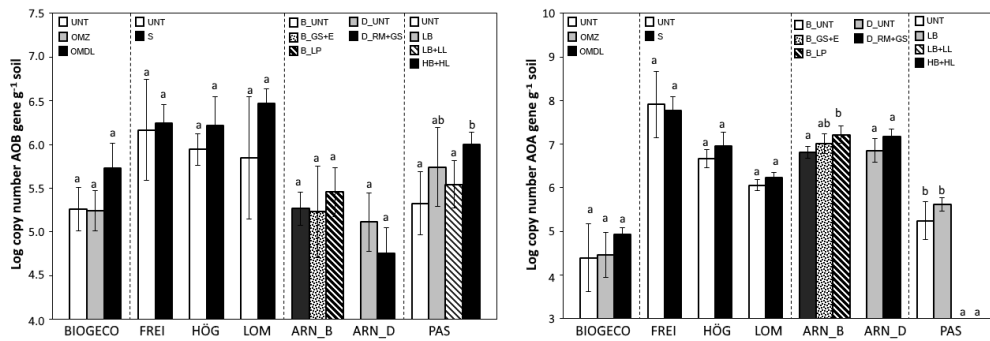


Figure 6.9. Abundance of AOB and AOA nitrification genes per g dry weight soil in a log scale. Letters show statistically significant differences between untreated and phytomanaged soils using ANOVA with the Fisher's LSD *post hoc* test ($P < 0.05$), when assumptions of the ANOVA were not fulfilled, data were analyzed using Mann-Whitney *U* post hoc tests.

Largest differences between untreated and treated soils in the abundance of genes involved in the nitrification and denitrification pathways occurred in soils from the Piekary site. In general, the combined amendments (HB+HL and LB+LL) induced the major changes in the copy numbers of almost all the studied genes compared to untreated soils. Changes induced by the LB treatment were less pronounced, and limited to *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes. The HB+HL treatment resulted in the largest increase in the abundances of all denitrification genes and also bacterial *amoA*. In addition, the *nirK:nirS* ratio was significantly higher in soil under the PAS_HB+HL treatment compared to the other treatments or to the untreated soil. In contrast, the abundance of archaeal *amoA* genes was below the detection limit in soils under both HB+LL and LB+LL treatments. Soil organic C and total N were positively correlated with the abundances of *nirK*, *nirS* and *nosZ*, and negatively correlated with archaeal *amoA* (only organic C) ($P < 0.01$). Total and NH_4NO_3 -extractable As concentrations were negatively correlated with the abundances of *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes ($P < 0.01$). NH_4NO_3 -extractable Zn concentrations were positively correlated with the abundances of *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes and negatively correlated with archaeal *amoA* ($P < 0.01$).

6.3.4 CCA ordination analyses

CCA analysis was used to define the correlations between bio-chemical and physico-chemical soil properties and DGGE patterns (Figure 6.10 to 6.13). For Biogeco, Arnoldstein and Piekary sites, the correlation coefficients of the CCA analyses based on the abundance of different DNA bands were always higher than 0.633, corresponding to a significance level of $P < 0.05$, and indicating an important contribution of the explanatory variables to the variation in the dataset.

In the CCA biplot of the Biogeco site, the total variance in the DGGE band patterns of the total bacterial community explained by axes 1 and 2 was 42% (23 % and 19 %, respectively). For the Biogeco soils, three groups of treatments were distinguished, corresponding with untreated soils, OMDL and OMZ treated soils (Figure 6.10). Available soil P presented an intraset correlation of 0.980 with axis 1, while the total Cu concentration in the soil pore water presented an intraset correlation of -0.914 with axis 2, and these were the main edaphic factors, out of those determined, shaping the microbial communities. The DGGE bands which were best explained by the model (FitE values $>75\%$) were represented in the CCA ordination plot (Figure 6.10) and indicated in the DGGE dendrogram (Figure 6.3). Six bands (7, 8, 10, 40, 46 and 65) were associated with untreated soils, and five bands (5, 37, 38, 41 and 47) with both OMDL and OMZ treated soils. CCA analyses based on DGGE fingerprints of the distinct phylogenetic groups generally discriminated the same three groups of soil samples (untreated, OMDL and OMZ) (Figure 6.11). The key factors contributing to the separation of the untreated and treated soils (OMDL and/or OMZ) were the microbial biomass (ATP content) and alkaline phosphomonoesterase activity (for *Alphaproteobacteria*), microbial respiration and soil pH_{H_2O} (for both *Betaproteobacteria* and *Streptomyetaceae*), and available P and β -galactosidase activity (for *Actinobacteria*).

In the CCA biplot of the Arnoldstein site, the total variance in the DGGE band patterns explained by axis 1 and 2 was 46% (40% and 6%, respectively) and samples from ARN_D and ARN_B sites clustered separately (Figure 6.10). For the ARN_D soil, two sub-groups could be distinguished corresponding with samples from untreated soil and the soil amended with gravel sludge and red mud (ARN_D_RM+GS). For the ARN_B soil, samples from treated soils were

intermixed but these were always separated from untreated soil (ARN_B_UNT). Soil pH_{KCl} and cation exchange capacity (CEC) presented an intraset correlation of -0.868 with axis 2 and -0.878 with axis 1, respectively. Three DGGE bands (12, 19, and 65) were characteristic of untreated soils in ARN_D, and one band (64) was characteristic of the ARN_B treated soils (GS+E and LP).

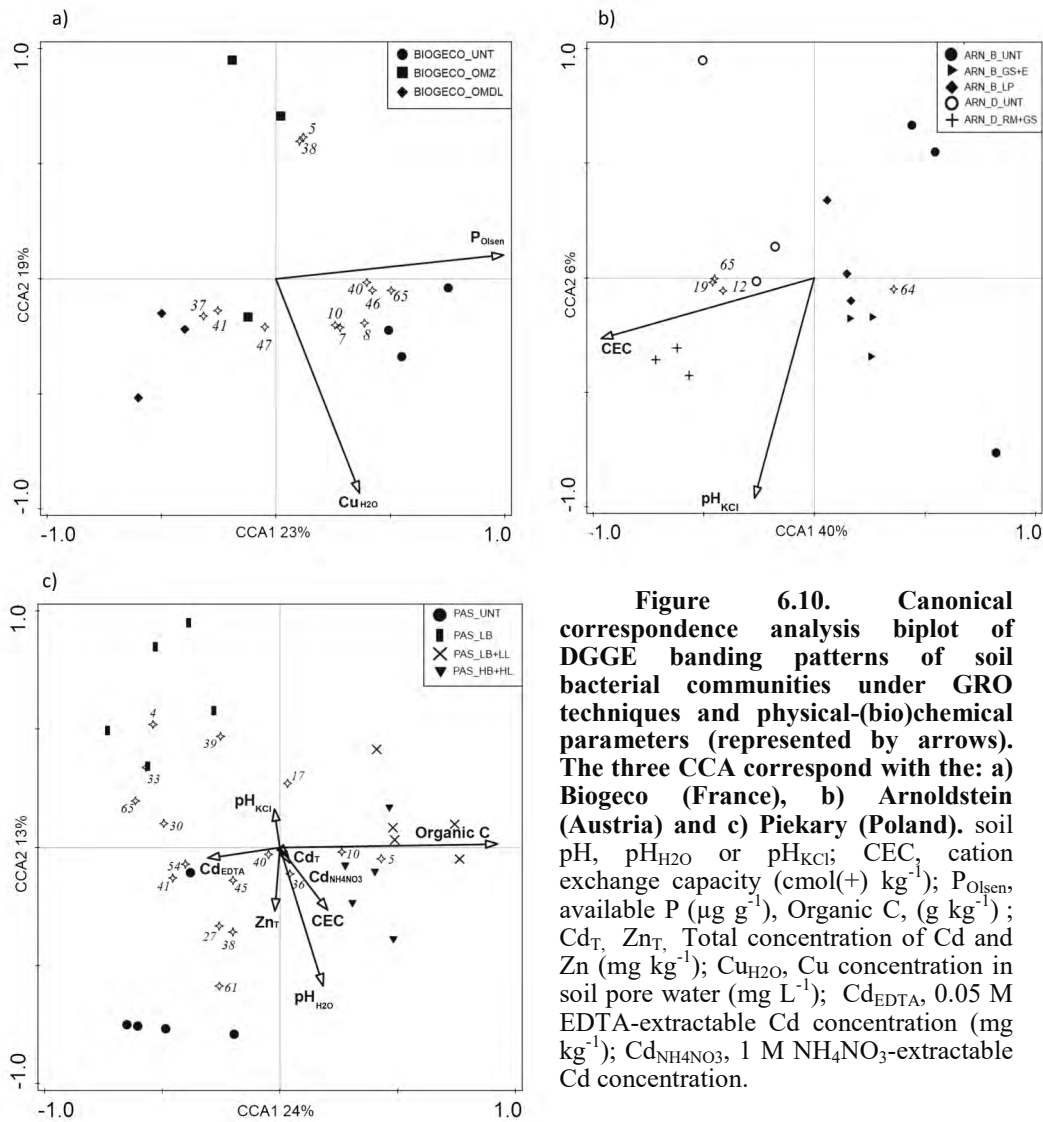


Figure 6.10. Canonical correspondence analysis biplot of DGGE banding patterns of soil bacterial communities under GRO techniques and physical-(bio)chemical parameters (represented by arrows). The three CCA correspond with the: a) Biogeco (France), b) Arnoldstein (Austria) and c) Piekary (Poland). soil pH, $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ or pH_{KCl} ; CEC, cation exchange capacity ($\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$); P_{Olsen} , available P ($\mu\text{g g}^{-1}$), Organic C, (g kg^{-1}); Cd_{T} , Zn_{T} , Total concentration of Cd and Zn (mg kg^{-1}); $\text{Cu}_{\text{H}_2\text{O}}$, Cu concentration in soil pore water (mg L^{-1}); Cd_{EDTA} , 0.05 M EDTA-extractable Cd concentration (mg kg^{-1}); $\text{Cd}_{\text{NH}_4\text{NO}_3}$, 1 M NH_4NO_3 -extractable Cd concentration.

For the Arnoldstein site the CCA analysis based on DGGE patterns of *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomycetaceae* generally separated the various soil treatments, with the

ARN_D_UNT, ARN_D_GS+RM and ARN_B_UNT soils clustering separately from the ARN_B_LP and ARN_B_GS+E soils (Figure 6.12). The soil CEC was an important factor associated with axis 1 in all four CCA analyses of bacterial phylogenetic groups. In addition, in the analysis of *Actinobacteria* and *Streptomyetaceae* profiles, available P (P Olsen) showed a high correlation with axis 1 (although inversely correlated with CEC) and the C:N ratio was a relevant factor in the *Streptomyetaceae* CCA..

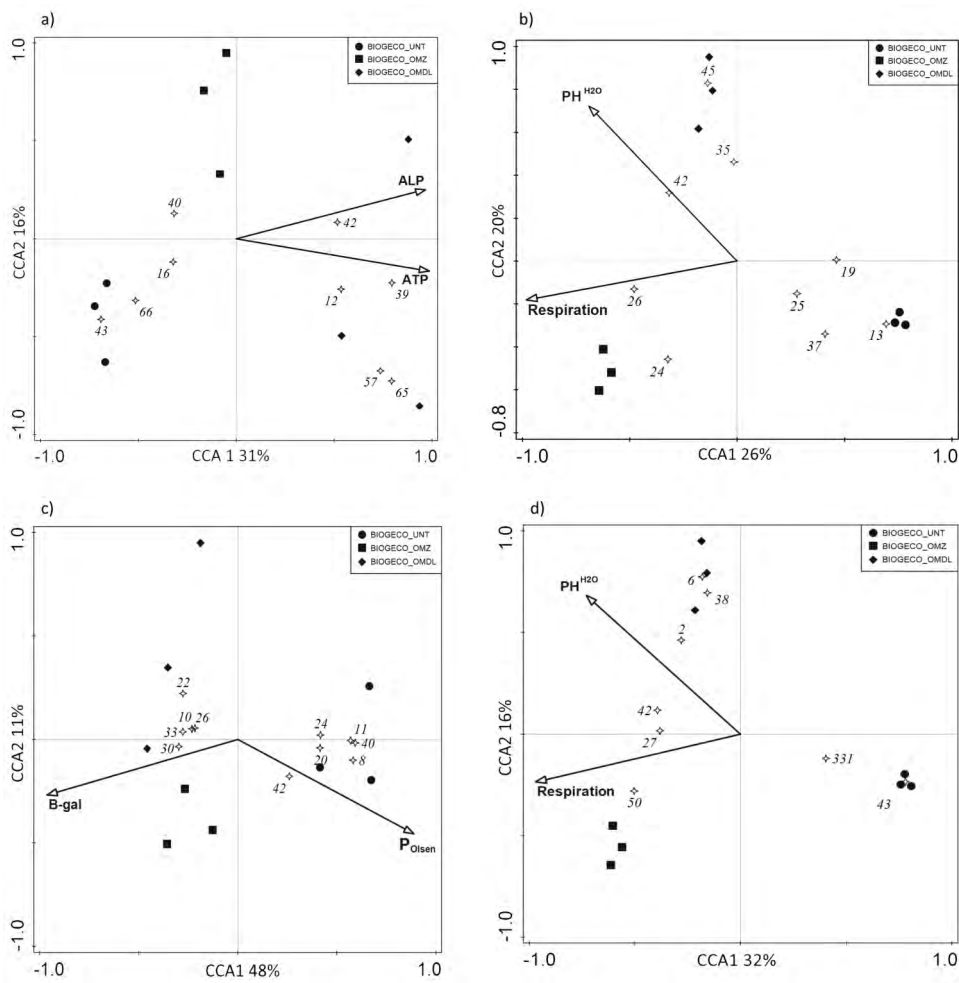


Figure 6.11. Canonical correspondence analysis biplot of a) *Alphaproteobacteria*, b) *Betaproteobacteria*, c) *Actinobacteria* and d) *Streptomyetaceae* DGGE patterns and physical-(bio)chemical parameters (represented by arrows) of untreated and phytomanaged soils of the Biogeco site (France). ALP, Alkaline phosphomonoesterase ($\text{mg p}^{-\text{NP}} \text{kg}^{-1} \text{soil h}^{-1}$); B-gal, β -galactosidase ($\text{mg p}^{-\text{NP}} \text{kg}^{-1} \text{soil h}^{-1}$); Respiration, ($\text{mg C-CO}_2 \text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$); ATP, microbial biomass content ($\mu\text{g ATP kg}^{-1}$); $\text{PH}^{\text{H}_2\text{O}}$, soil $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$; P_{Olsen} , available P ($\mu\text{g g}^{-1}$)

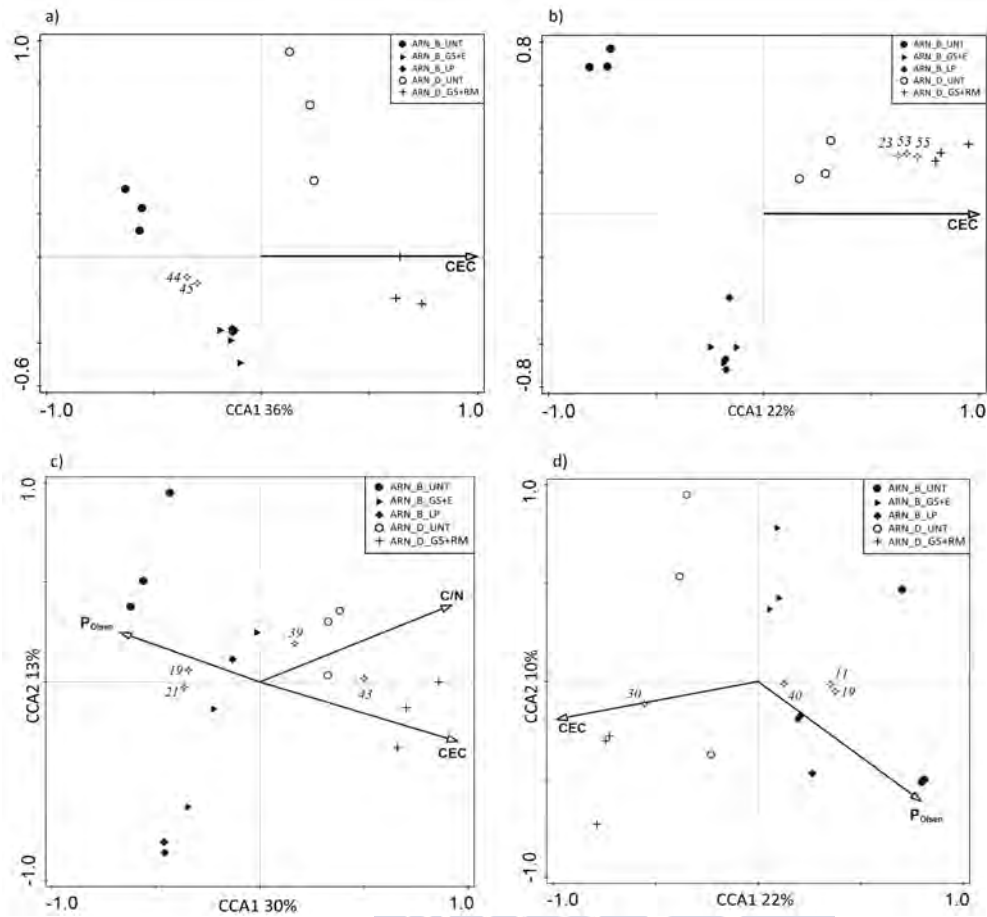


Figure 6.12. Canonical correspondence analysis biplot of a) α -Proteobacteria, b) β -Proteobacteria, c) Actinobacteria and d) Streptomycetaceae DGGE patterns and physical-(bio)chemical parameters (represented by arrows) of untreated and phytomanaged soils of the Arnoldstein site (Austria). CEC, cation exchange capacity ($\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$); C/N, total C:N; P_{Olsen} , available P ($\mu\text{g g}^{-1}$)

For the Piekary soils, the total variance in the DGGE band patterns explained by axis 1 and 2 was 37% (24% and 13%, respectively) (Figure 6.10). The CCA distinguished three main groups: untreated soils and LB-treated soil on the negative side of axis 1 (with negative and positive projections on axis 2, respectively) and another group including LB+LL- and HB+HL-treated soils on the positive side of axis 1. Several physicochemical properties (pH_{KCl} , $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$, organic C and CEC), total soil Cd and Zn concentrations, the NH_4NO_3^- - and EDTA-extractable Cd concentrations influenced the clustering of soil samples. The

DGGE bands which were best explained by the model (FitE values >75%) were represented in the CCA ordination plot (Figure 6.10) and indicated in the DGGE dendrogram (Figure 6.3). Six bands (27, 38, 41, 45, 54, and 61) were characteristic of untreated soils, five bands (4, 30, 33, 39, and 65) were characteristic of LB treatment, one band (17) was characteristic of LB+LL treatment and four bands (5, 10, 36, and 40) were characteristic of LB+LL and HB+HL treatments.

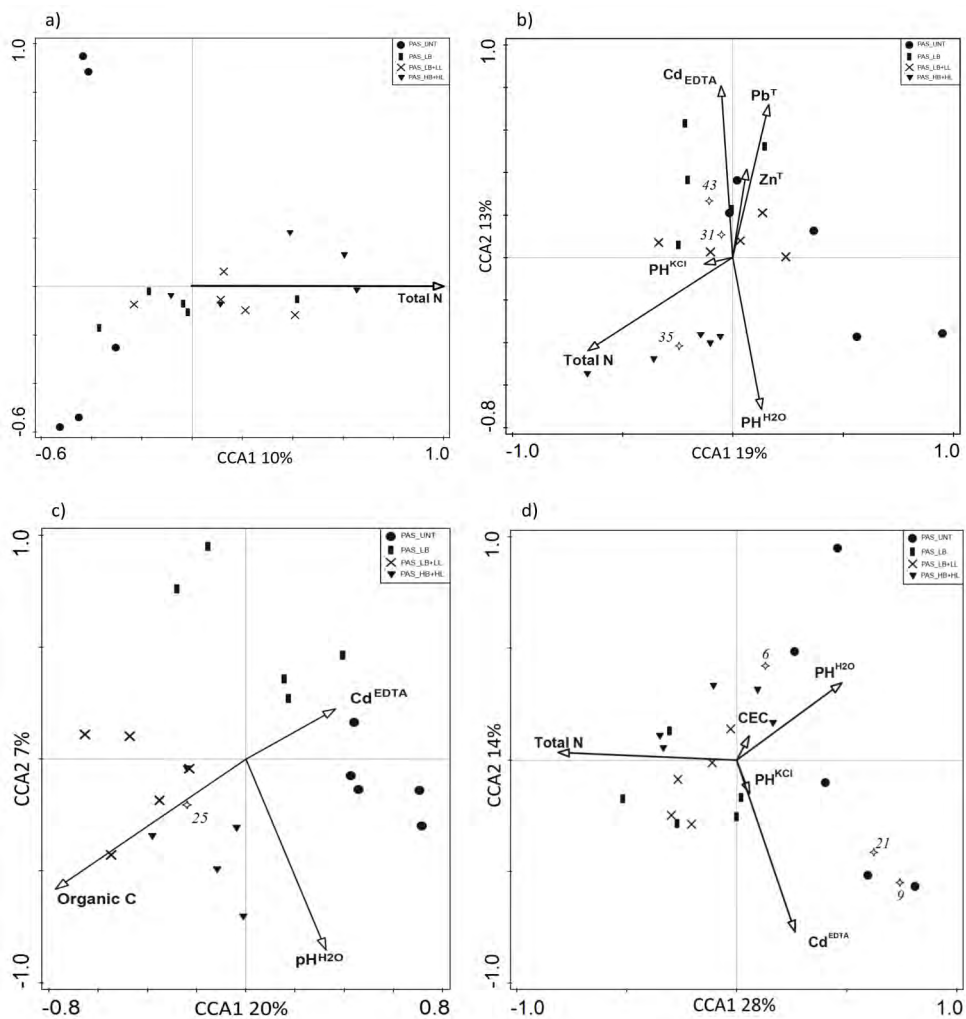


Figure 6.13. Canonical correspondence analysis biplot of a) α -Proteobacteria, b) β -Proteobacteria, c) Actinobacteria and d) Streptomycetaceae DGGE patterns and physical-(bio)chemical parameters (represented by arrows) of untreated and phytomanaged soils of the Piekary site (Poland). soil pH, pH_{H2O} or pH_{KCl}; CEC, cation exchange capacity (cmol(+) kg⁻¹); Organic C, (g kg⁻¹); Total N, (g kg⁻¹); Pb_T, Zn_T, Total concentration of Cd and Zn (mg kg⁻¹); Cd_{EDTA}, EDTA-extractable Cd concentration (mg kg⁻¹)

The CCA analysis based on DGGE patterns of *Actinobacteria* showed a clustering of samples similar to that of the bacterial CCA. The analyses including *Alpha*- and *Betaproteobacteria* and *Streptomycetaceae* generally separated untreated soils (PAS_UNT) from all treated soils which clustered together (PAS_LB, PAS_LB+LL and PAS_HB+HL; Figure 6.13). For the *Alphaproteobacteria*, the total variance in the DGGE profile explained by axis 1 was 10%, for the *Betaproteobacteria* axes 1 and 2 explained 19% and 13% of the total variance, respectively, and for *Actinobacteria* 20% and 7%, respectively, and for *Streptomycetaceae* 28 and 14%, respectively. The soil CEC, soil pH value, organic C, total N, total soil Pb and Zn, and EDTA-extractable Cd concentration were the most important factors contributing to the separation of the samples of untreated and treated Piekary soils for the phylogenetic bacterial groups.

For the Piekary site, the CCA analysis explained a large part of the variance in the copy numbers of genes involved in the nitrification and denitrification pathways (Figure 6.14). The total variance explained by axis 1 and 2 was 91 % (84 % and 7 %, respectively). The CCA separated the untreated (UNT) and LB-treated samples from those soils receiving limestone (LB+LL- and HB+HL). The soil total N and organic C presented an intraset correlation of -0.930 and -0.732 with axis 1, while pH_{H2O} presented an intraset correlation of -0.739 with axis 2. The abundance of *amoA* archaea was negatively related to organic C and total N.

6.4 Discussion

Kumpiene et al. (2014) evaluated a series of chemical and ecotoxicological assays to assess GRO efficiency at the same six sites as those used here. In the present study, the effects of GRO on the soil microbial characteristics at these sites were evaluated.

Phytomanagement led to increases in soil microbial biomass (ATP content), respiration and enzyme activities, but this was site-dependent. At the Högbytorp site, no improvement in soil biological activity was found in the treated soils (under phytoextraction). The effects of phytomanagement were most pronounced in the Biogeco soils where both phytoextraction and phytostabilisation were aided by soil amendments (OMDL and OMZ, respectively). In both treatments, organic matter (OM) was incorporated into the soils and is most likely one of the main

factors explaining the increment in soil respiration and biological activity. The increase in basal respiration was much higher in OMDL than in OMZ while the opposite was observed for ATP. The higher dissipation of CO₂ per unit of ATP in OMDL would indicate a lower metabolic efficiency which has been observed in other TE contaminated soils (Landi *et al.*, 2000, Renella *et al.*, 2005) and attributed to energy deviation into adaptations to tolerate stress (Renella *et al.*, 2005). Nevertheless, this increase in respiration was not accompanied by strong increases in hydrolase activities. Moreover, the levels of available Cu were similar or lower in OMDL soil than in OMZ. The differences in Cu availability could vary according to levels of dissolved organic matter (DOM) in soil pore water (Oustriere *et al.*, 2016). The high respiration observed in OMDL is more likely related to changes in the turnover and mineralization of OM fractions induced by the lime (Rangel-Castro *et al.*, 2005) or to interferences of lime-derived CO₂ (Biasi *et al.*, 2008). Alternatively, newly formed Fe/Mn oxides after addition of zerovalent iron grit (OMZ) may react with DOM reducing OM mineralization (Tiberg *et al.*, 2016).

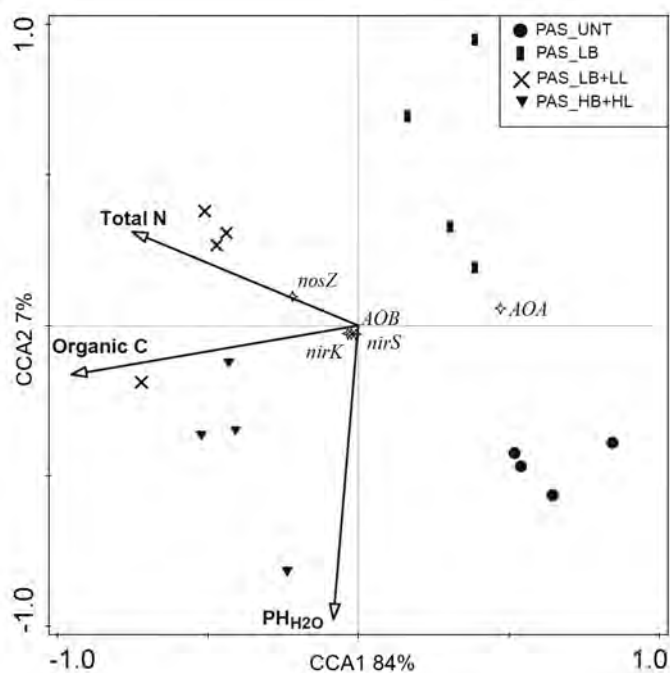


Figure 6.14. Canonical correspondence analysis biplot including copy numbers of genes involved in denitrification and nitrification pathways and physical-(bio) chemical parameters (represented by arrows) for the Piekary site. soil pH, pH_{H2O}; Organic C, (g kg⁻¹); Total N (g kg⁻¹)

Higher microbial biomass (but not respiration) was also observed in the Freiberg and Lommel soils which are both cultivated with the willow clone, *S. schwerinii* × *S. viminalis* (Tora). The lack of GRO effect on soil respiration in these two sites is consistent with the fact that variations in soil fertility and OM content between treated and untreated soils were not observed (Table 6.3 and Kumpiene et al. (2014)). Conversely, the increase observed in ATP content in the treated soils suggests improvements in biological activity as a result of phytoextraction. These results are supported by the general increase in soil enzyme activities, which again was most pronounced in the Biogeco soils but also observed (albeit not always significantly) in Freiberg and Lommel soils. Activities of acid and alkaline phosphomonoesterase, and urease, were increased in treated Freiberg soils, while arylsulphatase and protease activities were increased in treated Lommel soil (Figure 6.2).

For Biogeco, enzyme activities followed the same pattern as ATP content: untreated < OMDL < OMZ soil. Moreover, in this case, increments in enzyme activities in treated soils were observed for all the soil enzymes assayed. Higher enzyme activities observed in OMZ could be due to crop management: OMZ soil is planted with perennial grassy species and woody trees (targeting phytostabilisation), while OMDL soil is managed by rotation of annual crops (sunflower/tobacco, targeting phytoextraction). Plants sustain larger and more active microbial communities through the release of root exudates and production of litter, which alongside amendment-induced reductions in TE availability, lower soil toxicity to soil microorganisms (Epelde *et al.*, 2008, Renella *et al.*, 2008, Ascher *et al.*, 2009, Kumpiene *et al.*, 2009, Zanuzzi *et al.*, 2009, Zornoza *et al.*, 2012, Tiberg *et al.*, 2016).

Our results are in agreement with other field-based trials in TE-contaminated soils which have shown the benefits of organic-based amendments for recovery of soil biological fertility. Zanuzzi et al. (2009) amended acidic mine tailings with pig manure or sewage sludge in combination with blanket application of marble wastes. Two years after soil amendment, soil pH was increased (from pH 2.7 to 7.4) alongside a build-up in total organic carbon, permitting the establishment of a vegetation cover. After 5 years, microbial biomass and soil enzymatic activities were higher in the amended soils than in the untreated mine

tailings (Zanuzzi *et al.*, 2009, Zornoza *et al.*, 2012).

Critical threshold Zn concentrations for nitrification and denitrification processes range in the order of 1-10 μM (Radniecki & Ely, 2008). The labile concentrations of several TE in the phytomanaged soils were within this range, and in some cases well above this threshold (labile concentrations of Zn and Cu were above this range in Piekary and Lommel, and Biogeco, respectively). GRO significantly influenced the abundance of denitrification and, albeit to a lesser extent, nitrification genes, although the effects of phytomanagement were again site-dependent. The most pronounced differences between untreated and treated soils were found at: the Biogeco and Piekary sites. At both of these sites organic amendments were incorporated into GRO (i.e pine bark and green waste composts at Biogeco and municipal biosolids at Piekary). High Cu concentrations negatively affect denitrifying populations: increasing Cu concentrations in sediments led to drastic decreases in *nirK*, *nirS* and *nosZ* gene abundances of an estuarine microbial community (Magalhães *et al.*, 2011). In accordance, a significant increase in all three of these genes was observed in treated soils of Biogeco. Overall, our results suggest that at the Biogeco site, phytomanagement has enhanced soil N cycling by increasing urease and protease activities and the abundance of denitrification genes.

Increase in the *nirK* and *nirS* gene abundances were also found in the Freiberg and Högbytorp soils (both managed by phytoextraction), and in *nirK* and *nosZ* in the Arnoldstein soils which were amended with gravel sludge, siderite or loamy powder (only ARN_D in the case of *nosZ*). These sites are contaminated by As, Cd, Pb and/or Zn. High Zn concentrations have previously been shown to impact both denitrifying and nitrifying populations (Mertens *et al.*, 2006, Ruyters *et al.*, 2010, Ruyters *et al.*, 2010, Ruyters *et al.*, 2012, Trevisan *et al.*, 2012).

The *nirS* gene abundance was prevalent among *Betaproteobacteria* isolates, while *nirK* was more frequently found than *nirS* in *Alphaproteobacteria* and was also detected in *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Gammaproteobacteria* strains (Heylen *et al.*, 2006). In our study increases in *nirS* were observed in sites which showed significant dissimilarities in the *Betaproteobacterial* DGGE profiles, and were significant in more organic soils or soils amended with OM (Biogeco, Högbytorp and Piekary). On the other hand, *nirK* increases were observed in most

treated sites, in agreement with its wider distribution amongst bacterial taxa.

Frey et al. (2008) assessed the effects of phytoextraction on the dynamics of ammonia-oxidising bacterial populations associated with poplar growing in a TE polluted soil for more than 4 years and reported a shift in the rhizosphere ammonia-oxidising population over time which occurred in parallel to the removal of TE. Here, no changes were observed in the nitrifying population in any of the soils collected from sites managed by phytoextraction. On the other hand, a change in the abundance of *amoA* genes was observed at sites where *in situ* stabilisation and phytoexclusion were implemented. In parallel, a reduction in NH_4NO_3 -extractable TE concentrations was observed in treated soils of these sites (Kumpiene *et al.*, 2014). The archaeal *amoA* gene abundance increased in phytomanaged soils of Arnoldstein (only in the less-contaminated soil ARN_B amended with loamy powder), while bacterial *amoA* gene abundance was unaffected. The contrary was observed in the Piekary soils: the abundance of bacterial *amoA* genes was significantly increased in the HB+HL treatment, while archaeal *amoA* gene abundance was severely reduced in both treatments including addition of limestone. Based on CCA, the AOA community was negatively correlated with soil organic C and total N content (Figure 6.14). The lack of detection of AOA in the LB-LL and HB-HL treatments of the Piekary soils indicates that the ammonia oxidation in these soils was likely carried out by AOB (Figure 6.9). Similar results were observed in contaminated soils by Ruyters et al. (2010) and Mertens et al. (2009).

Kumpiene et al. (2014) showed extractable Cd and/or Zn concentrations (based on EDTA, NH_4NO_3 , NaNO_3 or H_2O chemical extractions) to be lower in treated soils compared to untreated soils at the Arnoldstein, Högbytorp and Piekary sites, while NH_4NO_3 -extractable Cu concentrations were significantly reduced by GRO implementation in the Biogeco soils. PlantTox tests (using dwarf bean, turnip and lettuce) showed a higher bean root biomass and turnip shoot biomass in OMDL-treated Biogeco soil, and a higher bean and turnip biomass in Arnoldstein B soil amended with gravel sludge and siderite and Högbytorp treated soil. In parallel, reduced activities of stress enzymes in dwarf bean roots were observed when these were grown in treated soils of Biogeco and Arnoldstein (Kumpiene *et al.*, 2014). Consequently, the rises in soil microbial activity and

enzyme activities and/or increases in nitrifying and denitrifying populations observed here in Biogeco, Arnoldstein and Piekary treated soils are most likely a reflection of the GRO-induced reductions in metal phytotoxicity and/or nutrient input (alongside amendment additions). Moreover, our results reinforce those of Kumpiene et al. (2014) in that the greatest effects of GRO on soil microbial characteristics were found for sites managed by *in situ* stabilisation and phytoexclusion or (aided) phytostabilisation/phytoextraction rather than in soils only managed with phytoextraction.

Genetic fingerprinting by PCR-DGGE confirmed that GRO induce important shifts in the bacterial community structure (Figure 6.3 to 6.7), again more pronounced at those sites where the implemented GRO included organic/inorganic amendments (Biogeco, Arnoldstein and Piekary). The changes in the soil bacterial communities likely mirrored the reductions in metal availability and toxicity but also improvements in physico-chemical properties of the phytomanaged soils. Although the CCA analyses indicated the importance of labile Cu concentrations (soil pore water) and EDTA-extractable Cd concentrations in shaping the bacterial community structure of these sites, soil properties such as pH, available P, cation exchange capacity, and organic C or total N content, were also significantly correlated with shifts in bacterial community structure.

The *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* are frequently the most abundant and active bacterial taxonomic groups in TE-enriched or contaminated soils (Sandaa et al., 1999, Sandaa et al., 2001, Gremion et al., 2003, Moffett et al., 2003, Idris et al., 2004, Pereira & Castro, 2014, Álvarez-López et al., 2016). TE toxicity or nutrient deficiency has been shown to lower the frequency of r-strategists (bacteria capable of rapid growth and utilization of resources), such as *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*), as these are more sensitive to toxic substances (Kozdrój, 1995, Kunito et al., 2001). Here, we were able to detect changes in specific phylogenetic groups of the soil bacterial communities after GRO implementation, and these changes were often more important than those observed in the bacterial community as a whole. This was the case for the Biogeco, Freiberg, Arnoldstein and Piekary soils. Moreover, we were able to identify those phylogenetic groups which acted as better indicators of the changes

induced in the bacterial community as a result of GRO implementation. Permutation tests indicated that the actinobacterial communities were the most responsive to GRO implementation in those sites where soil amendments were used (Biogeco, Arnoldstein and Piekary). *Actinobacteria* are intimately involved in nutrient turnover and organic matter decomposition (Piao *et al.*, 2008). The *Betaproteobacteria* were also an important indicator of changes induced in bacterial community structure in the Arnoldstein soils where inorganic amendments were used (gravel sludge, siderite, loamy powder and red mud). Moreover, the *Betaproteobacteria* were most responsive to the addition of zerovalent iron grit or dolomitic limestone in the Biogeco soils (OMZ vs. OMDL). Finally, at the Piekary site, it is worth noting the importance of the *Alphaproteobacteria* in separating untreated from treated soils. This site is the longest running site where GRO were implemented in 1997. Overall, the results showed *Actinobacteria* as a group highly sensitive to the addition of both organic and inorganic amendments in TE contaminated sites, while *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* were particularly useful to monitor changes in sites treated with organic and inorganic amendments, respectively.

Kumpiene *et al.* (2014) did not observe significant reductions in extractable TE concentrations or ecotoxicity of treated soils compared to untreated soils at either the Freiberg or Lommel site (managed by phytoextraction). However, our results suggest that soil microbiological and biochemical properties can be more responsive to GRO than conventional chemical extractants or ecotoxicity assays. For example, microbial biomass and some soil enzyme activities were significantly higher in treated soils compared to untreated soils of both these sites. Although permutation tests did not show the clustering of DGGE fingerprints to be statistically significant in Lommel, this technique was sufficiently sensitive to clearly separate treated and untreated soils. Moreover, on a group level the separation between the Freiberg treated and untreated soils was significant for *Actinobacteria*, and the abundance of *nirK* genes was significantly increased after phytomanagement.

Overall, the positive effects of GRO on soil microbial diversity and activity, and parallel shifts in bacterial community structure were most pronounced when phytomanagement was aided by inorganic and organic amendments. Previous

studies demonstrated the suitability of soil physicochemical properties (including TE availability) and ecotoxicological tests as indicators for monitoring GRO efficiency. Our results highlight the importance of including soil microbiological parameters as indicators of GRO progress and effectiveness in TECS, which in some cases are even more sensitive indicators of changes in soil functionality induced by GRO in the long term.

6.5 References

- Álvarez-López V, Prieto-Fernández Á, Becerra-Castro C, Monterroso C & Kidd PS (2016) Rhizobacterial communities associated with the flora of three serpentine outcrops of the Iberian Peninsula. *Plant Soil* 1-20.
- Ascher J, Ceccherini MT, Pantani OL, Agnelli A, Borgogni F, Guerri G, Nannipieri P & Pietramellara G (2009) Sequential extraction and genetic fingerprinting of a forest soil metagenome. *Appl Soil Ecol* **42**: 176-181.
- Biasi C, Lind SE, Pekkarinen NM, Huttunen JT, Shurpali NJ, Hyvönen NP, Repo ME & Martikainen PJ (2008) Direct experimental evidence for the contribution of lime to CO₂ release from managed peat soil. *Soil Biol Biochem* **40**: 2660-2669.
- Blackmer AM & Bremner JM (1977) Gas chromatographic analysis of soil atmospheres. *Soil Sci Soc Am J* **41**: 908-912.
- Broos K, Mertens J & Smolders E (2005) Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soil microbial and plant growth assays: A comparative study. *Environ Toxicol Chem* **24**: 634-640.
- Browman MG & Tabatabai MA (1978) Phosphodiesterase activity of soils. *Soil Sci Soc Am J* **42**: 284-290.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR & Tiedje JM (2014) Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **42**: D633-D642.
- COM (2002) Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: Towards a thematic strategy for soil. COM (2002) 179- final.
- Coppolecchia D, Puglisi E, Vasileiadis S, Suciú N, Hamon R, Maria Beone G & Trevisan M (2011) Relative sensitivity of different soil biological properties to zinc. *Soil Biol Biochem* **43**: 1798-1807.
- D'Ascoli R, Rao MA, Adamo P, Renella G, Landi L, Rutigliano FA, Terribile F & Gianfreda L (2006) Impact of river overflowing on trace element contamination of volcanic soils in south Italy: Part II. Soil biological and biochemical properties in relation to trace element speciation. *Environ Pollut* **144**: 317-326.
- EEA (2014) European Environment Agency (EEA). Retrieved March 20, 2014, from <http://www.eea.europa.eu/themes/soil/soil-threats>.
- Epelde L, Becerril JM, Hernández-Allica J, Barrutia O & Garbisu C (2008) Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Appl Soil Ecol* **39**: 299-310.
- Epelde L, Martín-Sánchez I, González-Oreja JA, Anza M, Gómez-Sagasti MT & Garbisu C (2012) Impact of sources of environmental degradation on microbial community dynamics in non-polluted and metal-polluted soils. *Sci Total Environ* **433**: 264-272.
- Frey B, Pesaro M, Rüd A & Widmer F (2008) Resilience of the rhizosphere *Pseudomonas* and ammonia-oxidizing bacterial populations during phytoextraction of heavy metal polluted soil with poplar. *Environ Microbiol* **10**: 1433-1449.

- Friessl-Hanl W, Platzer K, Horak O & Gerzabek MH (2009) Immobilising of Cd, Pb, and Zn contaminated arable soils close to a former Pb/Zn smelter: a field study in Austria over 5 years. *Environ Geochem Health* **31**: 581-594.
- Giller KE, Witter E & McGrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* **30**: 1389-1414.
- Gomes NCM, Kosheleva IA, Abraham WR & Smalla K (2005) Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 21-33.
- Gomes NCM, Landi L, Smalla K, Nannipieri P, Brookes PC & Renella G (2010) Effects of Cd- and Zn-enriched sewage sludge on soil bacterial and fungal communities. *Ecotoxicol Environ Saf* **73**: 1255-1263.
- Gremion F, Chatzinotas A & Harms H (2003) Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol* **5**: 896-907.
- Gremion F, Chatzinotas A, Kaufmann K, Von Sigler W & Harms H (2004) Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 273-283.
- Heylen K, Gevers D, Vanparys B, Wittebolle L, Geets J, Boon N & De Vos P (2006) The incidence of nirS and nirK and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ Microbiol* **8**: 2012-2021.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW & Sessitsch A (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2667-2677.
- Kelly JJ, Häggblom M & Tate Iii RL (1999) Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol Biochem* **31**: 1455-1465.
- Kidd P, Mench M, Álvarez-López V, et al. (2015) Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *Int J Phytoremediation* **17**: 1005-1037.
- Kozdrój J (1995) Microbial responses to single or successive soil contamination with Cd or Cu. *Soil Biol Biochem* **27**: 1459-1465.
- Kozdrój J & van Elsas JD (2000) Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biol Biochem* **32**: 1405-1417.
- Kropf S, Heuer H, Grüning M & Smalla K (2004) Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *J Microbiol Methods* **57**: 187-195.
- Kumpiene J, Guerri G, Landi L, Pietramellara G, Nannipieri P & Renella G (2009) Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**: 115-119.
- Kumpiene J, Bert V, Dimitriou I, et al. (2014) Selecting chemical and ecotoxicological test batteries for risk assessment of trace element-contaminated soils (phyto)managed by gentle remediation options (GRO). *Sci Total Environ* **496**: 510-522.
- Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H & Matsumoto S (2001) Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur J Soil Biol* **37**: 95-102.
- Landi L, Renella G, Moreno JL, Falchini L & Nannipieri P (2000) Influence of cadmium on the metabolic quotient, l-d-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol Fertility Soils* **32**: 8-16.

- Liu Y, Liu Y, Ding Y, *et al.* (2014) Abundance, composition and activity of ammonia oxidizer and denitrifier communities in metal polluted rice paddies from south china. *PLoS One* **9**: e102000.
- Lorenz N, Hintemann T, Kramarewa T, Katayama A, Yasuta T, Marschner P & Kandeler E (2006) Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. *Soil Biol Biochem* **38**: 1430-1437.
- Magalhães CM, Machado A, Matos P & Bordalo AA (2011) Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 274-284.
- Mench M, Schwitzguebel JP, Schroeder P, Bert V, Gawronski S & Gupta S (2009) Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ Sci Pollut Res* **16**: 876-900.
- Mench M, Lepp N, Bert V, Schwitzguébel J-P, Gawronski SW, Schröder P & Vangronsveld J (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J Soils Sed* **10**: 1039-1070.
- Mertens J, Springael D, De Troyer I, Cheyens K, Wattiau P & Smolders E (2006) Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environ Microbiol* **8**: 2170-2178.
- Mertens J, Broos K, Wakelin SA, Kowalchuk GA, Springael D & Smolders E (2009) Bacteria, not archaea, restore nitrification in a zinc-contaminated soil. *ISME Journal* **3**: 916-923.
- Moffett BF, Nicholson FA, Uwakwe NC, Chambers BJ, Harris JA & Hill TCJ (2003) Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 13-19.
- Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli S & Sequi P (1974) Use of 0.1 m pyrophosphate to extract urease from a podzol. *Soil Biol Biochem* **6**: 359-362.
- Nannipieri P, Ciardi C, Palazzi T & Badalucco L (1990) Short-term nitrogen reactions following the addition of urea to a grass-legume association. *Soil Biol Biochem* **22**: 549-553.
- Oustriere N, Marchand L, Galland W, Gabbon L, Lottier N, Motelica M & Mench M (2016) Influence of biochars, compost and iron grit, alone and in combination, on copper solubility and phytotoxicity in a Cu-contaminated soil from a wood preservation site. *Sci Total Environ* **566-567**: 816-825.
- Park S & Ely RL (2008) Genome-wide transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to zinc. *Arch Microbiol* **189**: 541-548.
- Pereira SIA & Castro PML (2014) Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environ Sci Pollut Res* **21**: 14110-14123.
- Piao Z, Yang L, Zhao L & Yin S (2008) Actinobacterial community structure in soils receiving long-term organic and inorganic amendments. *Appl Environ Microbiol* **74**: 526-530.
- Pielou EC (1969) An introduction to mathematical ecology. *Wiley, New York, NY*.
- Radniecki TS & Ely RL (2008) Zinc chloride inhibition of *Nitrosococcus mobilis*. *Biotechnol Bioeng* **99**: 1085-1095.
- Rangel-Castro JI, Killham K, Ostle N, Nicol GW, Anderson IC, Scrimgeour CM, Ineson P, Meharg A & Prosser JI (2005) Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms. *Environ Microbiol* **7**: 828-838.
- Renella G, Mench M, Landi L & Nannipieri P (2005) Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biol Biochem* **37**: 133-139.

- Renella G, Egamberdiyeva D, Landi L, Mench M & Nannipieri P (2006) Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. *Soil Biol Biochem* **38**: 702-708.
- Renella G, Zornoza R, Landi L, Mench M & Nannipieri P (2011) Arylesterase activity in trace element contaminated soils. *Eur J Soil Sci* **62**: 590-597.
- Renella G, Landi L, Ascher J, Ceccherini MT, Pietramellara G, Mench M & Nannipieri P (2008) Long-term effects of aided phytostabilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environ Pollut* **152**: 702-712.
- Ruyters S, Mertens J, Springael D & Smolders E (2010) Stimulated activity of the soil nitrifying community accelerates community adaptation to Zn stress. *Soil Biol Biochem* **42**: 766-772.
- Ruyters S, Mertens J, Springael D & Smolders E (2012) Co-tolerance to zinc and copper of the soil nitrifying community and its relationship with the community structure. *Soil Biol Biochem* **44**: 75-80.
- Ruyters S, Mertens J, T'Seyen I, Springael D & Smolders E (2010) Dynamics of the nitrous oxide reducing community during adaptation to Zn stress in soil. *Soil Biol Biochem* **42**: 1581-1587.
- Sandaa RA, Torsvik V & Enger Ø (2001) Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol Biochem* **33**: 287-295.
- Sandaa RA, Torsvik V, Enger Ø, Daae FL, Castberg T & Hahn D (1999) Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 237-251.
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.
- Tabatabai MA (1982) *Methods of Soil Analysis. Part II. Chemical and Microbiological Properties*. ASA-CSSA-SSSA, Madison.
- Tabatabai MA & Bremner JM (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* **1**: 301-307.
- Tiberg C, Kumpiene J, Gustafsson JP, Marsz A, Persson I, Mench M & Kleja DB (2016) Immobilization of Cu and As in two contaminated soils with zero-valent iron – Long-term performance and mechanisms. *Appl Geochem* **67**: 144-152.
- Trevisan M, Coppolecchia D, Hamon R & Puglisi E (2012) Potential nitrification, nitrate reductase, and β -galactosidase activities as indicators of restoration of ecological functions in a Zn-contaminated soil. *Biol Fertility Soils* **48**: 923-931.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, *et al.* (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res* **16**: 765-794.
- Xue K, van Nostrand JD, Vangronsveld J, *et al.* (2015) Management with willow short rotation coppice increase the functional gene diversity and functional activity of a heavy metal polluted soil. *Chemosphere* **138**: 469-477.
- Zanuzzi A, Arocena JM, van Mourik JM & Faz Cano A (2009) Amendments with organic and industrial wastes stimulate soil formation in mine tailings as revealed by micromorphology. *Geoderma* **154**: 69-75.
- Zornoza R, Landi L, Nannipieri P & Renella G (2009) A protocol for the assay of arylesterase activity in soil. *Soil Biol Biochem* **41**: 659-662.
- Zornoza R, Faz A, Carmona DM, Kabas S, Martinez-Martinez S & Acosta JA (2012) Plant cover and soil biochemical properties in a mine tailing pond five years after application of marble wastes and organic amendments. *Pedosphere* **22**: 22-32.

A watercolor illustration of a tree with a thick, gnarled trunk and several branches. The branches are adorned with green leaves and clusters of small yellow flowers. The tree is set against a background of brown, textured soil. The overall style is soft and artistic.

7

FINAL SYNTHESIS AND CONCLUSIONS



The main results and conclusions of this PhD thesis can be summarised as follows. Regarding the soils naturally enriched in trace metals:

- The microbial community of the ultramafic soils studied was dominated by members of the phyla *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* (which presented similar relative abundance). Sequences affiliated to these groups represented about 2/3 of the pyrosequences obtained. The relative abundance of *Actinobacteria* and *Gemmatimonadetes* phyla in the ultramafic soils was higher than usually found in other soils of similar characteristics non-enriched in TEs.
- The relative abundance of *Acidobacteria* (groups 3, 4 and 7) and of *Actinobacteria* was lower in Sierra Bermeja than in Barazón, and the opposite was observed for *Proteobacteria* (classes *Alpha-* and *Betaproteobacteria*), *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. At a lower taxonomic level, a remarkable enrichment in *Oxalobacteraceae* in Sierra Bermeja was observed. The differences in the bacterial community composition between the two ultramafic sites was more pronounced in non-vegetated soil than in the rhizosphere.
- The bacterial communities in the non-vegetated ultramafic soils differed from those in the rhizosphere of the Ni-hyperaccumulator and the Ni-excluder plants growing in the same soils. This was observed when analysing the total bacterial community and, in general, was even more pronounced in the DGGE profiles of *Alphaproteobacteria* and/or *Actinobacteria*.
- In the four ultramafic sites, the rhizosphere of the Ni-hyperaccumulator, *Alyssum*, and of the Ni-excluder, *Dactylis*, hosted different bacterial communities. The dissimilarities were maximal in the case of the Alphaproteobacterial communities.
- The bacterial communities in the rhizosphere of the four populations studied of hyperaccumulating *Alyssum* were significantly different. However, the dissimilarities between the two Portuguese populations, although significant, were low.

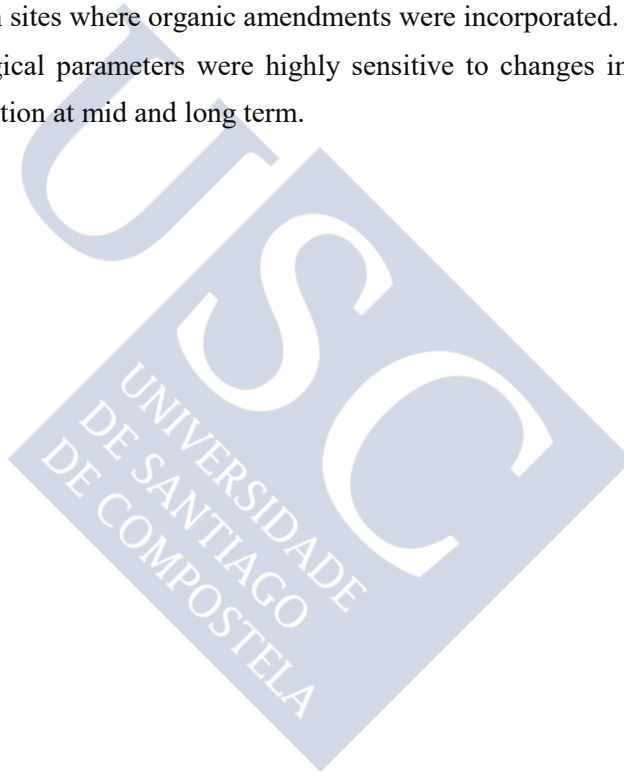
- In the non-vegetated soil, the structure of *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Streptomycetaceae* communities were significantly influenced by intrinsic soil characteristics (such as organic C, total Ni and exchangeable Mg) while in the rhizosphere these factors were replaced by other parameters related to nutrient availability (CEC in *Alyssum* rhizosphere, available K in *Dactylis* rhizosphere) and, in the case of the excluder, TE availability. These results suggest a relationship between rhizosphere bacterial communities and nutrient and TE availability.
- Alphaproteobacterial communities in the rhizosphere of the different populations of *Dactylis glomerata* showed a high similarity and clustered together in the DGGE dendrograms. This was not observed for other bacterial groups or in the case of *Alyssum*, suggesting that the Ni-excluder plant selects, in the different ultramafic sites, similar Alphaproteobacterial members. It would be interesting to further investigate the role of members of this bacterial group, in the tolerance and/or exclusion mechanisms of the *Poaceae*.
- In comparison with non-vegetated soil, the rhizosphere of Ni-hyperaccumulating *Alyssum* from Barazón and Sierra Bermeja was relatively enriched in *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* of the class *Actinobacteridae*, and *Alphaproteobacteria*. In contrast, *Acidobacteria* of group 1, *Bacilli* (especially the genera *Cohnella* and *Paenibacillus*), *Anaeromyxobacter* and *Latescibacteria* (previously WS3) showed a higher relative abundance in non-vegetated soil than in the rhizosphere.
- The sequencing of bands excised from DGGE profiles of 16s rRNA gene fragments as well as the pyrosequencing of 16S rRNA gene fragments amplified from the total community DNA, indicated that some relevant and characteristic members of the rhizosphere bacterial community of Ni-hyperaccumulating *Alyssum serpyllifolium* are:
 - a) *Actinobacteria* of the family *Geodermatophilaceae* (genera *Blastococcus*, *Geodermatophilus* and *Modestobacter*) known for their modest growth requirements and their ability to colonise poor substrates.

- b) *Actinobacteria* of the genus *Pseudonocardia*.
 - c) *Alphaproteobacteria* of the *Hyphomicrobiaceae* family such as members of the genera *Devosia* and *Hyphomicrobium*, characterized by prosthecae, that confer them the ability to survive in nutrient poor habitats and/or possess in their genomes genes related to N₂ fixation.
 - d) *Alphaproteobacteria* of the *Methylobacterium* genus, which have been previously found in association with *Alyssum* and other plants, and are known for their plant growth promoting properties.
 - e) Members of the *Rhodobacteraceae* family, which according to several authors, includes N₂ fixing bacteria and strains involved in Mn cycling.
 - f) Organisms phylogenetically related to *Gemmatimonas*
- Further efforts to isolate and characterise organisms of these taxa, as well as research on their capacity to improve *Alyssum* nutrition and/or Ni mobilisation seems particularly interesting.
 - The rhizosphere of the Ni-hyperaccumulating *Alyssum serpyllifolium* subspecies growing in artificial substrate enriched in ultramafic rock hosted a higher density of Ni-tolerant bacteria than the rhizosphere of the Ni-excluder *Dactylis glomerata* or the non-planted substrate. Furthermore, in ultramafic soils of Barazón and Sierra Bermeja the copy number of *nccA* gene, implicated in a bacterial mechanism (extrusion pump) for extruding Ni from the cell, was higher in the rhizosphere of *Alyssum* than in non-vegetated soil.

Regarding the anthropogenic contaminated soils where different phytomanagement options were implemented:

- The phytoremediation process induced increases in microbial biomass and activity, as well as clear shifts in bacterial community structure and diversity (at both the total community and group level). These changes were observed mainly when phytomanagement was aided with inorganic and organic amendments.

- *Actinobacteria* were sensitive to changes in TE contaminated soils induced by phytomanagement options that included soil amendments, while *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* were particularly useful to monitor changes over time in those sites treated with organic and inorganic amendments, respectively.
- In general, the copy numbers of genes involved in denitrification and nitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZ* and *amoA*) were influenced by the phytomanagement techniques implemented. The most pronounced changes were observed in sites where organic amendments were incorporated.
- The microbiological parameters were highly sensitive to changes induced by phytoremediation at mid and long term.



A watercolor illustration of several plants with green stems and leaves, some topped with clusters of small yellow flowers. The style is soft and painterly. The word 'AGRADECIMENTOS' is written in a simple, black, sans-serif font across the middle of the image. The background is white, and there is a brownish-orange wash at the bottom, suggesting soil or a ground surface.

AGRADECIMENTOS



Dende que empecei con esta tese sempre pensei no momento de escribir os agradecementos como ese intre glorioso no que o único que falta para rematar a túa tese é a parte na que dás as gracias a toda esa xente que te axudou a chegar ata aquí. Eu pensei que neste momento ía soar musica, que saíría o arco da vella e todas esas cousas que marcarían o triunfalismo deste día na miña vida. Pensei en todas as cousas bonitas que vos ía dicir e no fácil que sería. Pensaba “Un pouco de musica de Ludovico Einaudi e isto vai lanzado!”, e agora mesmo só poden pensar “Por que non escribiches os agradecementos antes?”. Así que, miña xente, vou intentar facelo o mellor que poida e non esquecer a ninguén. Se fose así perdoádeme xa de antemán, e dicirvos que eu nunca chegaría a ser quen son de non ter sido por cada un de vós que vos cruzastes no meu camiño, regalándome anos, días, horas, minutos e segundos que me moldearon ata chegar a ser a persoa que son hoxe.

Gracias en primeiro lugar a Ángeles e Petra, por todas esas horas compartidas, pola vosa axuda infinita, pola vosa paciencia e por estar aí sempre para axudarme e dar un bo consello. Gracias polo aprendido no laboratorio, pero tamén polo aprendido a nivel persoal, que foi moito. Verdadeiramente tiveron moita sorte de rematar no voso laboratorio e poder facer esta tese baixo a vosa supervisión. A Carmela gracias por ser a mellor titora, sempre tan servicial e comprensiva con todo.

A Cristina. Cada día penso en ti e aínda non me podo crer que non esteas, pero sabes que... aínda que non estes esteas fisicamente sempre estas con nós. Mil veces encóntrome a min mesma pensando o que ti tiveses dito ou pensado en tal ou cal ocasión. Ti sempre criches en min, SEMPRE! Sei que estarías tan ghorghullosa de min...por iso esta tese tamén é túa! Ai Cris!! O teu apoio foi vital durante todo este percorrido. Nos comezos cando esas DGGEs se me resistían, cara o medio cando non sabía moi ben como comunicarme e xestionar a frustración e agora dándome forzas para seguir cada día sendo feliz, aínda que ás veces as cousas malas asomen na vida. Fuches sempre un exemplo a nivel persoal e profesional e seguíralo sendo. Quérote!

A Vanessa, alcaldesa da Fonsagrada, teño tanto que agradecerche que non sei por onde empezar se é que nada do que escriba aquí vaia ser suficiente... Gracias por cada momento, por cada conversa, gracias por ser un apoio sempre, por estar sempre comigo... Gracias por cada “Bos días” escrito por skype, por cada “Como estas hoxe?”, por cada mirada que o di todo, por terte sempre cerca aínda estando lonxe, por todos eses días comendo contigo diante dunha pantalla de ordenador (porque si, estando en Alemaña comín cada día contigo falando das nosas parvadas ou non tan parvadas)... Bendito Skype! Gracias por quererme como unha máis da familia! Adoro a Fonsagrada, a Xabi, ós teus pais e avós, á galega, á mona, á sevillana,... e seguiría pero non quero aburrir ó lector ☺. Gracias por cada día! A nivel profesional sempre fuches un apoio dándome bos consellos e folgos para poder seguir adiante, axudándome coas miñas dúbidas coas fraccións de metal dispoñible no solo ☺. A María de Esteiro, gracias por todo o que me dades cada día, que é demasiado. Cando vos oio subir polas escaleiras xa me alegrades o día e a semana. Quérovos tanto! Gracias polas risas, as comidas e por ser un apoio constante e sobre todo gracias por ensinarme que ser unha nai modelo é posible... Es espectacular! A Maribel, á miña Mari Pili, gracias por todos ese momentos que son moitos e infinitos. Estou a pensar que non me gusta nada terte lonxe!! Se é que un abrazo teu creo que podería curar calquera mal día ou case ☺. Gracias polas paellas, os “salmorejos”, as risas, os bailes, os “de lunaritos”. A Félix, o “chacho”, mil gracias por todas as risas compartidas e non compartidas. Gracias por eses chistes chorras que só ti e Cris podedes entender, chistes que ó enconralos polas redes sociais nos fan a todos volver a vós e a ese grupo de “eclecticistas”. Gracias por acordarte sempre de min e por chamarme aínda que esteamos a miles de quilómetros de distancia, non te imaxinas todo o que levo pensando en ti nestes últimos anos. Gracias por darme esperanza! A María de Madrid, Leganés, querida, sen ti este último ano sería moi distinto. Gracias polo teu apoio, por escoitar as miñas “pallasadas”, polo teu saber estar, a túa empatía ata niveis insospeitados, por axudarme a empoderarme, por ensinarme cousas novas cada día, por querer o galego e respectalo, como nos queres e respectas a nós... Gracias!

A Lidia, gracias por estar sempre ó meu carón, por aguantar as miñas lideiras, por deixarme entrar un pouquiño dentro da túa vida, pola túa complicidade. Espero terte sempre cerca! A Bea, gracias por traer a cordura á miña vida, que boa falta me facía. Gracias pola túa axuda incondicional sempre. Nos inicios, cando aínda ti, non sabendo nin o que era unha DGGE, te ofreciches a axudarme ó verme algo desesperada (solo un pouco eh!!! ☺) e agora ó final axudándome cos traballos gráficos e non tan gráficos. Moitas gracias! A Marián, gracias por escoitarme, por axudarme co traballo do labo e por aguantarme. Es moi grande!!! A Tania, gracias polos bos consellos e por axudarme a relativizar nestes últimos momentos. Gracias a toda a xente que está no laboratorio e tamén á que foi pasando por el deixando a súa pegada en min: Tino (gracias por traer sempre a alegría contigo), Andrea e Jose (gracias por estes meses e moita forza e alegría para o camiño), Lucía, Mariana, Leti e Paula Casal, gracias.

Gracias á xente do grupo de enzimas. A Carmen polos ánimos, por ter sempre un sorriso no momento adecuado e por ser sempre tan servicial, e tamén a Elena, Diana, Ana, Fátima e Sara eses cafés nunca huberan sido o mesmo sen vós. A toda a xente do departamento de Bioquímica do solo, a Ángela (gracias por preguntarme cada día como estou e por cada sorriso), a Serafín (por traer a alegría ós corredores do CSIC e por cada bos días cantado), a Ana Barreiro (gracias por ser unha amiga fóra e dentro do labo), tamén a Montse e Anita gracias. A Fina e Belén gracias polo voso cariño e por ter cada día unha boa palabra para min. Á xente de administración (Aurora, Mili, Sole e Carmín) e portaría (Alberto e Belén) gracias por axudarme con todo tipo de trámites. A María da biblioteca por toda a axuda brindada durante esta tese, buscandome artigos imposibles de atopar e por facerme sentir comoda na outra ala do edificio.

To all the people I have met in Braunschweig thank you!! Thank you to Konny for your help during all those years and also for the always inspiring conversations about science in which I have learned so much. Thank you as well to Holger, Sven, Viola, Ute, Namis, Vanesa, and all the people that share all this time with me. To Steffi and Martin thank you for all your love, support and for help me

every time. To my “Braunschweig equipo” Doreen, Flavia, Simone female, Susanne, Simone male, Luca, Dinguí, Teresa, Kerstin thank you for be my friends and for love me and support me during all this time. Thank you for every annual Christmas meeting around a cup of Glühwine and for keep being friends, even with the distance.

Thank you to all the people I have met in Vienna. Angela (thank you for give me the chance to be at your group and learn so much from you), Günter (you will keep being an example for me as a person an as a researcher), Erika (I am so happy to have met you, you are the best), Raheleh (thank you for every day and for every conversation), and also to Jan, Milica, Compant, Sissi, Gajender, Daniel, Elena, Branislav, Teresa, Amal, Aroa, Teresa Fresno.

A Xoana, Andrea, Mónica Silva, Bárbara (e a súa familia), Mónica Varela, Juan, Dv, Antonio, Gabi e Luis, ós meus amigos de Bioloxía moitas gracias por percorrer todo este camiño comigo, por confiar sempre en min e por quererme tanto.

Gracias a Tara por todo o tempo invertido para facer esta tese máis bonita.

Gracias as miñas “Cuntienses” que estiveron sempre ó meu carón dende o comezo.

Gracias tamén a Andrea Fonsagrada e Fran Conde, vos trouxéstedes en moitas ocasións o equilibrio (aínda que soe raro para os que vos coñecen, J).

Gustaríame darlle as gracias tamén ós meus profesores Miguel e Ángela, sen o seu exemplo inspirador en min, isto nunca tivese sido posible. Miguel quen me ía dicir a min con 15 anos (e 3000 faltas de ortografía) que hoxe ía estar aquí escribindo os agradecementos de esta tese. Ángela, ti abríchesme as portas da bioloxía, ensináchesme a amala e entendela. Gracias o teu exemplo cheguei ata aquí.

Gracias a Esther “pelos”, que me introduciu ó mundo científico e me fixo saber dunhas investigadoras novas e molonas que traballaban no IIAG.

Gracias á música e ós meus compañeiros de coro que me axudaron a ver que esta vida é máis bonita e feliz se un fai o que ama. A eles e a todos vós que sabedes o que sinto pola música dicirvos...

“Cantar é sempre o que a fazer eu ando
Sorrir é sempre o meu prazer infindo

Se canto e rio é porque vivo amando
E se amo e canto é porque vivo rindo

Se o pranto morre quando nasce o canto
Eu canto e rio pra matar o pranto
E gosto muito de quem canta e ri...”

Rogaciano Bezerra Leite

Gracias a toda a miña familia, biolóxica e de acollida, por crer sempre en min. Gracias a meus tíos, Paco e Carmucha, e os meus curmáns por preocuparse sempre por min e polo estado da tese. Gracias a Marián, Toño, Inés e Marina sodes moi especiais para min. Gracias por abrimme as portas da vosa casa como unha filla máis e por axudarme nos meus momentos máis baixos en Santiago. Gracias a Santi (admírote e sempre o farei) e Socorro por estar sempre aí.

Bedankt aan mijn belgische familie en vrienden voor al hun steun gedurende deze tijd.

Gracias a meu irmán e a miña cuñada polo seu apoio durante todos estes anos de tese, por facerme crer que este día ía chegar e que eu podía con todo e con máis. Quérovos!

A meus pais gracias por confiar en min sempre, por todo o apoio e o ánimo, por sentirvos sempre tan orgullosos desta “Filomena” ou “Clotilde”. Se esta tese merece ser adicada a alguén é a vós porque me destes todo o que son e o que teño. Ensinástesme que nesta vida hai que ser nobres e que o importante é vivir sendo feliz sen atopelar a ninguén no noso camiño, confiar que as cousas

positivas atraen só cousas boas e que do traballo sae todo (disto todo sabedes vós moito). Se isto foi difícil para alguén foi para vós! Sinto facervos pasar por isto pero agora xa está, prometo que non volvo facer máis unha tese ☺.

E por último pero non menos importante, gracias ó meu Bart. Que sorte tiven de coñecerte e de poder compartir toda unha vida contigo. Dá igual se é curta ou longa, pero saber que ti vas percorrer esta vida comigo fai todo máis sinxelo. Gracias por cada día, pola túa paciencia infinita, polo teu apoio diario, por ser crítico comigo e coa miña tese, pero non só quero agradecerche cousas, tamén che quero pedir perdón por todas as miñas ausencias, que foron moitas nos últimos tempos, por toda a “mala leche” descargada en ti e por non estar sempre ó 100%. A ti tamén che prometo que non volverei facer outra tese ☺.

Gracias a todos!!

20 de Xuño de 2017,

María Touceda González

The thesis focuses on the (1) characterisation and comparison of the bacterial communities associated with Ni-hyperaccumulating and metal-excluding plants growing in ultramafic soils naturally enriched in TE and (2) analysis of bacterial communities in soils contaminated with TE and treated with phytoremediation strategies. The work planned aimed to obtain information about bacteria potentially involved in the mechanisms of TE (hyper)accumulation and/or exclusion and to study the relationships between the bacterial communities and the changes induced in soil properties by phytomanagement.

