



**CSIC**



**PAPEL DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE  
BACTERIANO A TRAVÉS DEL SUELO Y SU IMPLICACIÓN EN LA  
BIODISPONIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO**

*Memoria que presenta*

**Celia Jiménez Sánchez**

*para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla*

*Sevilla, Abril de 2013*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todos los que han contribuido a la elaboración de esta Tesis Doctoral:

En primer lugar, un especial agradecimiento al Dr. José Julio Ortega Calvo, director de esta Tesis Doctoral, por haberme brindado la oportunidad de adentrarme en el mundo de la Investigación, por su excelente labor de dirección y por todo el conocimiento que me ha transmitido a lo largo de estos años.

A la Dra. Patricia Paneque, por aceptar la tutoría de esta Tesis y su actitud siempre disponible.

A los Dres. Lukas Wick Y Jan Sorensen, que han hecho posible que mis estancias en el extranjero sean una experiencia enriquecedora tanto profesional como personalmente. Especialmente, al Dr. Lukas Wick por la ayuda prestada en todo momento.

A la dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC), por las facilidades prestadas para la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Patricia Velasco Casal, por la ayuda ofrecida en los comienzos de la experimentación en el laboratorio.

A José Luis Sánchez-Quñones, por dejarse guiar por mis consejos durante su estancia en nuestro grupo.

A mis compañeros de laboratorio. A José Luis Niqui, por ser tan paciente conmigo, cuando le agobiaba con miles de preguntas, mientras él estaba inmerso en la escritura de su Tesis. A Nadine, por su inagotable sonrisa con la que me recibía cada mañana al entrar en el laboratorio. A Mari Carmen, mi compañera desde el primer día, gracias por los momentos que hemos compartido. A Eleonora, mi italiana preferida. Gracias por estar ahí incondicionalmente cada vez que lo he necesitado. A Rungroch, por esas largas discusiones en inglés, y por tantas risas compartidas. Gracias a todos por crear un ambiente tan agradable para el trabajo.

A mis compis del IRNAS, por los ratos inolvidables que hemos pasado en nuestro rincón de la cuarta planta. Especialmente a Alfonso, por ser como uno más de nuestro grupo.

A mis amigas, con las que he vivido tantos momentos, por haberme apoyado en la realización de este trabajo. Porque ellas también han recorrido este camino conmigo.

Por último, quiero agradecer de forma especial, a mi familia. Porque han vivido intensamente esta experiencia tanto como yo. Y de manera muy especial a mis padres, este trabajo también es vuestro.

Una vez más, gracias a todos.

RESUMEN.....	IX
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
I.1 ESTRATEGIAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS.....	2
I.2 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	5
I.3 MOVILIDAD BACTERIANA.....	7
I.3.1 Quimiotaxis bacteriana.....	9
<i>I.3.1.1 Señalización de la respuesta quimiotáctica.....</i>	<i>10</i>
<i>I.3.1.2 Estudio del patrón de movilidad en la             respuesta táctica.....</i>	<i>11</i>
<i>I.3.1.3 Modificación del patrón de movilidad             como método de bioestimulación.....</i>	<i>14</i>
I.4 ADHESIÓN BACTERIANA SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS.....	16
I.4.1 Tipos de adhesión.....	17
<i>I.4.1.1 Interacciones de largo alcance.....</i>	<i>17</i>
<i>I.4.1.2 Las interacciones de corto alcance.....</i>	<i>18</i>
<i>I.4.1.3 Teoría DLVO aplicada a células bacterianas.....</i>	<i>19</i>
I.4.2 Factores que afectan a la adhesión bacteriana.....	20
I.5 TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS.....	21
I.5.1 Teoría de filtración de coloides (CFT).....	21
I.5.2 Bloqueo del colector.....	23
I.5.3 Factores que afectan al transporte bacteriano.....	25
<i>I.5.3.1 Fuerza iónica del medio.....</i>	<i>25</i>

1.5.3.2 Velocidad de flujo.....	25
1.5.3.3 Concentración celular.....	25
1.5.3.4 Propiedades hidrodinámicas.....	26
1.5.3.5 Rugosidad de la superficie del colector.....	27
1.5.3.6 Tamaño de partícula del colector.....	27
1.5.3.7 Movilidad bacteriana.....	27
1.5.3.8 Materia orgánica.....	29
I.6 BIODISPONIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES.....	29
1.6.1 Quimiotaxis bacteriana como mejora de la biodisponibilidad y biodegradación.....	30
1.6.2 La nanotecnología como aplicación en biorremediación.....	32
<b>CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
III.1 REACTIVOS.....	36
III.2 EFECTORES TÁCTICOS.....	36
III.3 MATERIALES POROSOS.....	39
III.4 ANILLAS DE SILICONA.....	40
III.5 ESTIRPES BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	40
III.5.1 <i>Pseudomonas putida</i> G7.....	40
III.5.2 <i>Escherichia coli</i> /pRL 1063.....	42
III.5.3. <i>Escherichia coli</i> /Prk 2063.....	43
III.5.4 Transformantes obtenidos.....	43

III.6 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES QUIMIOTÁCTICOS.....	43
III.6.1 Conjugación triparental con el transposón Tn5.....	43
III.6.2 Selección de mutantes válidos.....	44
III.7 CARACTERIZACIÓN DE <i>P. putida</i> G7.....	45
III.8 ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD BACTERIANA.....	46
III.9 EXPERIMENTOS PARA EL ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TÁCTICA.....	48
III.9.1 Ensayo capilar.....	48
III.9.2 Ensayo de gota con hidroxipropilmetilcelulosa.....	50
III.10 ENSAYO DE ADHESIÓN.....	51
III.11 ENSAYOS DE TRANSPORTE EN COLUMNAS.....	52
III.11.1 Empleo de quimioefectores en los ensayos de transporte.....	55
<i>III.11.1.1 Efecto directo.....</i>	<i>55</i>
<i>III.11.1.2 Efecto del pre-bombeo.....</i>	<i>55</i>
<i>III.11.1.3 Reversión del transporte de bacterias                 adheridas en las columna.....</i>	<i>56</i>
<i>III.11.1.4 Empleo del quimioefector naftaleno                 en las columnas.....</i>	<i>56</i>
<i>III.11.1.5 Caracterización físico-química de los                 quimioefectores empleados.....</i>	<i>56</i>
III.12 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO.....	57
III.12.1 Carga de anillas de silicona con naftaleno marcado con <sup>14</sup> C radiactivo.....	57
III.12.2 Ensayos de mineralización en columnas.....	58
III.12.3 Ensayo de mineralización en fase acuosa.....	60
III.12.4 Balance de masas.....	61

<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b> .....	63
IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ESTIRPE OBJETO DE ESTUDIO .....	64
IV.2.1 Curva de crecimiento en función de la fuente de carbono.....	64
IV.2.2 Hidrofobicidad celular y carga superficial.....	66
IV.2.3 Morfología y tamaño celular.....	66
IV.2 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES	
QUIMIOTÁCTICOS .....	68
IV.1.1 Resistencia a antibióticos.....	68
IV.1.2 Mutantes deficientes en la respuesta táctica.....	68
IV.3 ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD BACTERIANA .....	70
IV.3.1 Movimiento de respuesta táctica positiva.....	70
IV.3.1.1 Patrón de movilidad frente a atrayentes.....	71
IV.3.1.2 Patrón de movilidad del mutante 55.....	71
IV.3.2 Movimiento abrupto.....	73
IV.3.2.1 Patrón de movilidad de la estirpe <i>P. putida</i> G7 en presencia de NPsAg y glucosa.....	73
IV.3.2.2 Patrón de movilidad del mutante 184.....	75
IV.3.2.3 Patrón de movilidad en la fase exponencial.....	77
IV.3.3 Influencia de la materia orgánica disuelta sobre el patrón de movilidad.....	79
IV.3.4 Estudio comparativo de los patrones de movilidad.....	81

IV.4 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TÁCTICA.....	85
IV.4.1 Respuesta táctica detectada por ensayo capilar.....	85
IV.4.1.1 Respuesta táctica positiva.....	85
IV.4.1.2 Respuesta táctica negativa .....	86
IV.4.1.3 Hipermovilidad causada por la glucosa .....	91
IV.4.1.4 Efecto de la materia orgánica disuelta en la respuesta táctica.....	93
IV.4.2 Respuesta táctica en medio semisólido.....	95
IV.5 INFLUENCIA DEL PATRÓN DE MOVILIDAD EN LA ADHESIÓN BACTERIANA .....	96
IV.5.1 Adhesión a arena.....	96
IV.5.2 Adhesión a las anillas de silicona .....	99
IV.5.3 Adhesión a la interfase NAPL-agua.....	99
IV.6 TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS.....	100
IV.6.1 Factores independientes de la movilidad que afectan al transporte .....	100
IV.6.1.1. Efecto de la fuerza iónica.....	100
IV.6.1.2 Efecto del tamaño del colector.....	101
IV.6.1.3 Efecto de la velocidad de flujo.....	102
IV.6.2 Papel de la movilidad intrínseca en el transporte.....	103
IV.6.2.1 Saturación del colector por alta densidad de células con movilidad intrínseca.....	103

IV.6.2.2 Fases del ciclo celular bacteriano.....	105
IV.6.2.3 Inmovilización celular.....	107
IV.6.2.3a Inactivación del movimiento.....	107
IV.6.2.3b Inducción de muerte celular.....	110
IV.6.3 Influencia del patrón de movilidad inducido.....	111
IV.6.3.1 Promoción del transporte en presencia de quimioefectores positivos.....	111
IV.6.3.2 Promoción del transporte debido al bloqueo del colector.....	112
IV.6.3.2.1 Efecto de las nanopartículas de plata (NPsAg).....	112
IV.6.3.2.2 Efecto de la glucosa.....	115
IV.6.3.3 Transporte bacteriano de los mutantes 55 y 184.....	117
IV.6.4 Efecto de la materia orgánica en el transporte bacteriano...120	
IV.6.4.1 Materia orgánica disuelta (MOD).....	120
IV.6.4.2 Materia orgánica adsorbida.....	122
IV.6.4.3 Movilización de células adheridas.....	125
IV.6.4.4 Transporte bacteriano a través de suelo agrícola y un suelo forestal rico en materia orgánica.....	127
IV.6.5 Efecto de los compuestos sobre las propiedades físico-químicas de la superficie de arena.....	129
IV.6.6 Ausencia de respuesta quimiotáctica.....	131
IV.6.6.1 Efecto de la fuente de cultivo en el transporte bacteriano.....	131
IV.6.6.2 Mutante defectuoso en la quimiotaxis hacia exudados de girasol.....	134

IV.7 INFLUENCIA DEL PATRÓN DE MOVILIDAD BACTERIANO EN LA BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO.....	137
IV.7.1 Biodegradación de naftaleno en las columnas de transporte.....	137
IV.7.2 Biodegradación de naftaleno en suspensiones bacterianas .....	141
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
V.1 MOVILIDAD BACTERIANA.....	146
V.1.1 Movilidad bacteriana intrínseca.....	146
V.1.2 Respuesta táctica positiva.....	148
V.1.3 Respuesta táctica negativa.....	148
V.1.4 Respuesta de hipermovilidad.....	150
V.1.5 Efecto de la materia orgánica sobre la movilidad bacteriana.....	150
V.2 PAPEL DE LA MOVILIDAD BACTERIANA EN LA ADHESIÓN.....	154
V.3 PAPEL DE LA MOVILIDAD BACTERIANA EN EL TRANSPORTE.....	155
V.3.1 Movilidad bacteriana intrínseca.....	155
<i>V.3.1.1 Factores fisiológicos que afectan al                     transporte y deposición celular.....</i>	<i>156</i>
<i>V.3.1.2 Factores físicos que afectan al transporte                     y deposición celular.....</i>	<i>159</i>
V.3.2 Influencia de la respuesta táctica en el transporte bacteriano.....	162

V.3.3 Influencia de la materia orgánica en el transporte bacteriano.....	166
V.6 INFLUENCIA DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN LA BIODISPONIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO.....	169
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....</b>	<b>171</b>
<b>CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>

## RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se ha investigado el papel del patrón de movilidad bacteriano en la deposición y transporte a través de medios porosos saturados, con el objetivo de aumentar la biodegradación de naftaleno en condiciones de baja biodisponibilidad.

Los efectos positivos de la movilización bacteriana en la bioerremediación depende de la eficiencia del movimiento bacteriano a través de medios porosos, que a veces está limitado por unas tasas altas de deposición. Por otro lado, la adhesión a las superficies puede ser beneficiosa para promover la biodegradación de los contaminantes que se caracterizan por una cinética lenta de desorción.

Por ello, la hipótesis de partida ha sido que un cambio en el patrón de movilidad, como parte de la respuesta táctica frente a determinados compuestos, puede tener un efecto en la movilización bacteriana en el suelo, con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad y biodegradación de contaminantes orgánicos. Durante esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un abordaje experimental progresivo para comprobar dicha hipótesis.

En primer lugar, se estudió la respuesta táctica de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 frente a distintos compuestos: salicilato, nanopartículas de plata (NPsAg) y glucosa como ejemplo de atrayente, repelente y fuente de carbono, respectivamente. También se emplearon distintas fuentes de materia orgánica disuelta, de relevancia ambiental: exudados de raíces de girasol (*Helianthus annuus*), ácidos húmicos de un suelo y el fertilizante oleofilico S-200.

El análisis de la respuesta táctica se llevó a cabo mediante el ensayo capilar para el estudio de la quimiotaxis a nivel global y mediante el análisis de las trayectorias celulares individuales mediante un programa informático que caracteriza el movimiento celular individual.

El salicilato y los exudados de girasol provocaron una respuesta de atracción en la estirpe *Pseudomonas putida* G7, observando que las trayectorias celulares en presencia de estos compuestos se caracterizaron por un movimiento rectilíneo mantenido sin cambios de dirección. Por el contrario, la exposición a las NPsAg hizo que las células cambiaran frecuentemente la dirección de su movimiento. En presencia de glucosa,

los cambios fueron también más frecuentes, pero, además, la velocidad fue muy alta (marcada por la frecuencia de aceleraciones mayores de  $60 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Esta respuesta se ha descrito como una reacción de hipermovilidad causada por la glucosa en solución.

Las diferencias en el patrón de movimiento provocaron diferentes tendencias de adhesión a superficies sólidas, relacionándose la frecuencia de cambios de dirección con una mayor deposición en columnas empaquetadas de arena, donde se estudió el transporte bacteriano.

El aumento de transporte bacteriano en presencia de exudados, provocó un aumento de la biodegradación de naftaleno adsorbido a una anilla de silicona en el fondo de la columna. La exposición de *P. putida* G7 a NPsAg conllevó a un aumento de la adhesión bacteriana, tanto a la superficie de arena como a la de la anilla donde estaba adsorbido el naftaleno. El aumento en la adhesión bacteriana provocó un aumento de la biodegradación del naftaleno adsorbido.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral son relevantes para la mejora de las técnicas de biorremediación. Por ejemplo, podría llevarse a cabo la bioestimulación de comunidades degradadoras de un emplazamiento contaminado mediante el empleo de compuestos atrayentes que mejoren la movilización bacteriana hacia el foco de contaminación. Por su parte, sustancias que favorezcan la adhesión bacteriana, como las NPsAg y la glucosa, podría mejorar las técnicas de recuperación de petróleo o de tratamiento de purificación y desinfección de aguas.

# **I. INTRODUCCIÓN**

Existe una concienciación global acerca del problema de la contaminación ambiental en la actualidad. Es evidente que el desarrollo industrial y tecnológico del último siglo ha conllevado a un aumento del nivel de contaminantes en los ecosistemas, que requiere de la evaluación de los emplazamientos contaminados, y en su caso, del tratamiento para la reutilización de los mismos.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se han descrito como uno de los grupos de contaminantes más peligrosos, tanto por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) como por la Comunidad Europea, debido al alto nivel de toxicidad determinado por sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas. La distribución de los HAP en el ecosistema es de amplio espectro, tanto en el sistema acuático como terrestre, siendo principalmente importante el foco de contaminación existente en los suelos. Las emisiones industriales y urbanas, así como el incremento del tráfico y los incendios accidentales han contribuido de forma notoria a la presencia de estos contaminantes en el suelo, tanto directamente, como a través de la deposición desde la atmósfera. Los rangos de concentración de estos compuestos orgánicos en el suelo, dependen de la zona geográfica y de las propiedades edáficas del mismo, aunque generalmente se encuentran en un rango de 100 a 1000 µg/kg lo que hace previsible la necesidad de remediación de los suelos contaminados por estos compuestos (Ortega-Calvo y col., 2013).

## **I.1 ESTRATEGIAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS**

La remediación consiste en la eliminación de parte o el total de los contaminantes en un emplazamiento determinado con la finalidad de recuperar el terreno afectado.

Inicialmente, los procesos de tratamiento y remediación eran llevados a cabo por la industria, pero a menudo, el enfoque era pragmático y carecía de una base científica, por lo que en la actualidad se está observando una demanda en la necesidad de investigar acerca de la mejora de las técnicas de remediación. Existen 4 alternativas principales para el tratamiento de suelos contaminados (Stegmann y col., 2001):

1. Dejar la zona contaminada tal como está, pero restringiendo su uso
2. Confinamiento completo o parcial de la contaminación
3. Excavación, retirada y depósito en vertedero controlado
4. Recuperación del emplazamiento contaminado.

A largo plazo, la única alternativa factible es la descontaminación o remediación para la recuperación del suelo o emplazamiento.

La recuperación de un suelo contaminado puede hacerse mediante tratamientos *in situ*, si se lleva cabo en el emplazamiento a descontaminar, o tratamientos *ex situ*, donde el foco de contaminación se retira para ser tratado externamente al emplazamiento en cuestión.

En función de la naturaleza del proceso de descontaminación se distinguen 3 tipos de tratamiento: recuperación físico-química, térmica o biológica.

En la tabla I.1 se recogen algunas técnicas empleadas para la recuperación de suelos, teniendo en cuenta la clasificación anteriormente comentada. Los tratamientos *in situ* tienen la ventaja de su bajo coste, así como la menor exposición tóxica de los contaminantes para la población, ya que su empleo no requiere la excavación y retirada del suelo afectado. Si el tratamiento para la recuperación del suelo es de tipo biológico, se podrían aprovechar los recursos naturales del medio para favorecer la descontaminación, como es el caso de la biorremediación o remediación biológica del suelo (que será el objetivo de nuestro estudio).

**Tabla I.1** Técnicas empleadas en el tratamiento de suelos contaminados según el lugar de aplicación y la naturaleza del proceso de recuperación

Tratamiento				
<i>In situ</i>		<i>Ex situ</i>		
Físico-químico	Biológico	Físico-químico	Biológico	Térmico
Extracción con vapor	Biorremediación	Extracción con disolventes	Laboreo agrícola	Desorción térmica
Lavado	Fitorremediación	Lavado	Biopilas	Incineración
Solidificación y estabilización	Rizzorremediación	Óxido-reducción	Bioreactores	
Separación electrocinética		Deshalogenación química		
		Solidificación y estabilización		

La remediación biológica o biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples, poco o nada contaminantes.

Esta técnica constituye un campo de la ingeniería ambiental que está evolucionando de forma notable, principalmente por su bajo coste y su menor impacto ambiental, y en los últimos años se está empezando a considerar como una seria alternativa a técnicas físico-químicas de remediación de suelos contaminados. Se pueden considerar 3 tipos de biorremediación (Alexander, 1999)

**Bioatenuación natural:** se trata de la degradación de contaminantes por las poblaciones microbianas autóctonas de la zona afectada. Se caracteriza por su largo periodo de tiempo para poder alcanzar el nivel de contaminantes deseado.

Como alternativas a este proceso de degradación natural, se tiende a mejorar el proceso de recuperación, aumentando la población microbiana de manera exógena (inoculando bacterias que no sean

autóctonas) o mejorando la actividad degradadora de las estirpes existentes en el emplazamiento contaminado, mediante las técnicas del bioaumentación y bioestimulación, respectivamente.

**Bioaumentación:** consiste en la adición de estirpes competentes capaces de degradar los contaminantes presentes en un determinado emplazamiento. Requiere del conocimiento previo del tipo de contaminación, capacidad degradadora de las estirpes y estudio de compatibilidad entre microflora autóctona y exógena (El Fantroussi y Agathos, 2005).

**Bioestimulación:** consiste en promover un ambiente favorable para las comunidades microbianas autóctonas, siendo capaces, así, de degradar eficientemente los contaminantes. Esto incluye manipulaciones tales como la adición de nutrientes (nitrógeno y fósforo), adición de aceptores de electrones como el oxígeno, y la mejora de la humedad y temperatura del suelo. Así como el empleo de compuestos que mejoren la movilidad y distribución de las comunidades microbianas en el suelo.

Bajo este marco de perspectivas tecnológicas, nuestro estudio puede tener cabida tanto en el bioaumentación como en la bioestimulación. Por una parte, en la utilización de inoculantes quimiotácticos, y por otra, mediante el empleo de sustancias que afectan a la movilidad bacteriana, mejorando, de esta manera, su capacidad degradadora.

## 1.2 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los HAP son susceptibles de ser biodegradados. Es decir, los microorganismos son capaces de asimilar estos compuestos como fuente de carbono y energía, reduciendo así su concentración ambiental. Se ha descrito que de los 16 HAP clasificados por la US-EPA, aquellos cuyo peso molecular se encuentre por encima de 202 g/mol, pueden ser degradados aeróbicamente, estando vinculadas las reacciones oxidativas de los HAP con el crecimiento microbiano. Los de alto peso molecular como el pireno y el fenantreno también pueden ser mineralizados, con el fin de utilizar la energía obtenida de la degradación, para el desarrollo de las comunidades bacterianas en el suelo. El resto de HAP, como el benzo(a)pireno sólo pueden degradarse por cometabolismo (Kanaly y Harayama, 2000). El cometabolismo no ofrece a los microorganismos la

posibilidad de proliferar, ya que la transformación de los contaminantes no conlleva un aumento de la biomasa ni la conversión en CO<sub>2</sub>. Así que la biodegradación resulta ser muy lenta, siendo incompleta la transformación de los contaminantes (Ortega-Calvo y col., 2013). Durante el proceso de degradación por cometabolismo, se producen intermediarios metabólicos que sí pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía por otros microorganismos, poniendo en evidencia el fenómeno de comensalismo.

Aunque existe una gama importante de microorganismos capaces de degradar estos compuestos, hay que destacar que el proceso de descontaminación nunca llega a ser completo, debido, entre otros factores, a la baja biodisponibilidad de los HAP en el suelo.

El suelo constituye un sistema complejo, donde los HAP pueden estar ocluidos en microporos de difícil acceso para los microorganismos, disueltos en fases orgánicas líquidas denominadas líquidos en fase no acuosa o NAPLs (de sus siglas en inglés). También puede encontrarse adsorbidos a componentes del suelo, principalmente a las arcillas o a la materia orgánica. Es en estos casos donde la biodisponibilidad está limitada, y la biodegradación no se ve favorecida.

La biodisponibilidad de los HAP puede aumentarse por varios mecanismos: empleo de tensioactivos biológicos, movilización bacteriana mediada por quimiotaxis, bioestimulación dirigida en la interfase de contaminantes hidrofóbicos, rizorremediación y electrobioremediación. Con el empleo de estas estrategias es posible aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos en el suelo, pero sin necesidad de aumentar el riesgo de toxicidad para el medio ambiente (Ortega-Calvo y col., 2013). En el caso de la quimiotaxis bacteriana, la biodisponibilidad del contaminante aumenta por la facilitación del desplazamiento de los microorganismos al foco de contaminación. Por tanto, no se fomenta la liberación del contaminante al medio. En estudios anteriores, la tendencia a mejorar las técnicas de biorremediación en cuanto a la mejora de la biodisponibilidad de contaminantes, habían sido dirigidas a intentar aumentar la desorción del compuesto desde la fase orgánica o compartimento donde se encuentre retenido en el suelo, hacia la fase acuosa. Lo que conllevaría a un riesgo de toxicidad en el medioambiente, ya que si la tasa de mineralización fuese menor a la de reparto, el

contaminante quedaría en solución sin ser degradado. Por lo que, a veces, es mejor la opción de retener los contaminantes de manera controlada en el suelo, con el uso de adsorbentes, para que secuestren los contaminantes y no supongan una amenaza para el medioambiente. A la hora de evaluar un foco de contaminación para su posible tratamiento, habría que tener en cuenta esta consideración. Es decir, evaluar la posibilidad de degradación sin provocar un riesgo para el ecosistema.

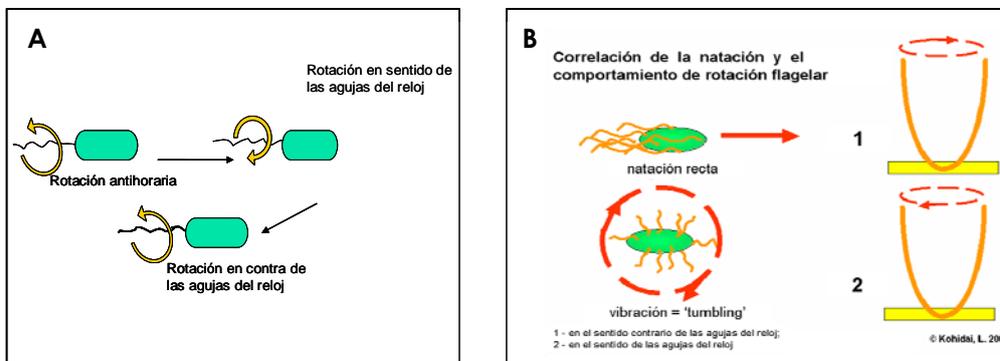
Además de la baja biodisponibilidad de HAP en el suelo, los microorganismos pueden no estar disponibles para degradar los compuestos, entendiéndose como una restricción física del movimiento bacteriano. De esta forma, los microorganismos pueden encontrarse a una larga distancia respecto del foco de contaminación o adsorbidos a partículas del suelo, incapaces de desplazarse hacia el foco de contaminación. Bajo estas condiciones de escasa movilidad, las técnicas de biorremediación pueden verse disminuidas, ya que para el crecimiento microbiano es necesario el contacto directo entre la célula bacteriana y el contaminante.

### **1.3 MOVILIDAD BACTERIANA**

La movilidad bacteriana supone una ventaja de adaptación frente a aquellas bacterias que carecen de esta propiedad. A lo largo de la evolución se han ido adoptando distintas formas de movimiento según los requerimientos nutricionales y propiedades del medio donde se desarrolla la población microbiana. Algunas de las estrategias de movilidad seguidas por las células bacterianas son: el movimiento dirigido por la rotación de los flagelos (del término en inglés, "swimming"), la movilidad organizada sobre superficies sólidas de un conjunto de células formando una colonia ("swarming"), movimiento intermitente y accidental de una única célula bacteriana o de un grupo de bacterias en una colonia ("twitching") o el movimiento de un a través del deslizamiento de prolongaciones celulares, sin presentar órganos especiales para la propulsión o el movimiento dirigido (gliding") (Eisenbach, 2001). De todas las estrategias seguidas, la más extendida en la diversidad bacteriana, es la movilidad por la propulsión del flagelo.

Existen distintos patrones de movilidad según la localización y el número de flagelos en la célula bacteriana, dependiendo de la especie bacteriana

de que se trate. La bacteria *Escherichia coli* presenta una distribución peritrica de los flagelos que hace que las células se muevan en una dirección (cuando el rotor flagelar gira en el sentido antihorario) y los flagelos se alinean formando un haz en un polo de la célula (figura I.1). Cuando el rotor flagelar gira en sentido horario, los flagelos se recolocan en distribución peritrica y la célula se para y se reorienta, para volver a nadar en otra dirección. En el caso de *Pseudomonas putida*, los cambios de dirección no van acompañados de un momento de reorientación, sino que el grupo de flagelos polares que presenta la bacteria, hace que la célula se mueva siguiendo trayectorias rectilíneas interrumpidas por cambios en la dirección de manera aleatoria (Olson, 2004).



**Figura I.1** Patrón de movilidad bacteriano por flagelo en la especie *Pseudomonas putida* (A) y *Escherichia coli* (B)

La existencia del flagelo permite a las células moverse a través de medios acuosos en busca de nutrientes que no están homogéneamente distribuidos (Weiss y col., 1995) y bajo condiciones de escasez de alimento que requiera ir en busca de nuevos hábitats para la supervivencia. Por esta última razón, surge el fenómeno de la quimiotaxis, como una forma para localizar gradientes de concentración de una sustancia que sirva como fuente de carbono, dirigiéndose hacia ella para consumirla. La quimiotaxis apareció a raíz de la movilidad dirigida en la búsqueda de ambientes favorables para la supervivencia. Recientemente, se ha descrito que la respuesta táctica está marcada por la presencia de gradientes de concentración espacio-temporales. Los cambios en la concentración de

estos gradientes justifica el movimiento dirigido por quimiotaxis como una estrategia evolutiva importante (Celani y Vergassola, 2010).

El hecho de que no todas las bacterias móviles por flagelo son quimiotácticas, hace pensar en la idea de que la movilidad sigue siendo beneficiosa y prevalece sobre la quimiotaxis en algunos casos (Witt y col., 2011) Bajo condiciones normales de abastecimiento nutricional, la quimiotaxis supondría un gasto energético innecesario, ya que no hay escasez de nutrientes para el crecimiento bacteriano. Por ello, la movilidad bacteriana es suficiente como para facilitar la ingesta de alimento. No hay necesidad de gastar energía en la transcripción y síntesis de receptores de membrana y señalizadores de respuesta, necesarios para la respuesta quimiotáctica. Es por ello por lo que la movilidad se ha seguido manteniendo en la evolución, a pesar de la aparición del fenómeno quimiotáctico.

### **1.3.1 QUIMIOTAXIS BACTERIANA**

Como ya hemos comentado, la quimiotaxis bacteriana es el fenómeno mediante el cual la bacteria detecta sustancias que suponen una fuente de carbono para su crecimiento. En términos generales, es la forma de detectar compuestos atrayentes en el medio y dirigirse hacia ellos gracias al movimiento de flagelos, en respuesta a una quimiotaxis positiva o respuesta de atracción. Asimismo le permite detectar sustancias repelentes que pueden ser tóxicas, provocando que las bacterias se alejen de la fuente del compuesto.

No necesariamente una sustancia atrayente tiene que ser una fuente carbono, y un repelente no tiene por qué ser un compuesto tóxico para el microorganismo. De hecho, el acetato y el triptófano, que no son productos perjudiciales, se han descrito como repelentes para la bacteria *E. coli* (Koshland Jr, 1977).

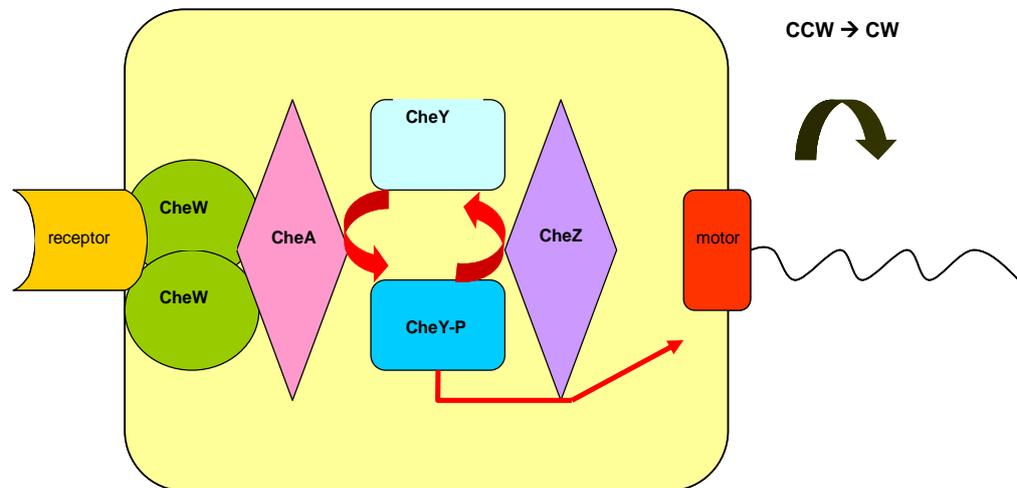
La detección de las sustancias en el medio es posible gracias a la presencia de receptores de membrana que detectan los compuestos en solución. Estos receptores de membrana, normalmente son proteínas transmembranales que transmiten la señal de reconocimiento de la sustancia mediante un sistema de transducción de señales intracelular. Los receptores de membrana son altamente específicos, siendo diseñados

para detectar atrayentes o repelentes, y cada receptor puede detectar únicamente una o dos sustancias (Koshland Jr, 1977). Cabe destacar la posibilidad de que un mismo compuesto sea un atrayente para un microorganismo constituyendo, por el contrario, un repelente para otro. Tal es el caso de un contaminante en el medio ambiente, fenol, que se ha descrito como atrayente para *E. coli* y como repelente para el serovar *Typhimurium* (Imae y col., 1987) y *Vibrio albinolyticus* (Homma y col., 1996)

### **1.3.1.1 Señalización de la respuesta quimiotáctica**

La quimiotaxis es uno de los mecanismos de transducción de señales mejor conocido y conservado a lo largo de la evolución bacteriana. El mecanismo de control se basa en el sistema de dos componentes, en el cual la fosforilación de un regulador de respuesta que refleja la fosforilación de una histidina autoquinasa, la cual a su vez, detecta parámetros ambientales a través de un receptor de membrana (Szurmant y Ordal, 2004).

En quimiotaxis, el receptor localizado en la membrana plasmática detecta un gradiente químico externo que transmite vía proteína CheW a la histidina autoquinasa CheA, que se autofosforila en respuesta a la llegada de esta señal. La proteína CheA fosforilada es sustrato del regulador de respuesta CheY, que cataliza la transferencia del grupo fosforil a un aspartato. La proteína CheY fosforilada interactúa con el motor flagelar mediante la conexión a CheZ, transmitiendo la señal de cambio en el patrón de movimiento (figura 1.2) (Eisenbach, 2001).



**Figura 1.2** Esquema de una célula bacteriana que representa la ruta de señalización celular que implica el reconocimiento de un quimioefector por el receptor localizado en la membrana para desencadenar la rotación del motor flagelar bacteriano

La fuerza impulsora del motor flagelar se genera por el transporte de protones a través de un canal de protones transmembrana. La fuerza protón motriz se genera en la respiración, y en condiciones anaerobias, mediante la rotura de ATP por la ATPasa.

En algunas especies, como *Bacillus* y *Vibrio*, el motor flagelar rota gracias al impulso generado por el transporte de iones sodio a través de la membrana (Eisenbach, 2001).

### 1.3.1.2 Estudio del patrón de movilidad en la respuesta táctica

La quimiotaxis bacteriana se puede estudiar desde un punto de vista macroscópico, centrándose en el movimiento de una población bacteriana o grupo de células para determinar la dirección del movimiento en un gradiente de concentración de un compuesto, o desde

un punto de vista microscópico, estudiando la quimiotaxis mediante el análisis de las trayectorias celulares individuales.

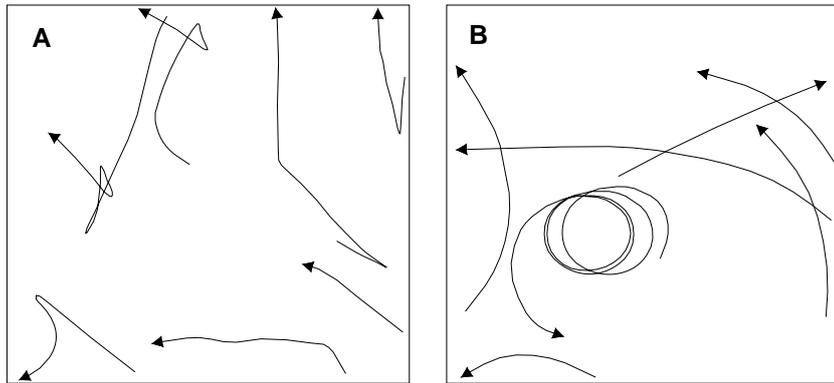
Para estudiar el movimiento macroscópico, se ha utilizado comúnmente el ensayo "swarm plate" llevado a cabo en una placa de Petri para ver el desplazamiento bacteriano sobre una superficie semisólida (agar al 0,3%) en respuesta a la sustancia ensayada que está en solución. El desplazamiento se manifiesta como un anillo de crecimiento alrededor del punto de inoculación bacteriano en el centro de la placa de petri. A medida que aumenta la degradación del compuesto, aumenta el anillo de desplazamiento. Este ensayo cualitativo se ha empleado para la detección de mutantes deficientes en la respuesta táctica (Harwood y col., 1994a; Rashid y Kornberg, 2000; Guo y col., 2009). El inconveniente del ensayo es que sólo puede emplearse para dectar la respuesta de atracción de compuestos que sean degradables por el microorgrnismo estudiado. Otro ensayo cualitativo para detectar la respuesta de atracción hacia un compuesto es el ensayo de "gota con hidroxipropilmetil celulosa, en donde se observa un anillo de turbidez alrededor del centro de una placa de petri (de 60mm de diámetro) en respuesta quimiotáctica a la sustancia colocada en el centro de la placa (Harwood y col., 1994a). En este caso, la respuesta de atracción fue evidente a la hora de la colocación del compuesto, por lo que no se requiere que la sustancia ensayada sea degradada por la bacteria. Otro método parecido es el de agarosa, en donde la sustancia que se quiere estudiar se coloca en solución con la agarosa sobre un portaobjetos en una cámara elaborada por dos pequeñas piezas de plástico. Se coloca un cubreobjetos, y a continuación se inocula la bacteria. La observación de un anillo de turbidez confirma la respuesta de atracción (Yu y Alam, 1997). Este método se ha empleado en la detección de quimiotaxis a tolueno, benceno y tricloroetileno, ya que el sistema minimizó las pérdidas de los compuestos por volatilización (Parales y col., 2000). El método capilar se emplea para observar la entrada celular dentro de un capilar de vidrio de 1  $\mu$ L de capacidad, en respuesta a la sustancia atrayente colocada en el interior del mismo (Adler, 1973). El método también permite la cuantificación de la respuesta de atracción, mediante el conteo de viables que se encontraban dentro del capilar. Este metodo se ha empleado en estudios de quimiotaxis hacia naftaleno por parte de *Pseudomonas putida*

(Harwood y col., 1994a; Marx y Aitken, 2000; Velasco-Casal y col., 2008). El método capilar también puede utilizarse para determinar una respuesta de repelencia. En este caso, la sustancia se coloca en la suspensión celular en la cámara de quimiotaxis. El número de colonias dentro de los capilares que sólo contenían la solución control, indica la repelencia a la sustancia ensayada (Tso y Adler, 1974; Ortega Calvo y col., 2011).

Actualmente se está investigando en nuevas técnicas para la detección del movimiento macroscópico en respuesta a un gradiente de concentración. Para ello, se utilizan unos sistemas de cámara quimiotáctica parecida a la del ensayo capilar, donde la liberación controlada (mediante el uso de silicona o polidimetilxilosano, PDMS) de la sustancia permite estudiar el movimiento global a través del gradiente químico del compuesto, observándose imágenes al microscopio óptico como bandas direccionales que responden al movimiento de una población celular dirigido por quimiotaxis (Ahmed y col., 2010; Jeong y col., 2010; Singh y Olson, 2011).

Otra de las técnicas disponibles realiza el estudio mediante microscopía óptica y el análisis de trayectorias celulares en presencia de un determinado compuesto. En presencia de un atrayente, las trayectorias celulares individuales cambian su patrón de movimiento. En el caso de la especie *Escherichia coli*, las longitudes son mayores para los tramos en línea recta en presencia de un atrayente (Macnab, 1980). En presencia de un atrayente, las células de *Escherichia coli* giran con menos frecuencia porque el número de receptores de la respuesta positiva quimiotáctica aumenta, y por tanto, los tramos en línea recta son más largos (Berg y Brown, 1972)

En el caso de la especie *Pseudomonas putida*, las trayectorias celulares se caracterizan por ser rectilíneas o curvas manteniéndose en ausencia de cambios de dirección (figura 1.3) (Harwood, 1989).



**Figura 1.3** Patrón de movilidad de *Pseudomonas putida* G7 en ausencia (A) y presencia (B) de ácido benzoico como respuesta táctica positiva (Harwood, 1989)

En presencia de un repelente, los cambios de dirección en las trayectorias celulares fueron mayores, haciendo que el movimiento no fuera rectilíneo (como en el caso de un atrayente) (Oosawa y Imae, 1983).

Spudich y Koshland propusieron un método para detectar la frecuencia de giro de la bacteria *E. coli*, mediante la visualización de las trayectorias grabadas por una cámara de fotos después de un pulso de iluminación. Las células que giran con frecuencia, trayectorias de movilidad muy cortas, que aparecían en la imagen como puntos. Mientras que las células cuyas trayectorias eran más rectilíneas, se manifestaron como desplazamientos con una longitud determinada (Spudich y Koshland, 1975).

### **1.3.1.3 Modificación del patrón de movilidad como método de bioestimulación**

La bioestimulación engloba el conjunto de técnicas encaminadas a mejorar la actividad degradadora de las comunidades microbianas en un emplazamiento contaminado. Por tanto, podemos entender como bioestimulación el empleo de sustancias atrayentes o repelentes, para provocar un cambio en el patrón de movilidad con el fin de mejorar la interacción entre las células bacterianas y los contaminantes, y así aumentar la biodegradación.

La detección quimiotáctica de exudados de origen vegetal puede tener ciertos beneficios para la estimulación bacteriana, ya sea a nivel de una actividad degradadora de HAP (Ortega Calvo y col., 2003) o como estímulo para la simbiosis entre plantas y microorganismos (Caetano-Anolles y col., 1988). Los exudados vegetales comprenden un conjunto de compuestos orgánicos que son excretados por las raíces de plantas. Entre los componentes mayoritarios se encuentran diversos azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y ácidos grasos. Así como también pueden encontrarse vitaminas, taninos, alcaloides, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, etc. Por consiguiente, los exudados excretados por las raíces suponen una fuente de nutrientes para los microorganismos del suelo (Pinton y col., 2007). Se ha descrito la quimiotaxis bacteriana frente a exudados de origen vegetal en varias especies bacterianas, entre las que destaca *Rhizobium meliloti*, que responde quimiotácticamente a los exudados de *Medicago sativa*, como paso primordial para la asociación simbiótica entre planta y microorganismo, necesaria para el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico (Caetano-Anolles y col., 1988). Por otro lado, se ha comprobado que la actividad quimiotáctica hacia exudados de origen vegetal fomentó la movilización de la población bacteriana existente en el suelo hacia las proximidades del foco de contaminación (Ortega Calvo y col., 2003). El estudio comprendía la caracterización de 20 especies bacterianas móviles aisladas de suelos contaminados con petróleo para determinar la actividad quimiotáctica hacia exudados vegetales, liposacáridos y ciertos HAP (naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno).

Se ha observado, además, que los exudados de un hongo fitopatógeno, *Macrophomina phaseolina*, constituyeron un potente quimioatractivo para la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, haciendo que su patrón de movimiento pasase a seguir trayectorias de movilidad con escasos cambios en la dirección (en respuesta a la atracción hacia los exudados).

En otro estudio se concluyó que los exudados de raíces de *Lolium perenne* y el fenantreno indujeron cambios fisiológicos en las comunidades microbianas existentes en suelos contaminados, modificando principalmente su capacidad degradadora. Este estudio no considera específicamente la quimiotaxis bacteriana, pero es posible que las

modificaciones involucradas en el aumento de la biodegradación tuvieran relación con la respuesta de atracción a los exudados y/o al fenantreno por parte de las comunidades bacterianas (Corgie y col., 2004).

En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se determinó que la biodegradación de HAP aumentó en la rizosfera de *Helianthus annuus*, debido a la bioestimulación de las comunidades microbianas por parte de los exudados excretados por la planta. Se concluyó que la bioestimulación dependía de la composición química de los exudados (Tejeda-Agredano y col., 2013). Los exudados de *Helianthus annuus* podrían, además, inducir una respuesta de atracción táctica en las comunidades degradadoras de HAP, provocando el desplazamiento bacteriano hacia el foco de contaminación. Esto es lo que hemos estudiado en nuestro trabajo de investigación. Hemos empleado los exudados vegetales de *Helianthus annuus*, producidos *in vitro*, para estimular el transporte bacteriano mediada por quimotaxis.

El patrón de movilidad afecta al modo de interacción con el medio, como en el caso de una superficie sólida. Por lo que el estudio de la adhesión bacteriana es importante para predecir la eficacia de un proceso degradativo, y elaborar estrategias de biorremediación basadas en la mejora del movimiento bacteriano. En este tema, es en el que se centra la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral: en modificar el patrón de movilidad bacteriano con la finalidad de mejorar el transporte y la biodegradación de contaminantes orgánicos.

#### **I.4 ADHESIÓN BACTERIANA SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS**

La adhesión bacteriana a superficies sólidas está gobernada por las interacciones célula-sustrato. Estas interacciones se suelen expresar en términos de energía de Gibbs, siendo dependientes de la separación de la célula y la superficie sólida ( $h$ ).

### I.4.1 TIPOS DE ADHESIÓN

Según la distancia de separación entre la superficie celular y la superficie bacteriana, se distinguen dos tipos de interacción: las interacciones de largo y corto alcance.

#### I.4.1.1 Interacciones de largo alcance

Son las que controlan el posicionamiento de las bacterias en la cercanía de la superficie. Si consideramos la célula bacteriana como un coloide en suspensión, la adhesión en la fase inicial del proceso dependerá de las características de la superficie de las partículas implicadas y de la separación entre ellas (es decir, de las células y de las partículas del sólido en la superficie). Estas interacciones pueden explicarse según la teoría de estabilidad coloidal (Van Loosdrecht y col., 1989):

$$G_{DLVO-AB}(h) = G_{vdW}(h) + G_{el}(h) + G_{AB}(h) \quad (1)$$

Las interacciones de largo alcance se dan en el mínimo de energía secundario, tal como se observa en la figura 1.3. En este punto, la interacción es de tipo reversible, no específica, interviniendo las fuerzas electrostáticas, las fuerzas de Van der Waals y las fuerzas ácido-base (Van Oss y col., 1986). Las interacciones electrostáticas  $G_E(h)$  y las fuerzas de Van der Waals  $G_A(h)$  son aplicables para distancias de separación  $>2\text{nm}$ .

Las fuerzas de Van der Waals suelen ser fuerzas de atracción y dependen de la polarización de las superficies implicadas (Rutter y Vincent, 1980). Estas interacciones pueden calcularse en función de distancia de separación entre partículas mediante la constante de Hamaker ( $H$ ) que define la interacción entre la bacteria ( $H_b$ ) y la superficie del sólido ( $H_s$ ) a través de un medio acuoso, según la relación:

$$H = (H_b^{1/2} - H_a^{1/2})(H_s^{1/2} - H_a^{1/2}) \quad (2)$$

Por su parte, las fuerzas electrostáticas son repulsivas (si las cargas de las superficies implicadas en la interacción son del mismo signo) y de atracción (si son de signo contrario). Estas interacciones son resultado de la superposición de las dobles capas eléctricas que rodean las superficies de las partículas (tanto de las células bacterianas como de las partículas sólidas). La doble capa eléctrica se crea como consecuencia de la distribución de iones con carga opuesta en un medio líquido. Los iones

rodean las partículas formando 2 capas distintas: una de iones de signo contrario a la carga de la partícula (capa de Stern) y otra capa difusa constituida por iones de carga positiva y negativa. El grosor de la doble capa eléctrica depende de la fuerza iónica (o concentración de iones) del medio. El aumento de la fuerza iónica reduce el espesor de la doble capa eléctrica, disminuyendo, así, la separación entre la superficie de las partículas implicadas en la interacción y favoreciendo la adhesión bacteriana sobre la superficie sólida. Ya que a distancias menores de 2 nm la repulsión electrostática no tiene implicación.

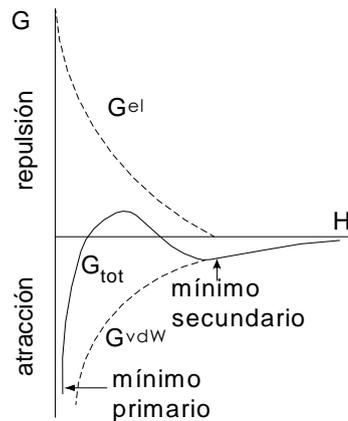
La fuerza de las interacciones ácido-base puede calcularse a partir del ángulo de contacto (Van Oss, 1994). Las interacciones ácido-base son repulsivas entre bacterias hidrofílicas y superficies hidrofílicas, y atractivas, si al menos una de las superficies implicadas en la interacción, es hidrofóbica.

Las propiedades (potencial zeta e hidrofobicidad) de la superficie celular y del material para la adhesión, serán importantes para determinar la adhesión bacteriana en el mínimo secundario.

#### **1.4.1.2 Las interacciones de corto alcance**

Comprenden las uniones químicas entre grupos funcionales de las superficies implicadas mediante enlaces covalentes, enlaces por puentes de hidrógeno o dipolos. Suponen una fuerte unión de la bacteria a la superficie sólida, ya que la unión es irreversible y se da en el mínimo primario de energía (separación entre partículas de 0,1-0,2 nm) (Van Loosdrecht y col., 1990).

Para que se produzca la adhesión bacteriana, debe superarse la barrera energética que le permita a la bacteria adherirse en el mínimo primario (adhesión irreversible) o en el mínimo secundario (adhesión reversible) (figura 1.4). De no ser así, el movimiento Browniano (movimiento aleatorio de partículas en el seno de un fluido sometidas a una agitación térmica) o la fuerza hidrodinámica del fluido arrastrarían a las bacterias en el sentido de la corriente del fluido.



**Figura I.4** Energía de Gibbs necesaria para la interacción entre la superficie de una célula y la superficie de una partícula del sólido para la adhesión,, de acuerdo con la teoría de la estabilidad coloidal.  $G_{tot}$  es la resultante de una fuerza electrostática, normalmente repulsiva ( $G^{el}$ ) y de una interacción de van der Waals atractiva ( $G^{vdW}$ )

#### I.4.1.3 Teoría DLVO aplicada a células bacterianas

Según la teoría DLVO aplicada a las interacciones entre superficies sólidas y bacterias (Norde y Lyklema, 1989; Rijnaarts y col., 1993a), la suma total de las interacciones debe tener una componente electrostática (normalmente fuerza repulsiva) y otra de Van der Waals (normalmente atractiva) haciendo que el potencial de interacción resultante dependa de la distancia de separación de la bacteria y la superficie, así como del radio celular, potencial o carga superficial de la superficie y de la bacteria y composición iónica del medio.

La adhesión bacteriana sobre superficies sólidas es posible aún en el caso de que las cargas superficiales sean del mismo signo, porque la conformación flexible de sus membranas, hace que puedan existir alteraciones estructurales que afecten a las contribuciones de repulsión. Cuando la bacteria se acerca a la superficie, suele ser capturada en el mínimo secundario sin ser capaz de superarlo al ser la energía del mínimo primario demasiado elevada. Por lo que la bacteria se adhiere de manera reversible. Sólo cuando se produce la liberación de productos de

excreción que se adhieran a la superficie por medio de enlaces de tipo químico, la bacteria cae en el mínimo primario y la reversión, en este caso, estará impedida.

#### **I.4.2 FACTORES QUE AFECTAN A LA ADHESIÓN BACTERIANA**

Entre los **factores físicos** que pueden afectar a la interacción de las superficies bacteria-sólido podemos destacar las propiedades de las superficies, hidrofobicidad y potencial zeta; así como la fuerza iónica del medio.

Entre los **factores fisiológicos** que dependen exclusivamente de las células bacterianas, podemos destacar: la existencia de polímeros extracelulares en la superficie bacteriana que pueden interaccionar con las superficies sólidas, complicando la predicción de la adhesión determinada por la teoría DLVO. Las interacciones poliméricas pueden ser repulsivas o atractivas, permitiendo que la adhesión bacteriana tenga lugar, incluso cuando el modelo de DLVO predice que la fuerza de atracción no es suficiente para provocar la adhesión bacteriana a la superficie (Jucker, 1998a).

La presencia de estructuras externas (como los flagelos) puede conducir a una adhesión orientada a la superficie del material debido a que la superficie celular no es uniforme. Se ha determinado que la causa de la adhesión orientada de la bacteria *Escherichia coli* K-12 sobre partículas esféricas de poliestireno no se debió a la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en las membranas celulares, sino a la uniformidad de la membrana que depende de la presencia de protuberancias en la misma, como pudieron ser los flagelos, cilios, etc (Jones y col., 2003).

El modo de interacción de la célula bacteriana con la superficie del material también es un factor a tener en cuenta en la adhesión. McClaine y Ford descubrieron que la rotación flagelar del movimiento celular de *Escherichia coli* aumentó la tasa de adhesión bacteriana sobre una superficie de cristal (McClaine y Ford, 2002). Según esta observación, el patrón de movilidad bacteriano, marcado por la longitud de las trayectorias celulares (en el caso de *E.coli*) y la frecuencia de cambios de dirección (en el caso de *Pseudomonas putida*) podría tener repercusión en la adhesión sobre superficies sólidas.

## **I.5 TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS**

La tasa de adhesión está determinada por el número de células que son transportadas a la superficie del sólido a través de procesos de transporte de masas como la difusión, la convección y la sedimentación.

El transporte bacteriano se determina hidrodinámicamente. Para describir las propiedades hidráulicas del sistema se tienen en cuenta los parámetros adimensionales: número de Reynolds y número de Peclet. Estos parámetros se hacen adimensionales, para que las propiedades que se derivan de ellos no estén influidas por las dimensiones del sistema, tales como la anchura, la altura o el caudal de un fluido que pasa por un conducto. El número de Reynolds determina el régimen del flujo del fluido, describiéndolo como laminar a turbulento. Por su parte, El número de Peclet define la razón convectiva sobre el papel de la difusión en el transporte de masa en un sistema de desplazamiento de flujo.

En sistemas estáticos, la difusión controla el transporte de células desde la fase acuosa hasta la superficie del sustrato. La difusión está marcada por el movimiento Browniano que se conoce como el movimiento de partículas en el seno de un líquido como consecuencia de la acción térmica causada por la agitación. Bajo condiciones dinámicas, el transporte celular tiene lugar por convección y difusión. La convección se entiende como la propagación de calor en fluidos o líquidos debido al movimiento de sus partículas producido por la diferencia de densidad. La movilidad propia de las bacterias, así como el fenómeno de la sedimentación contribuyen en la consecución de ambos tipos de transporte (Norde y Lyklema, 1989; Rijnaarts y col., 1993a; Schafer y col., 1998; Busscher y van der Mei, 2006).

El estudio de los procesos de transporte y deposición bacteriana sobre superficies sólidas se basa en la teoría de filtración de coloides (de sus siglas en inglés, CFT, que fue propuesta por Rijnaarts y colaboradores (Rijnaarts y col., 1996a; 1996b)

### **I.5.1 TEORÍA DE FILTRACIÓN DE COLOIDES (CFT)**

La teoría de filtración de coloides (CFT) se emplea para cuantificar los procesos de transporte y deposición bacteriana, teniendo en cuenta la transferencia de masa (células bacterianas) desde el medio acuoso a la superficie del sustrato (colector) y teniendo en cuenta, además, la

probabilidad que tiene la bacteria de colisionar con el colector fomentando la adhesión bacteriana sobre la superficie

La eficiencia de transferencia de masa del colector ( $\eta$ ) se define como la probabilidad de que una célula, que se acerca al colector, alcance la superficie. Este término incluye los efectos de la gravedad, la difusión y las fuerzas de atracción de Van der Waals.

La eficiencia de colisión o adhesión ( $\alpha$ ) es la probabilidad de que una célula, que ha alcanzado la superficie, se adhiera. Este término es dependiente de la energía de interacción ( $\Delta G^{\text{DLVO-AB}}$ )

Cuando el sistema opera bajo condiciones de lecho limpio, es decir, en ausencia de células que ya estén adheridas a la superficie, las células que se aproximan al colector sólo interaccionan con la superficie del colector, haciendo que la deposición sea exponencial, según la siguiente fórmula:

$$C / C_0 = \exp\left(-\frac{3(1-p)}{4 r_c} \eta \alpha L\right) = \exp(-\alpha \lambda L) \quad (3)$$

Donde  $C_0$  y  $C$  son las concentraciones celulares del influente y del efluente, respectivamente,  $L$  es la longitud de la trayectoria del flujo,  $p$  es la porosidad del material de empaquetamiento,  $r_c$  es el radio del grano de arena colector,  $\eta$  es la eficiencia del colector y  $\alpha$  es la eficiencia de colisión. Esta ecuación se simplifica a menudo, definiendo un coeficiente de filtración  $\lambda$ . La eficiencia de adhesión ( $\alpha$ ) corresponde a la fracción de colisiones que finalmente dan lugar a la adhesión de la partícula. En ausencia de fuerzas repulsivas,  $\alpha$  se aproxima a 1, según la fórmula:

$$\alpha = \alpha_0 (1 - B\Theta) \quad (4)$$

Al inicio del experimento, en ausencia de células previamente adheridas, la eficiencia de adhesión inicial ( $\alpha_0$ ) es prácticamente 1 (porque las células sólo pueden colisionar con el colector, por lo que la probabilidad de colisión es máxima).

La aplicación directa de la CFT implica que el sistema está operando bajo condiciones de "lecho limpio", observándose una deposición exponencial. Pero esto no siempre ocurre así. A veces, se observa una disminución en la deposición, que es apreciable por el incremento en los valores de  $C/C_0$  (o

eficiencia de salida bacteriana a través de las columnas). Lo que quiere decir que está aumentando el transporte bacteriano debido al bloqueo por parte de las bacterias depositadas que impide que las células que se acercan al colector, se adhieran a la superficie. Bajo estas condiciones de "lecho no limpio", es necesario incluir un término Langmuriiano (en la fórmula 3) que tenga en cuenta, además de la interacción celular con el colector, las interacciones entre células, de la siguiente manera:

$$\lambda = \lambda_0(1 - \beta\sigma) \quad (5)$$

donde  $\lambda_0$  es el coeficiente de filtro,  $\beta$  es el parámetro de bloqueo, y  $\sigma$  es el depósito específico de coloides en el medio poroso.

El valor de  $\alpha$  está controlado por las interacciones célula-sólido y por la cantidad de células adheridas previamente. Una bacteria previamente adherida puede reducir la deposición de las que se aproximen al colector, bloqueando parte de la superficie del mismo, según la expresión en (4).

Al inicio del transporte,  $\alpha = \alpha_0$  donde  $\alpha_0$  es la eficiencia de adhesión de lecho vacío, en ausencia de bacterias depositadas. Por lo que el número de células en el colector es nulo ( $\Theta=0$ ). El valor de  $\alpha$  se aproxima a 1 y la deposición se ve favorecida y aumenta progresivamente de manera exponencial. A medida que se van depositando las células en la superficie del colector, el factor de bloqueo ( $B$ ) comienza a aumentar. El factor de bloqueo se define como la relación entre el área bloqueada por una célula adherida y el área geométrica de esa célula, y la fracción de superficie cubierta por células  $\Theta$  se calcula según la fórmula:

$$\Theta = \alpha \pi a_b^2 / A_{col} \quad (6)$$

donde  $a_b$  representa el radio de la partícula y  $A_{col}$  corresponde al área de superficie presente en el medio poroso de la columna.

### **1.5.2 BLOQUEO DEL COLECTOR**

El factor de bloqueo depende de las interacciones célula-célula. Mientras que el valor de  $\alpha_0$  viene determinado, fundamentalmente, por las interacciones célula-sustrato. Además, ambos parámetros dependen de las condiciones hidrodinámicas del sistema.

**Si el factor de bloqueo es muy fuerte**, el transporte bacteriano aumenta porque la deposición no es posible. Por lo que se observa un aumento en la salida bacteriana a través de las columnas ( $C/C_0$ ).

El factor de bloqueo depende de factores como el tamaño y forma celular y del modo de interacción de la bacteria con la superficie del colector. De manera que existen especies con propiedades bloqueantes más altas que otras.  $B$  se relaciona con la máxima cobertura de superficie de la siguiente manera:

$$\Theta_{\max} = 1/B \quad (7)$$

Cuando transporte opera bajo condiciones de bloqueo, el cubrimiento de superficie nunca llega a ser máximo.

**Si el bloqueo es débil**, pueden darse situaciones de deposición en multicapas donde  $\alpha > 0$ . Las células previamente adheridas no son bloqueantes y no se da la repulsión entre células, haciendo que el colector se sature de capas multicelulares (lo que se conoce como "ripening" de su término en inglés). Esta situación puede conducir a otros fenómenos entre los que se destaca la colmatación del colector (o del término en inglés, "straining") o el atascamiento u obstrucción del colector (conocido como "clogging" en inglés).

El bloqueo se ve favorecido bajo condiciones en las que la solución electrolítica promueva la repulsión entre células. Mientras que la adhesión en monocapas en el colector (o "ripenning") está favorecido bajo condiciones químicas que provoquen el contacto interparticular y, con ello, la asociación en multicapas (Liu y col., 1995). Cuando las características de la solución electrolítica promueven el bloqueo frente al "ripenning" o adhesión de células en multicapa, el contacto interparticular está inhibido y la densidad máxima de partículas que puede depositarse en el colector tiene que hacerlo en forma de monocapa. No sólo la composición electrolítica de la solución es el único factor influyente en la deposición bacteriana, sino que también hay que tener en cuenta las características físico-químicas de la superficie del colector y los coloides implicados en el transporte.

### **I.5.3 FACTORES QUE AFECTAN AL TRANSPORTE BACTERIANO**

Hay muchos factores que afectan al transporte bacteriano. Entre ellos podemos destacar factores físicos, que pueden ser dependientes de las características del material poroso empleado, como la rugosidad, la porosidad, el diámetro de partícula y propiedades de la superficie del material como la hidrofobicidad y la carga superficial. Los factores físicos también pueden ser dependientes de la hidrodinámica del sistema donde influye notablemente la velocidad del fluido o el volumen de poro. Además, hay que tener en cuenta las características físico-químicas del fluido en el que se transportan las células bacterianas, como el pH o la fuerza iónica.

Entre los factores fisiológicos se citan aquellos que dependen de las células bacterianas, como son el tamaño, movilidad celular y la caracterización de su superficie de membrana como la hidrofobicidad y carga superficial (Camper y col., 1993).

#### **I.5.3.1 Fuerza iónica del medio**

En general, la fuerza iónica influye en la deposición bacteriana afectando a la eficiencia de adhesión inicial ( $\alpha_0$ ) y al factor de bloqueo (B). Cuando la fuerza iónica del medio disminuye, el valor de  $\alpha_0$  disminuye, y el de B aumenta, causando una reducción de  $\alpha$  a medida que baja la fuerza iónica del medio. De esta manera, el transporte bacteriano se ve favorecido en condiciones de baja fuerza iónica (Rijnaarts y col., 1996b).

#### **I.5.3.2 Velocidad de flujo**

Cuando la velocidad de flujo disminuye, aumenta la probabilidad de que las partículas coloidales (o en su caso, las células bacterianas) colisionen con la superficie del colector (Rijnaarts y col., 1996a).

#### **I.5.3.3 Concentración celular**

A mayor concentración celular se favorece el fenómeno de asociación en multicapas sobre la superficie del colector o "ripenning" (si la estirpe no tiene propiedades bloqueantes) y la repulsión y aumento del transporte si la estirpe es muy bloqueante.

Los estudios teóricos predicen que el bloqueo causa una bajada rápida en la deposición seguida de una bajada gradual indicativa de que el límite de cobertura en monocapa en la superficie del colector, está próximo. De esta manera, el efecto de bloqueo impide que se cubra toda la superficie del colector (máximo cubrimiento celular de la superficie). La máxima cobertura del colector en presencia del factor de bloqueo no es posible debido a que la zona de bloqueo no deja opción a ser cubierta por células, además del efecto de "sombra" creado por la corriente del fluido y el ángulo de interacción del coloide con la superficie del colector. Este efecto ha sido descrito por Ko y Elimelech, como una zona de "sombra" creada corriente abajo de las células que se van depositando en el colector, constituyendo una zona de menor probabilidad de intercepción por el colector (Ko y Elimelech, 2000). Esto es debido al efecto del flujo del fluido a su paso por la superficie del colector que genera una fuerza de cizalla responsable del efecto descrito. Al aumentar la zona de "sombra", la máxima superficie a ser cubierta por las células disminuye. La zona de sombra puede aumentar con el incremento del tamaño del coloide y la velocidad de aproximación, así como con la bajada de la fuerza iónica (porque aumenta el espesor de la doble capa y la repulsión).

#### 1.5.3.4 Propiedades hidrodinámicas

Para entender la importancia de las interacciones hidrodinámicas en la deposición en condiciones de máxima cobertura de superficie, el número de Peclet cobra gran importancia. Este número se calcula según la siguiente relación:

$$Pe = \frac{V_p a}{D_\infty} = \frac{6\pi\mu V_p a^2}{kT} \quad (8)$$

Donde  $V_p$  es la velocidad de aproximación,  $a$  es el radio de la partícula,  $\mu$  es la viscosidad del fluido,  $D_\infty$  es el coeficiente de difusión de la partícula de Stokes-Einstein,  $k$  es la cte de Boltzmann y  $T$  es la temperatura. La influencia de las interacciones hidrodinámicas es más pronunciada para las partículas (coloides) de mayor tamaño, ya que el incremento en la deposición de partículas modificará la trayectoria de acercamiento de

una partícula de igual tamaño. Esto se refleja en que los valores de Peclet normalmente son altos para el caso de las partículas de gran tamaño (Ko y Elimelech, 2000).

#### **1.5.3.5 Rugosidad de la superficie del colector**

Cabe destacar que cuando la superficie de adhesión es rugosa, una zona de "sombra" se crea corriente abajo de las protuberancias en los granos de arena, de manera análoga a lo que ocurre con las partículas una vez se han depositado (Ko y Elimelech, 2000).

#### **1.5.3.6 Tamaño de partícula del colector**

El tamaño de partícula también puede afectar al transporte bacteriano. Cuando el tamaño de partícula disminuye, la superficie específica para la adhesión aumenta. A su vez, con la disminución del tamaño de partícula, disminuye el espacio interparticular. Bajo estas condiciones, la deposición se ve favorecida frente al transporte. La reducción en el tamaño de poro disminuye la probabilidad de que la bacteria entre por los canales verticales existentes entre las partículas del medio poroso (Kusy y Ford, 2007).

#### **1.5.3.7 Movilidad bacteriana**

Cuando los coloides son células bacterianas, la deposición se ve favorecida por la propia movilidad del microorganismo, cuyo movimiento de propulsión contracorriente hace posible que acceda a las zonas influidas por el efecto de "sombra" que son inaccesibles para aquellas bacterias no móviles, haciendo que el valor de cubrimiento máximo de superficie pueda ser mayor (Kerchov y Elimelech, 2008). La movilidad bacteriana favoreció la deposición sobre superficies sólidas, ya que le permitió caer en el mínimo secundario, haciendo que la probabilidad de adhesión reversible sea mayor (Becker y col., 2004). Así como la propulsión creada por el flagelo contraresta la fuerza de las interacciones (Pompilio y col., 2008). No obstante, la presencia mera del flagelo, aún cuando la bacteria no es móvil, provoca una mayor deposición que para el caso de las bacterias que carecen de flagelo. Estas estructura celulares parecen aumentar, por ello, las interacciones celulares con la superficie (Haznedaroglu y col., 2010).

El patrón de movilidad bacteriano afectó al modo de interacción con la superficie sólida, tal como hemos comentado en el capítulo 1.4.2. De la misma manera, el modo de interacción con la superficie afectó al transporte y deposición bacteriana. La relación entre los efectos de adhesión y transporte se hacen evidentes en un estudio llevado a cabo por DeFlaun y colaboradores, para determinar el efecto de la adhesión en el transporte bacteriano de un mutante deficiente en adherirse a la superficie de arena empaquetada en columnas. El mutante se transportó mucho más rápido que la silvestre. El estudio concluyó que las diferencias en los polímeros de superficie podían ser la causa de la diferencia en la adhesión entre las bacterias (DeFlaun y col., 1999).

Del mismo modo, diferencias en el patrón de movilidad bacteriana podría conducir a diferencias en la adhesión a superficies sólidas, y con ello, afectar de forma diferente al transporte bacteriano. Los valores de eficiencia de adhesión inicial ( $\alpha$ ) y del factor de bloqueo (B) podrían variar en función del patrón de movilidad bacteriano, fomentando la adhesión o el aumento del transporte en un caso u otro.

Una evaluación del patrón de movilidad bacteriana en medios porosos puede hacerse usando gráficas de regresión lineal  $\alpha_0 - B$ , que pueden dar lugar a distintas situaciones según la combinación de los parámetros de transporte (Rijnaarts y col., 1996b):

Combinación de **bacteria-colector con alto valor de  $\alpha_0$  y bajo valor de B**: esta situación provocaría una alta deposición bacteriana y un alto nivel de recubrimiento celular de la superficie del colector. Un flujo continuado de células podría contribuir a la formación de capas celulares cubriendo la superficie y un leve atascamiento del colector.

Combinación de bacteria-colector con una **alta deposición inicial (alto  $\alpha_0$ )**, pero el **fuerte bloqueo inicial (B alto)** resultará en un bajo nivel de recubrimiento que conllevará a la ausencia de atascamiento y un favorecido transporte bacteriano tras el bloqueo del colector.

Combinación de células bacterianas con una **baja deposición inicial (bajo  $\alpha_0$ )** que puede dar lugar a alcanzar altos niveles de recubrimiento de la superficie (**ya que B es bajo**) pero a altos valores de volúmenes de poro.

Esto podría conducir a un atascamiento del colector, pero después de un tiempo prolongado de la exposición celular.

Deposición no favorecida debido **a alto valor de B y bajo valor de  $\alpha_0$** . Este caso se da en condiciones de baja fuerza iónica, donde la doble capa eléctrica de repulsión es mayor y la probabilidad de que una bacteria se adhiera a la superficie es muy baja.

#### **1.5.3.8 Materia orgánica**

La materia orgánica disuelta dificulta el estudio del transporte y deposición bacteriana sobre superficies sólidas. La materia orgánica disuelta podría adsorberse a la superficie del colector y cambiar las propiedades físico-químicas de la superficie, ello es hidrofobicidad y/o carga superficial. De este modo, la deposición bacteriana se podría ver afectada (Liu y col., 1995). Así como la materia orgánica podría competir con las bacterias por los sitios de interacción en la superficie del colector, evitando que las células bacterianas se adhieran (Harvey y col., 1989; Scholl y Harvey, 1992; Lahlou y col., 2000; Foppen y col., 2008; Park y Kim, 2009).

### **1.6 BIODISPONIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES**

La biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos puede estar condicionada por la baja biodisponibilidad de los mismos (como vimos en el epígrafe 1.2). Algunas de las estrategias desarrolladas para aumentar la biodisponibilidad de contaminantes, se basan en la idea de mejorar la interacción entre el microorganismo y el contaminante a degradar, para minimizar el riesgo por toxicidad de la liberación del contaminante a la fase acuosa (Ortega-Calvo y Alexander, 1994; Garcia-Junco y col., 2003). Recientemente, se ha descrito el mecanismo de actuación de un fertilizante oleofílico, el S-200, que actúa de forma dirigida, aportando los nutrientes N y P en la interfase NAPL-agua donde escasean estos compuestos. De esta forma, la biodegradación del contaminante asociado al NAPL aumenta (Tejeda Agredano y col., 2011).

Incluso los propios microorganismos han desarrollado mecanismos para mejorar la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos, como la producción de tensioactivos. Existe una amplia gama de

microorganismos que son capaces de sintetizar lo que se ha denominado como biosurfactantes. Entre los distintos géneros destacamos, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Mycobacterium*. Existe un esfuerzo común en avanzar en el estudio del mecanismo de acción de estos compuestos sobre el aumento de la biodisponibilidad y biodegradación de contaminantes orgánicos, aunque hoy día no se conoce exactamente el mecanismo fisiológico de actuación. Está claro que debe ir más allá que el exclusivo aumento de la solubilización de los contaminantes, ya que se ha observado que los microorganismos los producen incluso cuando crecen con compuestos solubles, como es el caso de la glucosa. La ventaja de su empleo se basa, además, en la estrecha relación con la adhesión microbiana, secuestro de metales pesados o comunicación intercelular (Ortega-Calvo y col., 2013).

La aplicación de un campo eléctrico en el suelo conduciría al aumento de la biodegradación, ya que se mejoran las condiciones para que el proceso tenga lugar, como la humedad, el contenido de oxígeno. En nuestro grupo de trabajo se ha comprobado que este tratamiento es útil para la biorremediación HAP, particularmente en el caso de la descontaminación de suelos ricos en fracciones arcillosas o bajo la presencia de contaminantes recalcitrantes (Niqui-Arroyo y Ortega-Calvo, 2010). La quimiotaxis bacteriana se ha descrito como un mecanismo que aumentaría la biodisponibilidad de los contaminantes hacia los que el microorganismo se sintiera atraído. De esta manera, el compuesto pasa a ser biodisponible porque aumenta la movilización bacteriana hacia las proximidades del foco de contaminación.

#### **I.6.1 QUIMIOTAXIS BACTERIANA COMO MEJORA DE LA BODISPONIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN**

La quimiotaxis positiva o movimiento dirigido de la bacteria en respuesta a un contaminante podría mejorar su biodisponibilidad, y seguramente su biodegradación. En un trabajo de investigación llevado a cabo por nuestro grupo se ha demostrado que la quimiotaxis de varias especies bacterianas aisladas de la rizosfera de un suelo contaminado con HAP, mejoró la movilización de estas bacterias en presencia de dichos contaminantes, haciendo que su velocidad ascendiera a 1 mm/min

(Ortega Calvo y col., 2003). Aunque hay bastantes estudios sobre el efecto quimiotáctico de ciertos contaminantes, el papel de la respuesta táctica en la biodegradación de los mismos no está igualmente explorado. Tan sólo en el caso del naftaleno, se ha conseguido demostrar el papel de la quimiotaxis bacteriana en la biodegradación del contaminante en un sistema heterogéneo en fase acuosa (Aitken 2000). Asimismo, se comprobó el aumento de la desorción desde la fase orgánica (inmerso en un NAPL) a la fase acuosa, debido a la acumulación de células de *Pseudomonas putida* en respuesta quimiotáctica al naftaleno. La degradación del compuesto, en fase acuosa, creaba un desequilibrio entre sorbido-desorbido que se compensaba con el reparto de naftaleno desde la fase orgánica a la acuosa que aumentaba a medida que aumentaba la degradación del mismo en fase acuosa (Law y Aitken, 2003). Otros contaminantes, cuya biodegradación ha sido mejorada mediante la movilización de bacterias hacia el foco de contaminación, han sido: pesticidas (Hawkins y Harwood, 2002), componentes BTEX (benzeno, tolueno, etilbenceno y xileno) (Parales y col., 2000) y tetracloruro de carbono (Witt y col., 1999). En este último caso, se puso de manifiesto el papel de la quimiotaxis bacteriana en el transporte para la mejora de la biodegradación del compuesto. La quimiotaxis hacia otro compuesto que no era la fuente de carbono del contaminante, se puede reconocer como una técnica de bioestimulación que fomenta el movimiento bacteriano dirigido con el fin de mejorar las técnicas de biorremediación.

Provocando una mejora en el transporte y movilización bacteriana con el empleo de quimioefectores que disminuyan la deposición sobre superficies sólidas (Velasco-Casal y col., 2008) se solventaría el problema de la baja dispersión microbiana en el suelo. El movimiento de bacterias a través de medios porosos saturados puede estar restringida por varios factores, incluyendo el aumento del trayecto de los caminos a recorrer (tortuosidad), la adhesión bacteriana a las superficies, y las restricciones geométricas, debido a los poros de pequeño diámetro. Por lo tanto, las bacterias capaces de degradar los contaminantes no pueden moverse a través de la matriz del suelo y la biodegradación no es eficaz. Si añadimos sustancias al medio que mejoren el transporte bacteriano, el éxito de la biodegradación está más cerca de conseguirse.

El papel que la quimiotaxis podría jugar en el transporte bacteriano para la mejora la biodegradación ha sido comprobado en varios estudios (Parales y Haddock, 2004; Ford y Harvey, 2007; Strobel y col., 2011). Aunque no se ha profundizado en los mecanismos que implicaría el aumento de biodegradación debido a un aumento del transporte bacteriano a través de medios porosos. Es ahí donde nuestro estudio ha supuesto una importante innovación.

## **1.6.2 LA NANOTECNOLOGÍA COMO APLICACIÓN EN BIORREMIEDIACIÓN**

Actualmente, el desarrollo de la nanotecnología ha mejorado las técnicas de remediación que hasta entonces se practicaban, por lo que se ofrece como una alternativa futura para el tratamiento de emplazamientos contaminados. La nanotecnología consiste en el diseño, caracterización, producción y aplicación de partículas controlando que el tamaño esté dentro del rango de la escala nanométrica. Las nanopartículas se caracterizan por poseer un diámetro inferior a 100nm, siendo ésta la característica común para una alta diversidad de aplicaciones que ofrece el empleo de estos nanomateriales.

Algunas de las técnicas aplicadas en biorremediación también se basan en mejorar la biodisponibilidad del contaminante orgánico, mejorando la solubilización del mismo. Tal es el caso de unas nanopartículas poliméricas preparadas a base de polietilenglicol modificado con uretano-acrilato (PMUA, de sus siglas en inglés) para mejorar la solubilización del fenantreno (Tungittiplakorn y col., 2005). En otro estudio, se emplearon unas nanopartículas magnéticas ( $Fe_3O_4$ ) estabilizadas con oleato de amonio, para recubrir la superficie celular de *Pseudomonas delafieldi*. De esta forma, se aumentó la inmovilización celular en un reactor, mejorando así la degradación de contaminantes en el mismo (Shan y col., 2005). En nuestro trabajo de investigación se han empleado unas nanopartículas de plata (NPsAg) que podría usarse para provocar la adhesión bacteriana sobre superficies sólidas, por lo que su aplicación podría ser útil para degradación de compuestos en un birreactor. El empleo de NPsAg se ha justificado en otro estudio de bioremediación, en donde las nanopartículas se estabilizaron con ácido mercaptosuccínico y se activaron con alúmina para eliminar los iones de mercurio en solución en aguas contaminadas (Sumesh y col., 2011).

## **II. OBJETIVOS**

Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del efecto de la respuesta táctica bacteriana, frente a determinados compuestos, sobre la biodegradación del contaminante orgánico hidrofóbico naftaleno. La hipótesis de partida fue que un aumento en el transporte bacteriano, provocado por el cambio en el patrón de movilidad en presencia de distintos efectores tácticos, podría conducir a un aumento de la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno. Para ello, los objetivos específicos planteados son:

1. **Caracterización de la respuesta táctica frente a diferentes compuestos que podrían actuar como agentes movilizadores bacterianos.** Para ello, se llevó a cabo un análisis de la respuesta táctica, tanto positiva como negativa, de la población bacteriana, mediante el empleo del ensayo capilar, así como un análisis individual de las trayectorias celulares en presencia de dichos compuestos.
2. **Determinación de la adhesión bacteriana sobre superficies sólidas en ausencia de flujo continuo.** Se estudió la diferencia del valor de  $D.O_{600nm}$  antes y después del contacto directo de las células bacterianas en suspensión con los compuestos ensayados en el punto 1, para conocer si el patrón de movilidad afecta a la adhesión sobre superficies sólidas.
3. **Estudio del papel de la respuesta táctica sobre el transporte bacteriano.** El objetivo era determinar si el patrón de movilidad puede afectar al modo de interaccionar con el material empaquetado en columnas de transporte. De esta forma, se comprobó el papel del patrón en la curva de transporte, promoviendo o impidiendo la movilización microbiana a través de medios porosos.
4. **Influencia del transporte bacteriano y de la adhesión en la biodegradación de naftaleno.** Se estudió el efecto del aumento de transporte en columnas sobre la biodegradación de naftaleno, así como el efecto de la adhesión bacteriana en la biodegradación del contaminante.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III.1 REACTIVOS

Los compuestos utilizados como **fente de carbono** para los cultivos bacterianos han sido salicilato sódico, acetato sódico y triptona, todos obtenidos de la casa comercial Panreac Química S.L.U (Barcelona, España).

El **naftaleno** de pureza analítica ( $\geq 99\%$ ) se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). Así como el de Naftaleno-UL- $^{14}\text{C}$  (actividad específica,  $31,3 \text{ mCi mml}^{-1}$ ) de pureza radioquímica ( $> 98\%$ ).

El **Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)** ( $\geq 99\%$ ) (GC) se utilizó como líquido en fase no acuosa, de sus siglas en inglés, NAPL. Se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

Todos los **disolventes** utilizados (acetona, etanol, diclorometano y metanol) (calidad HPLC) fueron suministrados por Teknokroma Analítica S.A. (Barcelona, España).

Los **biocidas** nitrato de plata y cloruro de mercurio se emplearon en concentraciones muy bajas,  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ , y se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) y Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España), respectivamente.

### III.2 EFECTORES TÁCTICOS

Como fuentes de **materia orgánica disuelta (MOD)**, se han utilizado exudados de origen vegetal, ácidos húmicos y el fertilizante oleofílico S-200.

Los **exudados de raíces de girasol (*Helianthus annuus*)** fueron obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Manuel Cantos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNAS, CSIC). El método de obtención así como las técnicas utilizadas para la caracterización de los exudados constituyeron una parte de otra Tesis Doctoral del grupo (Tejeda-Agredano y col., 2013), y aquí se describe brevemente. La exudación de las raíces de plantas de girasol se concentró en botes de cristal, con sellado hermético, que contenían 500 mL de medio mineral (MM), denominado como medio de mineralización (puesto que es el medio que se utiliza para llevar a cabo los ensayos de mineralización de naftaleno, y en ausencia de una fuente de carbono adicional. Los recipientes, de 1 L de capacidad, se incubaron

durante un mes en cámara de cultivo a  $25 \pm 1$  °C bajo una luz incidente de  $65,24 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 18 horas de fotoperíodo. Tras este tiempo, los exudados se recogieron bajo condiciones asépticas en cámara de flujo laminar y se centrifugaron durante 3 horas a 31.000 g con el fin de obtener una mezcla homogénea de materia orgánica disuelta (Haffka y col., 2008). La caracterización de los exudados se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Magdalena Grifoll de la Universidad de Barcelona. Se determinó la presencia de los componentes que, comúnmente, son mayoritarios en los exudados de origen vegetal: hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos orgánicos y ácidos grasos (tabla III.1) Los exudados se concentraron por liofilización para la caracterización de los distintos componentes mediante técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas realizadas en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

**Tabla III.1** Descripción de los componentes individuales mayoritarios detectados en los exudados de raíces de girasol (Tejeda-Agredano y col. 2013)

Componente orgánico	Compuesto individual
Hidratos de carbono	Galactosa, Fructosa
Aminoácidos	Fenilserina, Taurina, Fosfoetanolamina, Ácido aspártico, Treonina, Serina, Asparragina, Glutamina, Glicina, Alanina, Cisteína, Isoleucina, Leucina, Tirosina, Fenilalanina, Ornitina, Lisina, Histidina, Arginina
Ácidos orgánicos	Ácido ftálico, Parabeno, Ácido protocatéquico, Ácido gálico, Ácido acetilsalícílico, Ácido abiético, Ácido hidroxí dehidroabiético
Ácidos grasos	Ácido azelaico, Ácido mirístico, Ácido palmítico, Ácido esteárico, Ácido linoleico

**Los ácidos húmicos (AH)** se obtuvieron con anterioridad por nuestro grupo de investigación. Para su extracción, se tomaron muestras de un suelo localizado en el Parque Nacional de Doñana, adyacente a la laguna de Santa Olalla, en la provincia de Huelva (Lahlou y col., 2000). El suelo se clasificó como arenoso (Typic Humaquept), con un contenido en materia orgánica de 4,3 % y pH 6,5. Para la purificación de la fracción de AH, se llevó a cabo una extracción con NaOH, precipitación con ácido y diálisis (Schnitzer, 1982). Los análisis de  $^{13}\text{C}$ -NMR dieron como resultado una composición típica de sustancias húmicas del suelo, por la presencia de grupos carboxílicos (200-170 ppm), grupos aromáticos (160-100 ppm) y carbonos alquílicos (50-0 ppm). Los resultados de los análisis elementales dieron valores de C: 47,0 %, H: 5,31 %, O: 43,72 % y N: 3,97 %. El extracto de AH se disolvió en NaOH 0,1M a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>, ajustando el pH a 6 con HCl (Ortega Calvo y Sáiz-Jiménez, 1998). A partir de esta disolución stock se prepararon las que se utilizarían en los posteriores experimentos usando medio mineral (MM) como disolvente.

Previamente al uso de los AH naturales, se utilizaron como modelo los proporcionados por la casa comercial Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA) "Humic acid, sodium salt, technical grade" con No CAS 68131-04-4, con un contenido de carbono de 38,28 % (Mayer y col., 2007).

El **fertilizante S-200** fue suministrado por IEP Europe S.L. (Madrid, España). Se presenta en forma de microcápsulas oleicas de 20 y 200 amstrongs de diámetro con núcleo equilibrado de nutrientes N y P. Su composición consta de urea y ésteres fosfóricos que se presentan en una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados en la que predomina el ácido oleico. El disolvente básico es agua, aunque también presenta 2-butoxi-etanol y glicol-éter (Tejeda Agredano y col., 2011).

La cantidad de carbono orgánico en los tres bioestimulantes se determinó en un analizador de carbono orgánico total y módulo de nitrógeno Shimadzu TOC-V sch en el servicio de análisis del IRNAS, siendo los valores de  $129 \pm 3,5$  mg L<sup>-1</sup> para el caso de los exudados diluidos en MM en proporción 1:1,  $138 \pm 7,8$  mg L<sup>-1</sup> para AH (concentración nominal: 100mg L<sup>-1</sup>) y  $123 \pm 0,7$  para el fertilizante S200 a una concentración de 0,1 mL/70 mL de MM. Para conseguir una concentración de carbono 10 veces menor, los bioestimulantes se diluyeron en MM, obteniendo unos valores de  $16 \pm 0,1$

mg L<sup>-1</sup>, 16 ± 1,3 mg L<sup>-1</sup> y 13 ± 0,1 mg L<sup>-1</sup> para exudados (1:10), AH 10 mg L<sup>-1</sup> y S200 10 µL 35 mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Los otros compuestos empleados como efectores tácticos fueron las **nanopartículas de plata** (NsAg), con diámetro máximo ≤100 nm, y un 99% pureza, obtenidas de la casa comercial Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA). Para evitar la agregación de las NPsAg, las disoluciones stock de 100 mg L<sup>-1</sup> se sonicaron durante 1 hora en baño de ultrasonido Bransonic 3510E-DTH (Grupo Taper, S.A. Madrid, España), justo antes de utilizarlas para preparar las disoluciones de 55 mg L<sup>-1</sup> y 0,2 mg L<sup>-1</sup>.

La **glucosa** se obtuvo de la casa comercial Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España) y se utilizó a distintas concentraciones en MM: 0,1 mM, 1 mM, 10 mM y 100 mM.

### III.3 MATERIALES POROSOS

Se utilizó **arena de mar** de grano fino, suministrada por Panreac Química S.L.U (Barcelona, España). El material se tamizó y lavó por gravedad con agua destilada, consiguiendo, así, dos tipos de fracciones con diferentes rangos de tamaño de partícula: una gruesa de 500-400 µm y otra fina de 400-250 µm.

Se emplearon, además, dos tipos de **suelo**, estudiados en un trabajo previo del grupo de investigación. Uno es de tipo forestal, caracterizado por su alto contenido en materia orgánica, y otro de tipo agrícola. El suelo forestal procedía del Monte de La Teja perteneciente al campo de Gibraltar (Cádiz). El suelo agrícola se ha obtenido de la estación experimental "La Hampa", propiedad del IRNAS, situada en el término municipal de Coria del Río (Sevilla).

Las propiedades de estos suelos se determinaron con anterioridad por el grupo (Posada, 2007). En la tabla III.2 se describen dichas propiedades, además, del tipo de suelo en función de la clasificación de la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

**Tabla III.2** Propiedades y clasificación de los suelos utilizados

Muestra	Materia orgánica (%)	Arena gruesa (%)	Arena fina (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase Textural	Clasificación USDA
Suelo forestal	6,10	61,9	21,4	11,2	5,5	Arenosa Franca	Lithic Xerochrept
Suelo agrícola	0,76	73,3	6,0	14,0	6,7	Arenosa	Typic Xerochrept

### III.4 ANILLAS DE SILICONA

Para los ensayos de biodegradación se emplearon anillas de silicona, obtenidas a través de Altec Products Ltd. (Cornwall, Reino Unido) de 2,57 mm de diámetro interno y 1,78 mm de sección transversal. La silicona presenta ciertas ventajas para el estudio de mineralización del compuesto absorbido ya que se caracteriza por una dosificación pasiva del compuesto, incluyendo biocompatibilidad, alta capacidad para compuestos orgánicos hidrófobos (COHs) y baja resistencia interna a la transferencia de masa COHs (Smith y col., 2012).

### III.5 ESTIRPES BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

#### III.5.1 *Pseudomonas putida* G7

La estirpe utilizada en este estudio es *Pseudomonas putida* G7, cedida por la Dra. Caroline S. Harwood de la Universidad de Washington (EEUU). Fue aislada de suelos contaminados por HAP y seleccionada para nuestro estudio por su capacidad para degradar naftaleno (Dunn y Gunsalus, 1973).

La estirpe bacteriana se cultivó en un medio mineral (MM), cuya composición se detalla en la tabla III.3., utilizando salicilato sódico (5mM) como fuente de carbono. Este es un compuesto intermediario de la ruta de degradación del naftaleno (Yen y col., 1988). En algunos experimentos, se emplearon, además, medios de cultivo con la base del MM y con acetato sódico (5 mM) y triptona (15mM) como fuentes de carbono en

lugar del salicilato. El inóculo procedía de colonias cultivadas en placas de agar con naftaleno. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad que contenían 100 mL de medio.

Los cultivos bacterianos se mantuvieron en agitación continua (150 rpm) a 30°C. Una vez alcanzada la fase estacionaria temprana, las células se lavaron y resuspendieron en MM tras centrifugar durante 10 minutos a 2570 rpm (1.000g), para su posterior uso en los experimentos. Esta velocidad de centrifugación se seleccionó para evitar la rotura de los flagelos y, por tanto, la pérdida de la movilidad (Velasco-Casal, 2007).

**Tabla III.3** Composición por litro del medio de mineralización (MM). Los reactivos señalados en **negrita** se autoclavan por separado de los que aparecen en *cursiva*, mezclándose una vez enfriados. El resto de reactivos se filtran a través de filtro Millipore de diámetro de poro 0,2  $\mu\text{m}$ . Una vez autoclavado, el pH del medio fue 5,7

	<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Macroelementos (mg)</b>	<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	<b>900</b>
	<b><math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math></b>	<b>100</b>
	<i>CaCl<sub>2</sub></i>	80
	<i>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></i>	100
	<i>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</i>	100
	<i>FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O</i>	10
<b>Microelementos (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<i>Na<sub>2</sub>BO<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O</i>	2
	<i>MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O</i>	2
	<i>CuSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O</i>	2
	<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O</i>	4
	<i>ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O</i>	2

El mantenimiento de la estirpe se realizó renovando los cultivos semanalmente en placas con medio sólido MSB (tabla III.4). En la tapadera de las placas se añadió 0,1 g de naftaleno sólido esterilizado por disolución en diclorometano (proporción 1:1) y recristalización. El cultivo con naftaleno se aseguraba la presencia del plásmido NAH7 que contiene los genes que codifican las enzimas necesarias para la degradación de naftaleno (Yen y Gunsalus, 1982).

Para el crecimiento de la estirpe en medio rico, se utilizaron placas de petri que contenían las sales del medio MSB más 42 g L<sup>-1</sup> de TSA (triptona, soja y agar) (tabla III.4), en las que el crecimiento se evidenció por la presencia de colonias blanquecinas de forma esférica y aspecto mucoso.

**Tabla III.4** Composición por litro del medio mínimo de sales (MSB), a PH 7, utilizado en los medios sólidos para siembras en placas de Petri

Reactivos	Cantidad (mg)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340
CaCl <sub>2</sub>	14
NH <sub>4</sub> Cl	500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	112
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.5
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,22
Agar	16.000

### III.5.2 *Escherichia coli*/pRL 1063

*E. coli*/pRL 1063 fue la bacteria empleada para ceder, por conjugación, el plásmido pRL 1063 a *P. putida* G7 y conseguir así una batería de transformantes con el plásmido o parte del plásmido insertado en el genoma de *P. putida* G7.

*E. coli*/pRL 1063 se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) conteniendo 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 1 g de glucosa por cada litro de disolución (pH 7,2) (Sambrook y col., 1989). El cultivo se mantuvo durante toda la noche a 37 °C, tras lo cual se lavó y resuspendió en una solución estéril de NaCl 9 %.

### **III.5.3. *Escherichia coli*/Prk 2063**

*E. coli*/Prk 2063 se utilizó para favorecer la inserción del plásmido en *P. putida* G7. Las condiciones de cultivo fueron similares a la estirpe donante del plásmido, explicadas en el epígrafe anterior.

### **III.5.4 Transformantes obtenidos**

La colección de mutantes obtenida se seleccionó por la disminución o ausencia de actividad quimiotáctica mediante una técnica que se explicará en el siguiente epígrafe. Las estirpes seleccionadas, denominadas como mutante 91, 55 y 184, se cultivaron en el mismo medio mineral utilizado para cultivar a la silvestre (*P. putida* G7) con salicilato sódico como fuente de carbono (5mM).

## **III.6 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES QUIMIOTÁCTICOS**

### **III.6.1 Conjugación triparental con el transposón Tn5**

Para la obtención de mutantes deficientes en la respuesta quimiotáctica se llevó a cabo una mutagénesis no dirigida mediante la inserción del plásmido pRL1063 en el genoma de *Pseudomonas putida* G7. El objetivo era que dicha inserción afectase a la región donde se localizan los genes codificadores de la respuesta quimiotáctica hacia naftaleno.

El plásmido pRL1063, presente en *Escherichia coli* contiene los genes de resistencia a los antibióticos estreptomycin (Sm) y kanamicina (Km), insertados en el transposón Tn5 (que se corresponde con una región de genes de fácil inserción en el genoma de otras especies). El plásmido se puede movilizar por una conjugación no específica entre las especies *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* con la ayuda de otro plásmido, pRK2013 (presente en *Escherichia coli*), que contiene los genes de transferencia, *tra* y *mob*, que permiten la traslocación del transposón Tn5 (Wolk y col., 1991; Hansen y Sorensen, 2001). De ahí que el nombre de la

técnica se denomine conjugación triparental, dado que intervienen 3 especies bacterianas, el receptor (*P. putida* G7), el donante (*E. coli*/pRL1063) y el ayudante (*E. coli*/pRK2013).

Para llevar a cabo la conjugación, se mezclaron 50 µL de cada cultivo celular en un Eppendorf, colocando 100 µL de la mezcla resultante en el centro de placas de conjugación sin antibióticos hasta el completo secado de la gota. A continuación, las placas se dejaron durante toda la noche a 37 °C (temperatura óptima de crecimiento de *E. coli*), impidiendo que la maquinaria replicativa de *P. putida* tuviera lugar (puesto que su temperatura óptima es 28°C). Ello favorecía la inserción del plásmido de *E. coli* en el genoma de *P. putida* G7. Al día siguiente, se recogió el material celular resultante con un asa de Henle y se resuspendió en 1 mL de NaCl 0,9 %. A continuación, se sembraron 50 µL de la solución de NaCl en placas de LB en presencia de los antibióticos a los que la estirpe *E. coli* y *P. putida* eran resistentes y se incubaron a 28 °C durante dos días. De esta manera, sólo crecieron aquellos transformantes de *P. putida* que habían incorporado el gen de resistencia a Km y, que por tanto, podían crecer en presencia de ambos antibióticos.

La incorporación del plásmido pRL1063 en el genoma de *P. putida* G7 se manifestó mediante el crecimiento de colonias en placas de Petri con agar y medio rico con 1,5 % Bacto Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) en presencia de los antibióticos Km y Cm, a los que *P. putida* G7 era sensible antes de incorporar el plásmido de *E. coli* en su genoma.

### III.6.2 Selección de mutantes válidos

De la colección de mutantes obtenidos en las placas nos interesaban aquellos que pudieran degradar naftaleno pero que hubieran perdido la capacidad quimiotáctica de detectarlo.

De esta manera, se procedió a sembrar por separado cada colonia obtenida de la transformación, para aislarla en una placa con agar y naftaleno sólido en la tapa, seleccionando, así, en un primer escrutinio, aquellas mutantes que podían degradar naftaleno.

Para facilitar la selección se eligió el salicilato como quimioefector en lugar de naftaleno, que requiere un cuidado especial en su manipulación. Para ello, en un segundo escrutinio, se tomaron las colonias crecidas en las

placas con naftaleno y se sembraron en placas de agar al 0,3 % y salicilato sódico 10mM durante 24 h a 28 °C, para seleccionar aquellas estirpes mutantes degradadoras de naftaleno que no manifestaron quimiotaxis positiva hacia salicilato. La presencia de un anillo de turbidez alrededor del punto donde se inoculó la colonia indicó una respuesta quimiotáctica hacia el salicilato en solución. Ello es debido al avance celular en el medio semisólido tal como se indica en el método de "swarm plate" descrito con anterioridad para la especie *E.coli* (Wolfe y Berg, 1989) y para *P. putida* (Harwood y col., 1994b).

### III.7 CARACTERIZACIÓN DE *P. putida* G7

La curva de crecimiento se determinó tomando alícuotas del cultivo bacteriano a distintos tiempos para medir la absorbancia a 600<sub>nm</sub> emitida en espectrofotómetro Genesys 10 Series de Spectronic Unicam.

A partir de las curvas se determinó el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) mediante la ecuación:

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

La forma celular se caracterizó mediante micrografías tomadas a lo largo de la fase del ciclo celular mediante una cámara RS Photometrics CoolSNAP 60-c 1" 1.0x conectada a un microscopio óptico de contraste de fase Axioskop 2, Carl Zeiss (Jena, Germany) con objetivo A-Plan 40x (0,65 Ph2  $\infty/0,17$ ). El procesamiento de las imágenes transferidas al ordenador se realizó con el programa Rslmage Version 1.9.2 y la longitud celular se determinó mediante el programa AxioVision Rel. 4.8.

La caracterización de la superficie celular se realizó durante una estancia en el grupo del Dr. Lukas Wick en el Centro de Investigaciones Ambientales-UFZ (Leipzig, Alemania). La carga superficial e hidrofobicidad se estimaron a partir del potencial zeta y del ángulo de contacto, respectivamente.

El potencial zeta se calculó a partir de la movilidad electroforética utilizando un analizador electroforético doppler dispersor de luz (Zetasizer

Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK), siguiendo el método de Helmholtz-Smoluchowski (Hiementz, 1986; Hunter, 1988).

Para la medida de la hidrofobicidad, las suspensiones celulares se dispusieron sobre filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (micropore filters; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) que, a su vez, se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio para proceder a su secado a temperatura ambiente durante 2 horas. La hidrofobicidad celular se obtuvo a partir de la medida del ángulo de contacto ( $\theta_w$ ) entre la superficie de la capa celular y una gota de agua dispensada por el mecanismo de un microscopio goniométrico (Krüss GmbH, Hamburg, Germany) (Van Loosdrecht y col., 1987).

### **III.8 ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD BACTERIANA**

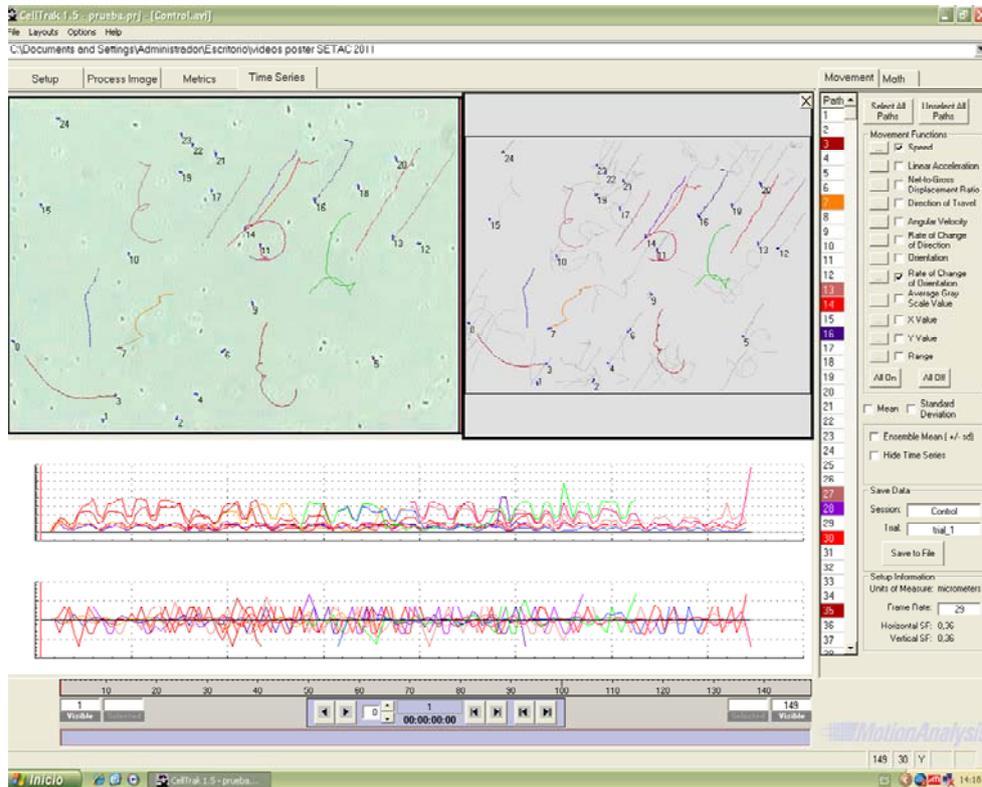
La respuesta táctica puede analizarse con un microscopio óptico, por visualización directa del movimiento bacteriano, caracterizando las trayectorias celulares mediante un programa informático (CellTrak, Versión 1.5, Motion Analysis Corporation, Santa Rosa, CA, USA). De esta forma, se puede cuantificar los parámetros de movilidad que caractericen la repuesta quimiotáctica.

Para ello, el cultivo bacteriano, creciendo en medio mineral suplementado con salicilato sódico 5mM (véase epígrafe III.5.1), se lavó y resuspendió en MM (control) o en las disoluciones de los distintos compuestos, hasta obtener una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de aproximadamente 0.3 ( $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  que se colocaron sobre un portaobjetos (76 x 26 mm) para la visualización directa al microscopio óptico de contraste de fase (descrito en el epígrafe III.7.1). El microscopio se conectó a una cámara de vídeo HD Sony Exwave (Tokio, Japón) para grabar la movilidad celular en presencia de los distintos efectores químicos durante 5 segundos. Los vídeos fueron procesados mediante el programa honestech VHS to DVD 3.0 SE en formato WMV y tipo de vídeo NTSC. De esta manera, la conversión del formato WMV a AVI, requerida para el uso de CellTrak, fue posible gracias al programa Windows Movie Maker.

CellTrak permite caracterizar la movilidad bacteriana en vídeos guardados en formato AVI, elaborando un diagrama del movimiento celular individual, mediante los valores de la posición bacteriana en el espacio

(coordenadas X, Y) a lo largo del tiempo (figura III.1). El programa permite el cálculo de la velocidad lineal ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) y la frecuencia de los cambios de dirección (RCDI,  $^{\circ}\text{s}^{-1}$ ) de forma individual para cada trayectoria (Harwood, 1989; Lopez de Victoria y col., 1995). El análisis del comportamiento móvil en cuanto a la frecuencia de cambios de dirección y velocidad de desplazamiento se hizo por duplicado para cada tratamiento llevado a cabo, escogiendo 10 trayectorias por vídeo analizado. Para la representación gráfica de los parámetros de movilidad en cada tratamiento, se seleccionaron aquellas trayectorias que presentaron valores medios de velocidad y cambios de dirección.

Para el análisis cuantitativo de la movilidad microbiana, se tomaron como referencia aquellas 10 trayectorias que presentaron unas longitudes de recorrido mayores, descartando aquellas cuya velocidad lineal estuvo por debajo de  $17 \mu\text{m s}^{-1}$ . De esta manera, se cuantificó el sumatorio del número de picos de aceleración por encima de  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  y el número de cambios de dirección mayores de  $1000 ^{\circ}\text{s}^{-1}$ . Estos umbrales de detección permitieron la caracterización y diferenciación de los distintos patrones de movimiento en comparación con el control (en ausencia de efector químico), bajo las mismas condiciones. El análisis estadístico de diferencias significativas entre grupos se hizo mediante el test ANOVA de un factor, HSD Tukey,  $P=0.05$ , con el programa SPSS 11.5.



**Figura III.1** Programa informático Celltrak utilizado para el análisis de las trayectorias celulares en presencia de distintos quimioefectores

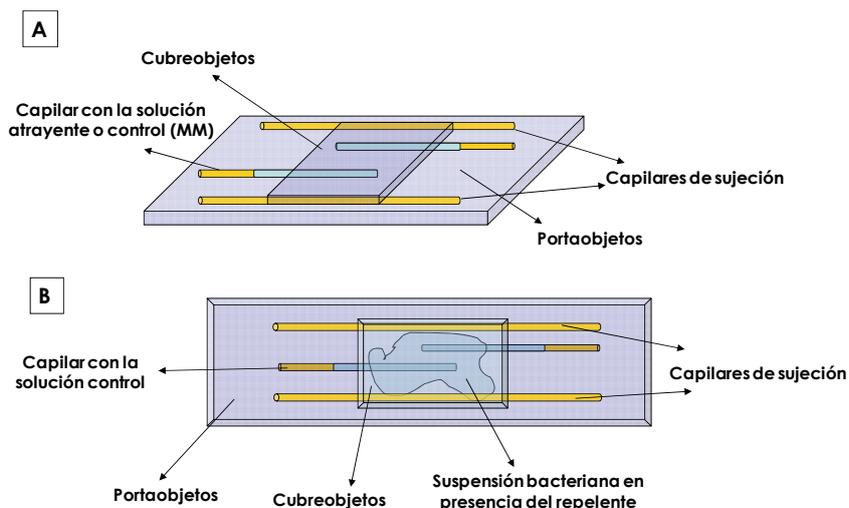
### III.9 EXPERIMENTOS PARA EL ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TÁCTICA

#### III.9.1 ENSAYO CAPILAR

El método que se utilizó para analizar cuantitativamente la respuesta táctica fue puesto a punto con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Velasco Casal y col., 2008), modificando el método capilar original (Adler, 1973). La suspensión de células móviles (en MM,  $DO_{600nm}$  de 0,02) se colocó en una pequeña cámara formada por dos capilares de 1  $\mu$ L colocados en paralelo sobre un portaobjetos (76 x 26 mm) (figura III.2A). Tras ser cerrado con llama en uno de sus extremos y flameado, otro capilar de 1  $\mu$ L se llenó con el atrayente o disolución control (MM) y se situó sobre la suspensión bacteriana. La cámara se cerró con un cubreobjetos (24 x 24 mm). Tras una hora de incubación, se retiraron los capilares, se lavaron y se

rompieron para verter el contenido sobre un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de MM. Finalmente, se sembraron 0,1 mL de la solución en placas de medio rico (TSA) y tras 24 horas de incubación a 30 °C se contaron las colonias que habían crecido en cada uno de los tratamientos. Como sustancias atrayentes se ensayaron los 3 bioestimulantes (a alta y baja concentración de carbono orgánico) y la glucosa a una concentración de 100 mM. Si el número de células que entra en los capilares con atrayente es mayor que el número presente en los capilares con MM (control), la respuesta táctica de la bacteria hacia ese compuesto sería positiva. Si el número de células dentro del capilar es menor, la respuesta podría ser negativa, dato que habría que confirmar con un ensayo capilar de repelencia (compuesto en contacto con la suspensión celular).

El ensayo de repelencia es similar al de atracción, aunque la  $DO_{600nm}$  de la suspensión celular debe ser mayor (0,6) para poder visualizar la respuesta (ya que es menos sensible a la concentración de compuesto). Además, en este caso, la sustancia a ensayar se colocó en dicha suspensión celular, resuspendiendo el pellet con la solución con el compuesto (repelente). Los capilares se llenaron con la solución control sólo con MM (figura III.2B).



**Figura III.2** Cámara quimiotáctica diseñada para analizar la respuesta táctica mediante el ensayo capilar de atracción (A) y repelencia (B)

De esta manera, la respuesta negativa se cuantificó según el número de células que entraron en el capilar, que sólo contenía MM. En este caso, si el número de bacterias que han entrado en el capilar, repelidas por la sustancia ensayada, es mayor que el número que entra cuando en la suspensión sólo hay MM, la respuesta táctica sería negativa. La respuesta de repelencia se ha estudiado para el caso de las NPsAg en un rango de concentración desde  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  hasta  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ , mientras que para la glucosa se utilizó un rango desde  $0,1 \text{ mM}$  hasta  $100 \text{ mM}$ . La mayor entrada de las células en el capilar con MM podría atribuirse a efectos indirectos de la pérdida de la movilidad celular (que puede aumentar la acumulación de células en el capilar, como resultado del movimiento browniano), o bien a una hipermovilidad causada por la sustancia ensayada. Por lo tanto, se estudió el efecto de la presencia del compuesto tanto en la suspensión celular como en el interior del capilar. Bajo estas condiciones, la respuesta de repelencia debería verse anulada y el número de células en los capilares con repelente debería ser igual al del control (en ausencia del mismo).

### **III.9.2 Ensayo de gota con hidroxipropilmetilcelulosa**

Se utilizó un ensayo cualitativo que permitió la visualización directa de la respuesta quimiotáctica positiva a escala macroscópica. El método, descrito por Grimm y Harwood, permite detectar la respuesta táctica positiva de la estirpe *P. putida* G7 hacia distintos quimioefectores (Grimm y Harwood, 1997)

Siguiendo el citado método, se centrifugaron 40 ml de un cultivo de la estirpe *P. putida* G7 en fase temprana del crecimiento estacionario, resuspendiéndose el pellet en 12 ml de tampón quimiotáctico (fosfato potásico a  $100 \text{ mM}$  [pH 7.0], EDTA a  $20 \text{ }\mu\text{M}$ ) y añadiéndose una disolución acuosa de hidroxipropilmetilcelulosa al 1% (formulada para dar una viscosidad de aproximadamente  $4.000 \text{ cP}$  en 2% de solución acuosa) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), hasta completar un volumen de 15 ml. La suspensión celular viscosa se colocó sobre placas de Petri de 60 mm de diámetro a una profundidad de 3 mm, tras lo cual se añadió una gota de  $10 \text{ }\mu\text{l}$  del quimioefector en el centro de la placa. La respuesta quimiotáctica de atracción hacia el compuesto se visualizó como la aparición de un anillo de turbidez alrededor del centro de la placa donde

se colocó dicho compuesto. La turbidez comenzó a observarse después de aproximadamente una hora y siguió siendo evidente durante las siguientes 3 o 4 horas.

### III.10 ENSAYO DE ADHESIÓN

Para comprobar la eficiencia de adhesión bacteriana al material poroso empleado, se utilizaron viales de vidrio de 20 mL de capacidad conteniendo 1,5 g del material poroso y 1 mL de las suspensiones celulares resuspendidas en los distintos quimioefectores, manteniéndose en agitador orbital a 80 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

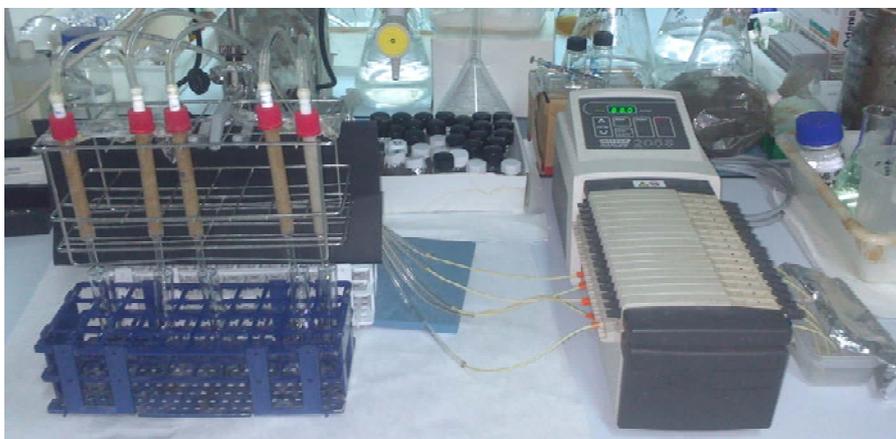
Para cuantificar la adhesión bacteriana, se midió la diferencia de la  $DO_{600nm}$  de las suspensiones celulares antes y después de la incubación, expresándose el % de células adheridas al material. No fue posible llevar a cabo ensayos con suelo, ya que la medida de turbidez debida al suelo enmascaraba los valores de DO obtenidos, sin poder discriminar entre la aportación de turbidez debido a la presencia bacteriana o a la de partículas del suelo en. El % de adhesión sobre superficie de anillas de silicona se cuantificó en ausencia y presencia de exudados a baja concentración de carbono y NPsAg a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ , como ejemplos de quimioefector positivo y negativo, respectivamente. En este caso, se tomaron un total de 23 anillas para utilizar la misma cantidad de material empleado que en los ensayos de adhesión en medio poroso (1,5 g). Las diferencias significativas entre tratamientos se hizo mediante el test ANOVA de un factor, HSD Tukey,  $P=0,05$ , con el programa SPSS 11.5.

Se visualizó en el microscopio óptico la adhesión bacteriana a la interfase DEHP-agua de la estirpe *P. putida* G7 en ausencia y presencia de NPsAg a una concentración de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  según una adaptación de la técnica descrita para la adhesión microbiana a hidrocarburos (BATH) (Rosenberg y col., 1980). El DEHP se utilizó como ejemplo de líquido en fase no acuosa (del término en inglés, NAPL), para estudiar el efecto del patrón de movilidad abrupto en la adhesión a la fase orgánica. Se cuantificó, también, el % de adherencia a la fase orgánica mediante la disminución en la  $DO_{600nm}$  antes y después de la interacción con la fase orgánica (promovida por la agitación mecánica durante 60 segundos de un tubo de ensayo con 3 mL de la mezcla de la suspensión bacteriana en NPsAg y 0,25 mL de NAPL).

### III.11 ENSAYOS DE TRANSPORTE EN COLUMNAS

Los ensayos de transporte se llevaron a cabo a temperatura ambiente en columnas de percolación según el método de Rijnaarts y colaboradores (Rijnaarts y col., 1993b; Rijnaarts y col., 1996b). El material poroso se empaquetó en húmedo (con MM) en columnas de vidrio de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro interno. La cantidad de material empaquetado presente en cada columna fue del orden de 12 g. El suelo agrícola se mezcló con la arena de grano fino en proporción 1:1 para facilitar el empaquetamiento. El suelo forestal mezclado con arena (1:1) se empaquetó en los primeros 2 cm del extremo inferior de la columna, con aproximadamente 2 g de material, completando el relleno con 10 g de arena de la fracción fina (0.4-0.25 mm).

Las columnas se conectaron a una bomba peristáltica funcionando a 23 rpm, y las suspensiones bacterianas ( $DO_{600nm} \sim 0,3$ ,  $10^8$  células  $mL^{-1}$ ) se bombearon a través de las columnas a una velocidad de flujo constante e igual a  $0,135 \pm 0,02$   $mL\ min^{-1}$  (figura III.3). Previamente al bombeo de la suspensión celular, las columnas se lavaron con MM durante 30 minutos (aproximadamente 1 volumen de poro, VP). Para el caso de los experimentos con suelo, el MM se bombeó hasta que dejó de evidenciarse turbidez en los eluyentes. Se comprobó que la absorbancia del influente permaneció inalterada durante la duración de los experimentos.



**Figura III.3** *Dispositivo diseñado para estudiar el transporte bacteriano en columnas*

El transporte de las bacterias a través de las columnas se siguió fotométricamente a determinados intervalos de tiempo. La eficacia de la salida bacteriana se expresó como  $DO_{600nm}$  en el efluente a la salida de la columna (C) dividido por la  $DO_{600nm}$  en el influente en la columna ( $C_0$ ).

**Tabla III.5** Propiedades hidrodinámicas de los materiales porosos empleados

	Material poroso		
	Arena de grano fino	Arena de grano grueso	Arena+Suelo Agrícola (1:1)
<b>Flujo Hidráulico</b> ( $cm\ min^{-1}$ )	0,50	0,41	0,47
<b>VP</b> ( $mL$ )	2,677	3,265	2,865
<b>Porosidad</b>	0,34	0,41	0,36

Todos los resultados se dan como la media de ensayos realizados por duplicado.

Los resultados se exponen mediante la representación de las curvas de rotura o curvas de elución de cada uno de los tratamientos. Para ello, es necesario obtener los valores de los volúmenes de poro en las columnas empleadas en el ensayo, así como los valores de la eficacia de la salida bacteriana ( $C/C_0$ ) a través de éstas. Las propiedades hidrodinámicas de los distintos materiales aparecen reflejadas en la tabla III.5.

El volumen de poro (mL) es el volumen de líquido que ocupa la columna en ausencia de sólido. Se determinó, para cada material, mediante la diferencia de peso de la columna, una vez empaquetada, antes y después de ser secada en estufa a 60°C. El flujo hidráulico se calculó dividiendo el producto de la velocidad de flujo del fluido y la longitud de la columna entre el volumen de poro (mL) en la misma. La porosidad se obtuvo de la relación entre VP (mL) en la columna y volumen total (mL) de líquido que puede ocuparse en la misma, siendo, por tanto, un parámetro adimensional.

El transporte puede describirse en términos de eficiencia de adhesión bacteriana a la superficie del material empleado en las columnas, pudiéndose distinguir entonces, entre valores altos de  $C/C_0$ , que se corresponderán con una baja adhesión y un transporte bacteriano alto, y valores bajos de  $C/C_0$ , indicativos de una alta eficiencia de adhesión.

La eficiencia de adhesión,  $\alpha$ , puede calcularse por la relación entre la tasa de adhesión,  $\eta_t$ , y la tasa de transporte bacteriano hacia la superficie del colector,  $\eta_{trans}$ , según la fórmula (Elimelech y Omelia, 1990) :

$$\alpha = \eta_t / \eta_{trans}$$

La eficiencia de adhesión depende de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que gobiernan las interacciones entre superficies bacterianas y superficie del colector.

Al inicio del experimento de transporte, el sistema opera bajo condiciones de lecho limpio, es decir, la única superficie disponible para la deposición es la del colector. Por lo que  $\eta_t = \eta_{trans}$ , acercándose el valor de  $\alpha$  a 1, bajo condiciones favorables para la adhesión (en ausencia de fuerzas repulsivas entre células). El cálculo de  $\eta_{trans}$  tiene en cuenta las contribuciones de convección, difusión, atracción de Van der Waals y sedimentación (Martin y col., 1992; Rijnaarts, 1994). El valor de  $\eta_t$  se calcula a partir de los valores de  $C/C_0$  obtenidos en los experimentos de transporte (Jucker, 1998b).

A medida que transcurre el experimento, el número de células adheridas al colector va aumentando y la adhesión bacteriana a la superficie empieza a estar impedida por la repulsión que ejercen las bacterias que están depositadas en el colector. Bajo estas condiciones de bloqueo del filtro,

hay que tener en cuenta el factor de bloqueo, B, que depende del recubrimiento celular en la superficie del material,  $\Theta$  (Rijnaarts, 1994):

$$\alpha = \alpha_0 (1 - B \Theta)$$

En condiciones de lecho limpio,  $\Theta = 0$ , por lo que  $\alpha = \alpha_0$ , fomentando que las condiciones de adhesión sean óptimas, tal como hemos visto que ocurre al inicio del experimento (bajo ausencia de repelencia).

Los valores obtenidos para los parámetros de  $\alpha$ ,  $\Theta$  y B, caracteriza el transporte bacteriano en los distintos tratamientos estudiados en función del efecto que provoquen en el transporte y la adhesión. Para ello se tuvieron en cuenta dos momentos para el cálculo de los mismos, uno al comienzo del experimento, justo a la salida del frente bacteriano (~1 VP) y otro casi al final del experimento (~ 4 VP), donde se tuvo en cuenta el factor bloqueo.

### **III.11.1 Empleo de quimioefectores en los ensayos de transporte**

#### **III.11.1.1 Efecto directo**

Los quimioefectores glucosa y NPsAg se utilizaron a distintas concentraciones. Para el caso de la glucosa se empleó el barrido de concentraciones utilizado en el análisis de la respuesta táctica, 0,1M, 1M, 10M y 100M. Las disoluciones de NPsAg de 0,2 mg L<sup>-1</sup> y 55 mg L<sup>-1</sup> fueron sonicadas justo antes de comenzar el experimento, para asegurar la estabilidad de las NPsAg y evitar la aglomeración coloidal.

Los ensayos de transporte con las distintas fuentes de carbono orgánico disuelto (exudados, ácidos húmicos y el fertilizante oleofílico) se llevaron a cabo con cultivos bacterianos resuspendidos en las disoluciones de las mismas. Para ello, una vez lavado y centrifugado el cultivo bacteriano, el pellet se resuspendió en las soluciones con el carbono orgánico disuelto (COD).

#### **III.11.1.2 Efecto del pre-bombeo**

En algunos experimentos de transporte bacteriano, las columnas se pre-acondicionaron con las soluciones de COD antes de bombear la suspensión bacteriana. Para ello, una vez empaquetadas las columnas, se

procedió al bombeo de las soluciones durante 90 minutos (4 VP), tras lo cual se bombeó MM durante 60 minutos (2,5 VP) para lavar el exceso de carbono que quedase en disolución, seguido del bombeo de la suspensión bacteriana. De esta manera, podría determinarse el efecto de la materia orgánica adsorbida a la arena sobre el transporte bacteriano.

### **III.11.1.3 Reversión del transporte de bacterias adheridas en las columnas**

En determinados experimentos, se estudió la reversión de la adhesión de aquellas bacterias que quedaban adheridas al colector mediante el bombeo de COD a distintas concentraciones. Para ello, se procedió a bombear la suspensión bacteriana en MM en ausencia de COD durante 90 minutos, seguidamente del bombeo de MM durante 60 minutos para lavar las células que quedasen en solución. A continuación, se bombeó la disolución de COD para estudiar su efecto en la reversión de la adhesión de las bacterias que habían quedado depositadas en la arena.

Para discriminar si el efecto reversionador del transporte era por mecanismos físicos o fisiológicos, se añadió  $\text{HgCl}_2$  (a una concentración de  $1,32 \text{ mg L}^{-1}$ ) a la suspensión bacteriana antes de bombearla a través de las columnas para inactivar las células.

### **III.11.1.4 Empleo del quimioefector naftaleno en las columnas**

Dado que la solubilidad del naftaleno es baja, los ensayos de transporte se prepararon con el naftaleno en forma de cristales en la parte superior de las columnas. El naftaleno se introdujo sobre el material empaquetado como una disolución de acetona y se dejó evaporar bajo corriente de nitrógeno.

### **III.11.1.5 Caracterización físico-química de los quimioefectores empleados**

El potencial zeta y ángulo de contacto de las disoluciones de los quimioefectores en MM se determinaron según el método descrito en el epígrafe III.7. Las medidas de ángulo de contacto se determinaron sobre superficie de arena.

La tensión superficial se midió a temperatura ambiente utilizando un tensiómetro de anillo de platino TD1 Lauda, Hucoa-Erlös (Laha y Luthy, 1992). Tras cada medida, se eliminaron las posibles trazas de compuesto mediante flameo del anillo. Los resultados se dan como la media de las medidas obtenidas por triplicado para cada uno de los quimioefectores (a las distintas concentraciones ensayadas) en comparación con las medidas obtenidas para el control (MM). Las diferencias significativas entre el valor obtenido para cada quimioefector y el del control (MM) se analizaron mediante el test pareado de *t*-student,  $P=0.01$ , con el programa Sigmaplot 8.0.

### **III.12 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO**

Los ensayos de biodegradación de naftaleno se llevaron a cabo en las columnas descritas en el epígrafe III.9, bajo las mismas condiciones de los experimentos de transporte, utilizando los exudados a baja concentración de carbono y las NPsAg a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ , como quimioefectores.

#### **III.12.1 Carga de anillas de silicona con naftaleno marcado con $^{14}\text{C}$ radiactivo**

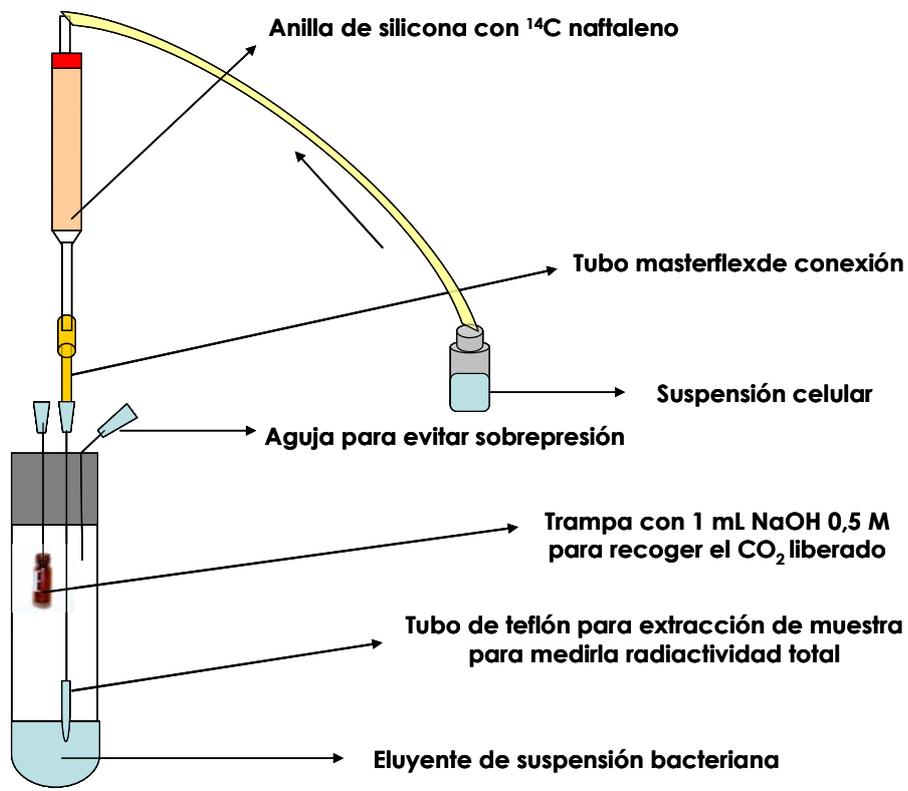
Se usó el método de dopaje dinámico (Smith y col., 2012). Para ello, se colocaron un máximo de 8 anillas (según el experimento) en el fondo de un vial de cristal de 20 mL de capacidad y se añadió 1 mL de una solución de naftaleno en acetona ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) a la que, previamente, se le había añadido el volumen de stock de naftaleno radiactivo (en acetona) para obtener 200.000 dpm por anilla. El vial se dejó en campana extractora durante toda la noche para que se evaporara la acetona en disolución. Posteriormente, se aplicaron gotas de agua milli-Q en series de 25 a 200  $\mu\text{L}$  cada 5 minutos durante 35 minutos, bajando la frecuencia a 15 minutos en las últimas 5 dosis realizadas. Al siguiente día, se repitieron 3 series de dosificación de 1 mL de agua cada hora. Para conocer la cantidad de naftaleno marcado que la anilla había absorbido, se dejaron dos anillas (utilizadas como control) en un vial de cristal, por separado, añadiendo 1 mL de metanol para extraer el naftaleno marcado. Después de 72 horas de extracción en metanol, se midió la cantidad de radiactividad (dpm) disuelta en metanol mediante centelleo líquido en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS6500 (Beckman Instruments, Fullerton,

California, USA). Se determinó por duplicado la radiactividad (un tubo procedente de cada columna por duplicado) mediante un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS6500 (Beckman Instruments, Fullerton, California, USA).

### **III.12.2 Ensayos de mineralización en columnas**

Las anillas cargadas con naftaleno marcado radiactivamente (con ~200.000 dpm cada una) se colocaron en el fondo de las columnas por encima de 2 cm de arena empaquetada previamente. Las anillas se recogieron con la ayuda de unas pinzas del vial de cristal en el que se encontraban embebidas en agua y se lavaron, por separado, en agua milli-Q antes de introducirlas (una vez secas con papel secante) en las columnas. Se completaron las columnas con 10 g de arena fina, que se empaquetaron siguiendo las mismas condiciones que para el experimento de transporte descrito en el epígrafe III.9.

Para medir la mineralización de naftaleno, se tomaron muestras de los eluyentes de las columnas en tres intervalos de tiempo durante el transporte bacteriano, correspondiéndose con la salida del frente (a la hora del comienzo del experimento, a 1VP), dos horas después (~ 5 VP) y tres horas y media tras el comienzo del experimento (~ 10 VP). Cada muestra se recogió en un dispositivo diseñado para recuperar el naftaleno transformado en CO<sub>2</sub> (figura III.4).



**Figura III.4** Dispositivo diseñado para la recogida de muestras del transporte bacteriano usadas para el estudio de la mineralización de naftaleno desorbido de la anilla en las columnas de transporte

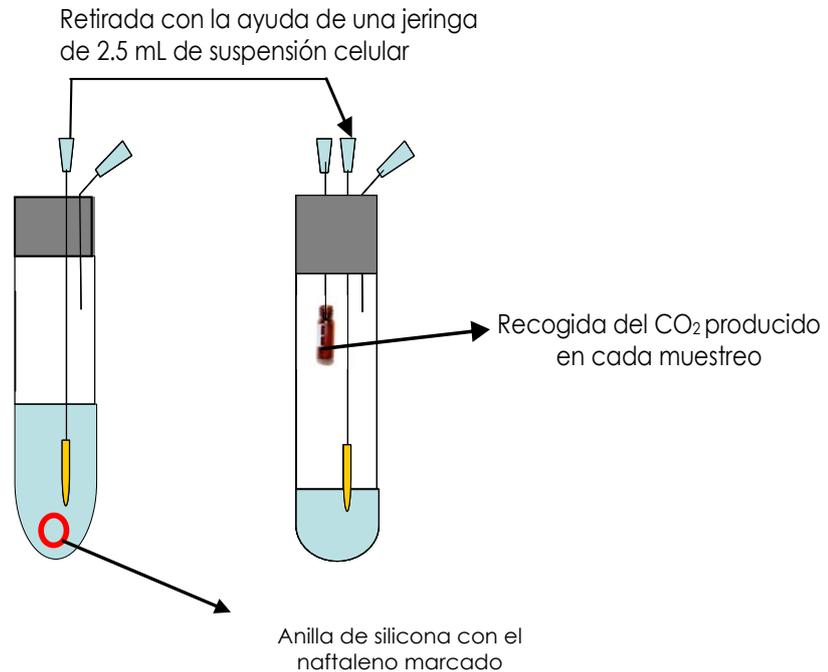
Los eluyentes se recogieron durante 20 minutos, tras lo cual se separó el dispositivo de la columna y se tomaron 0,5 mL para medir la radiactividad presente en la muestra. Éste sería el valor de la cantidad de naftaleno desorbido desde la anilla y eluído a través de la columna. A continuación se añadió 1 mL de HCl 2N para inactivar las células bacterianas presentes en los eluyentes y recoger el  $\text{CO}_2$  producido por la mineralización de las bacterias presentes en ese punto concreto. Los tubos, con la trampa de sosa incorporada, se dejaron en agitación continua a 80 rpm durante 12

horas, para recoger el total de CO<sub>2</sub> producido de la mineralización del naftaleno (cuyo valor de radiactividad, que conocemos por la medida de los 0,5 mL tomados, constituiría el 100 % presente inicialmente en cada muestra. La muestra (1 mL) recogida de la trampa de sosa se mezcló con 5 mL de líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman Instruments, Fullerton, California, USA), dejándose la mezcla en oscuridad durante al menos 8 horas para la disipación de la quimioluminiscencia.

### **III.12.3 Ensayo de mineralización en fase acuosa**

Se determinó la desorción de naftaleno desde la anilla a la fase acuosa y la biodegradación del naftaleno desorbido. Para ello, se prepararon 12 tubos para permitir la toma de muestras, en duplicado por tratamiento, con 5 mL de suspensión bacteriana en contacto con los exudados, NPsAg o MM (control). En el fondo de cada tubo se colocó una anilla que contenía <sup>14</sup>C naftaleno (~ 200.000 dpm), que había sido preparada como se ha descrito anteriormente.

En cada toma de muestra, se sacrificaron dos tubos por tratamiento, tomando 2,5 mL de la suspensión bacteriana (volumen de eluyente recogido durante 20 minutos en los ensayos en columna). Las muestras se añadieron a otro tubo que tenía incorporada una trampa de sosa para medir el CO<sub>2</sub> producido. De estos 2,5 mL se recogieron 0,5 mL para medir la radiactividad total con el contador de centelleo, para determinar, así, la desorción de naftaleno a lo largo del tiempo. Se añadió 1 mL de HCl 2N, de la misma manera que en el experimento en columnas. Los tubos que contenían la suspensión bacteriana con el HCl añadido, se mantuvieron en agitación a 80 rpm a temperatura ambiente durante 12 horas, para recoger el CO<sub>2</sub> producido por la población bacteriana en cada momento de muestreo (figura III.5)



**Figura III.5** *Dispositivo diseñado para la recogida de muestras en el estudio de la mineralización de adsorbido en suspensiones bacterianas*

#### III.12.4 Balance de masas

Al final de cada experimento, se extrajo con metanol la cantidad de naftaleno que no había sido desorbida de las anillas. El sumatorio del naftaleno no liberado de la anilla, el desorbido durante el tiempo que transcurre el transporte bacteriano y el naftaleno que quedó en el interior de las columnas de arena, hizo posible determinar el balance de masas.

Para medir el naftaleno residual en el interior de las columnas, una vez terminado el experimento, cada columna se desmontó y se dividió en 4 partes para recoger cada fracción de arena que se guardaría en un vial de cristal sellado y se mantuvo en frío a 4°C durante toda la noche. El <sup>14</sup>C

presente en estas muestras se determinó mediante combustión en un oxidizador biológico, modelo OX 500, (R. J. Harvey Instrument Corporation).

Para llevar a cabo el proceso de combustión, cada fracción de arena se colocó, con la ayuda de una espátula, en un pocillo de porcelana que se introdujo, mediante un portamuestras de vidrio en el interior del oxidizador. A continuación, se seleccionó el ciclo para  $^{14}\text{C}$ . Se estableció un periodo de 4 minutos de combustión. Una vez terminado el proceso de oxidación, se recogieron los viales de centelleo con el  $^{14}\text{C}$  en solución de líquido de centelleo cóctel de centelleo (Oxosol  $^{\text{TM}}$  C $^{14}$ , National Diagnostics, USA) y se midió la radiactividad en contador de centelleo.

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS**

## **IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ESTIRPE OBJETO DE ESTUDIO**

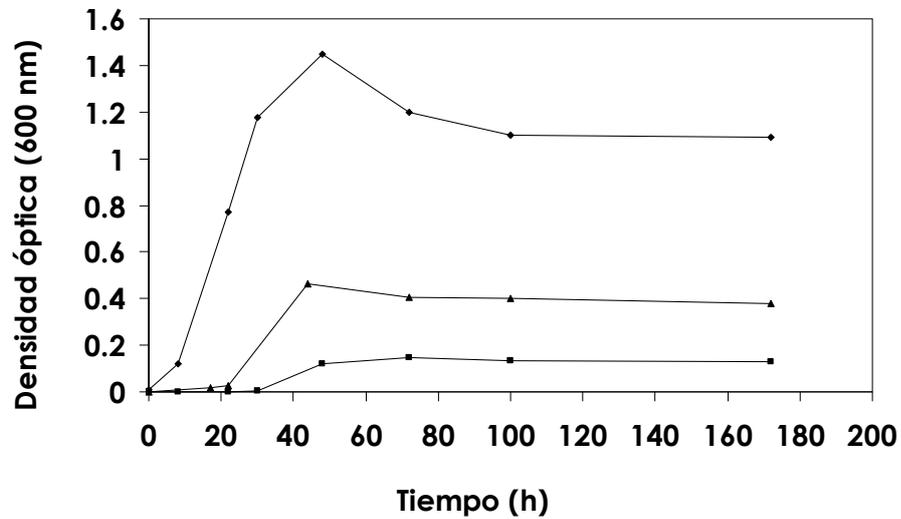
Para determinar las condiciones experimentales idóneas, fue necesario el estudio previo de la curva de crecimiento de la estirpe objeto de estudio, *Pseudomonas putida* G7. Una vez determinadas las condiciones de cultivo y selección del momento exacto de cultivo para los experimentos, se examinaron algunas propiedades celulares relevantes. Se estudiaron la hidrofobicidad, carga superficial, la longitud celular y el grado de movilidad, características que podrían afectar al transporte bacteriano.

### **IV.1.1 CURVA DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO**

La fuente de carbono utilizada en los cultivos bacterianos puede ser un factor decisivo en la composición de la pared celular, afectando, de este modo, a propiedades como la carga superficial o la hidrofocidad. Estos factores podrían influir en su crecimiento, morfología y modo de interacción con las superficies sólidas.

Se han utilizado varios compuestos como fuente de carbono, entre los que destaca uno preparado a base de triptona, como ejemplo de medio rico. En otro medio, la fuente de carbono fue salicilato sódico, intermediario de la ruta de degradación de naftaleno. El objetivo del estudio era determinar si la fuente de carbono afecta a las propiedades fisiológicas y/o físicas de la pared celular bacteriana, y por ende, a la deposición celular en medios porosos saturados. Se utilizó, también, acetato sódico, que constituyó una fuente de carbono eficiente para aumentar la biomasa, pero que proporcionó escasa energía para el movimiento bacteriano. Ello se confirmó en microscopio óptico por la visualización de una movilidad reducida en el

El crecimiento celular fue óptimo cuando se utilizó la triptona como fuente de carbono, ya que es un componente fácilmente metabolizable y que confiere un aporte energético alto a las células bacterianas (figura IV.1). Por el contrario, el acetato destacó por su ser una fuente de carbono pobre para el crecimiento bacteriano, siendo el valor máximo de  $D.O.600_{nm}$  inferior a 0,2, manifestándose mediante una movilidad reducida.



**Figura IV.1** Curva de crecimiento de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 utilizando triptona 1% (♦), salicilato sódico 5mM (▲) y acetato sódico 5mM (■) como fuente de carbono

A pesar de que la estirpe creció más rápido con triptona, con una tasa de duplicación de 1,07 h (tabla IV.1), se pensó que el salicilato sódico sería una mejor elección como fuente de carbono para los estudios posteriores, dado que fue descrito como un inductor de la quimiotaxis a naftaleno (Grimm y Harwood, 1997), lo que aseguraría el fenómeno quimiotáctico en los ensayos a llevar a cabo.

**Tabla IV.1** Eficacia de crecimiento de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en función del compuesto metabolizado.

	Salicilato	Acetato	Triptona
Tasa de duplicación $T_d$ (h)	2,7	39,4	1,07
Tasa de crecimiento $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,26	0,02	0,65

#### IV.1.2 HIDROFOBICIDAD CELULAR Y CARGA SUPERFICIAL

Con el fin de determinar si la fuente de carbono utilizada podría influir en las propiedades físico-químicas de la superficie celular, se determinaron el potencial zeta y el ángulo de contacto para conocer la carga superficial e hidrofocidad celular, respectivamente.

La estirpe *P. putida* G7 puede considerarse como intermedia entre hidrofílica e hidrofóbica, independientemente de la fuente de carbono empleada (tabla IV.2). Las células que presentan ángulos de contacto por debajo de 20° se definen como células hidrofílicas, entre 20° y 50°, células intermedias entre hidrofílicas e hidrofóbicas, y aquellas que presentan ángulos de contacto mayores de 50°, se definen como células hidrofóbicas (Rijnaarts y col., 1995).

No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para el caso de la triptona y el salicilato (tabla IV.2). Es posible que la composición de la pared y membrana celulares fuera distinta dependiendo de la fuente de carbono, pero esto no fue un factor determinante en las propiedades físico-químicas de la superficie celular analizadas. En el caso del acetato, el valor del ángulo de contacto fue significativamente menor ( $39,7 \pm 6,8^\circ$ ) al existente cuando la bacteria se cultivó en salicilato ( $47,2 \pm 6,1^\circ$ ), aunque siguió estando intermedio entre hidrofílico e hidrofóbico. Este factor lo discutiremos más adelante debido a su posible efecto en la deposición sobre materiales porosos saturados (véase epígrafe IV.6.4.1.3a).

#### IV.1.3 MORFOLOGÍA Y TAMAÑO CELULAR

Cuando la bacteria se cultivó con acetato sódico como fuente de carbono, la morfología y tamaño celular fue la misma que con salicilato, pero la movilidad fue bastante reducida. En cambio, las células cultivadas en triptona, presentaron una longitud significativamente mayor ( $P=0,01$ ) que cuando se cultivaron con salicilato y acetato sódico (tabla IV. 2). No es de extrañar que la elongación de la célula creciendo en triptona sea mayor, ya que es un compuesto fácilmente metabolizable y con alto contenido energético, haciendo que su consumo provoque un aumento de la elongación celular.

Del mismo modo, la movilidad en medio rico a base de triptona fue muy alta, en contraposición con la observada con el acetato sódico, donde prácticamente fue nula. En el caso del salicilato sódico, la movilidad fue muy alta, especialmente, en la fase temprana estacionaria. De ahí a que este fuera el momento seleccionado como idóneo para llevar a cabo los experimentos.

**Tabla IV.2** Caracterización de la superficie y longitud celular de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en la fase estacionaria cultivada con diferentes fuentes de carbono.

	Salicilato sódico	Acetato sódico	Triptona
<b>Ángulo de contacto (°)</b>	47,2 ± 6,1	39,7 ± 6,8	47,5 ± 2,4
<b>Potencial zeta (ζ) (mV)</b>	-30,9 ± 2,1	-30,7 ± 2,3	-31,2 ± 0,4
<b>Longitud celular (μm)</b>	1,58 ± 0,1	1,44 ± 0,2	3,3 ± 0,2

La morfología exhibida por el microorganismo varió según la fuente de carbono y la fase de cultivo. Así pues, cuando la bacteria se cultivó con salicilato sódico, la forma celular fue más alargada en fase temprana exponencial, donde los nutrientes son abundantes y la densidad poblacional baja, pudiendo ser la elongación celular mayor. En este caso, la longitud fue significativamente mayor ( $1,88 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) a la longitud en fase temprana estacionaria ( $1,58 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ). En el comienzo de la fase estacionaria, la alta densidad celular hizo que la célula adquiriera una forma más redondeada, con una longitud de  $1,58 \pm 0,11 \mu\text{m}$ . Así pues, a medida que avanza el ciclo celular, la longitud de la bacteria fue cada vez menor, siendo de  $1,45 \pm 0,2 \mu\text{m}$  en el inicio de fase de latencia, aunque la longitud no fue significativamente diferente a la que presenta la bacteria en fase temprana estacionaria. La comparación con la longitud celular en fase estacionaria es debido a que, como ya comentamos con anterioridad, fue la fase seleccionada para llevar a cabo los experimentos por la máxima movilidad observada (% de células móviles y grado de movilidad).

## **IV.2 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES QUIMIOTÁCTICOS**

### **IV.2.1 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

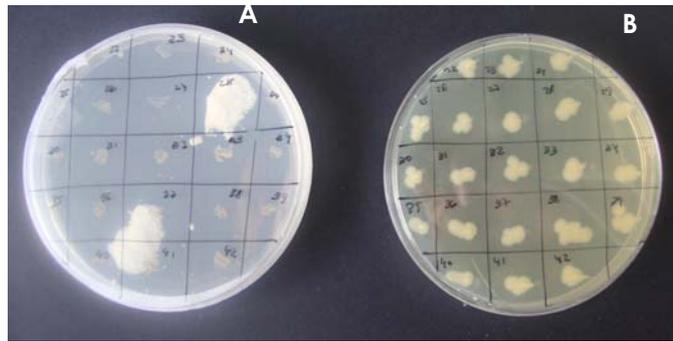
El proceso de mutagénesis requiere el conocimiento de los antibióticos a los que la estirpe *P. putida* G7 es resistente. Se ensayó el crecimiento en presencia de kanamicina (Km), gentamicina (Gm), ampicilina (Am), cloranfenicol (Cm), estreptomina (Sm) y tetraciclina (Tet) en un rango de concentraciones entre 3 mg L<sup>-1</sup> y 80 mg L<sup>-1</sup>. La bacteria creció en placas de medio rico LB que contenían Am y Gm a todas las concentraciones, Cm a concentraciones menores de 60 mg L<sup>-1</sup> y Sm a concentraciones menores de 40 mg L<sup>-1</sup>. No se observó crecimiento en Tet y Km a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Puesto que el plásmido PRL1063, presente en el genoma de *E. coli*, contiene los genes de resistencia a Km, se escogió este antibiótico para la obtención de los mutantes, ya que *P. putida* G7 es sensible al mismo.

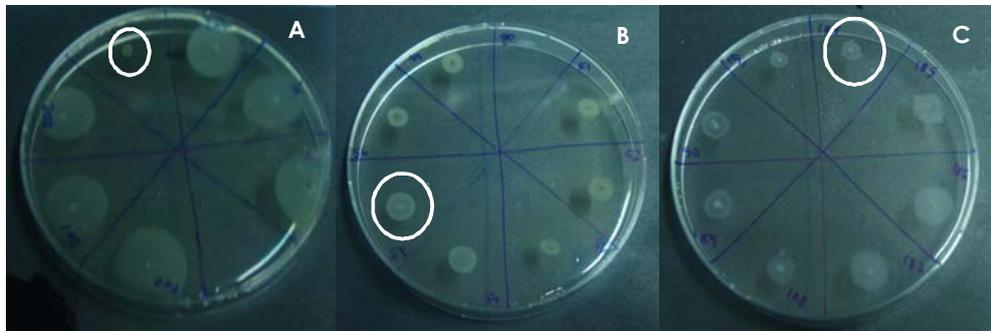
Tras varios ensayos para comprobar la concentración de antibióticos de resistencia con la que fuera posible la obtención de mutantes, conseguimos que la transformación fuera viable empleando los antibióticos Cm a 10 mg L<sup>-1</sup> y Km a 50 mg L<sup>-1</sup>. De esta manera, los transformantes eran las únicas bacterias que podían crecer en placas LB en presencia de ambos antibióticos.

### **IV.2.2 MUTANTES DEFICIENTES EN LA RESPUESTA TÁCTICA**

Del primer escrutinio de la mutagénesis llevada a cabo, se obtuvo un número muy alto de transformantes de *P. putida* G7 que habían incorporado los genes de resistencia a Km desde *E. coli*, sin haberse afectado el plásmido NAH7 de degradación de naftaleno (figura IV.2). Un segundo escrutinio permitió seleccionar mutantes deficientes en la respuesta quimiotáctica a salicilato (figura IV.3) que serían válidos para el estudio de movilidad y quimiotaxis.



**Figura IV.2** Transformantes de *P.putida* G7 creciendo en agar con naftaleno (A) y medio rico, TSA (B)



**Figura IV.3** Selección de mutantes de *P. putida* G7 deficientes en quimiotaxis a salicilato. Ausencia de halo en la mutante 91 (A) y formación de halo debido a la respuesta quimiotáctica debilitada de la mutante 55 (B) y 184 (C)

El mutante 91 se escogió por la ausencia de respuesta táctica positiva frente a salicilato. Ello se confirmó mediante la carencia del anillo de turbidez alrededor del punto de inoculación en la placa de agar semisólido con salicilato (figura IV.3A). Los mutantes 55 y 184 se seleccionaron por su deficiencia en quimiotaxis a salicilato, evidenciada por la presencia de un anillo difuso alrededor del punto de inoculación (figuras IV.3B y IV.3C).

El mutante 91 sirvió como control no quimiotáctico (Chem<sup>-</sup>) del estudio del efecto de la respuesta táctica en el transporte bacteriano. Los mutantes 55 y 184, cuyos patrones de movilidad intrínseca fueron diferentes al de la

silvestre, se emplearon para elucidar el papel que el patrón de movilidad bacteriano juega en el transporte.

### **IV.3 ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD BACTERIANA**

El estudio de la movilidad bacteriana consistió en el análisis de las trayectorias celulares individuales de *Pseudomonas putida* G7 en la fase estacionaria temprana en presencia de distintos compuestos. Se analizó, también, el movimiento celular en fase exponencial tardía para determinar las diferencias en el patrón de movilidad a lo largo del ciclo celular bacteriano, así como el patrón de movilidad de los mutantes descritos en el epígrafe IV.2.2. Para ello, se han utilizado dos parámetros de movilidad: la tasa de cambio de dirección, de sus siglas en inglés, RCDI ( $^{\circ} s^{-1}$ ) y la velocidad lineal ( $\mu m s^{-1}$ ).

De esta forma, se han descrito dos patrones de movilidad inducidos: el movimiento observado en presencia de un atrayente, caracterizado por unas trayectorias rectilíneas mantenidas sin cambios de dirección. Y el patrón de movimiento detectado en presencia de un repelente, que se caracterizó por la alta frecuencia de cambios de dirección. Estos patrones de movilidad se han observado bajo otras condiciones experimentales, como con los mutantes de movilidad y la movilidad intrínseca de la estirpe silvestre *P. putida* G7 en fase exponencial.

#### **IV.3.1 MOVIMIENTO DE RESPUESTA TÁCTICA POSITIVA**

Este patrón de movimiento se caracteriza por la presencia de trayectorias rectilíneas o curvas con una escasa frecuencia de cambios de dirección. Este tipo de movimiento es típico para la estirpe *P. putida* G7 en presencia de un atrayente, aunque también se observó para el caso del mutante 55 en ausencia de compuesto.

#### IV.3.1.1 Patrón de movilidad frente a atrayentes

Cuando la estirpe bacteriana detectó un atrayente en solución, como el salicilato sódico a una concentración de 10 mM, su patrón de movimiento pasó a seguir trayectorias mantenidas sin cambios bruscos en la dirección (figuras IV. 4A, D, G) en comparación a la movilidad en ausencia de compuesto, donde la bacteria cambió de dirección de forma aleatoria (figuras IV.4B, E,H). El número total de cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$  fue nulo cuando las células bacterianas detectaron el salicilato en solución, en comparación a los  $51 \pm 0,7$  cambios de dirección cuantificados en ausencia de compuesto.

#### IV.3.1.2 Patrón de movilidad del mutante 55

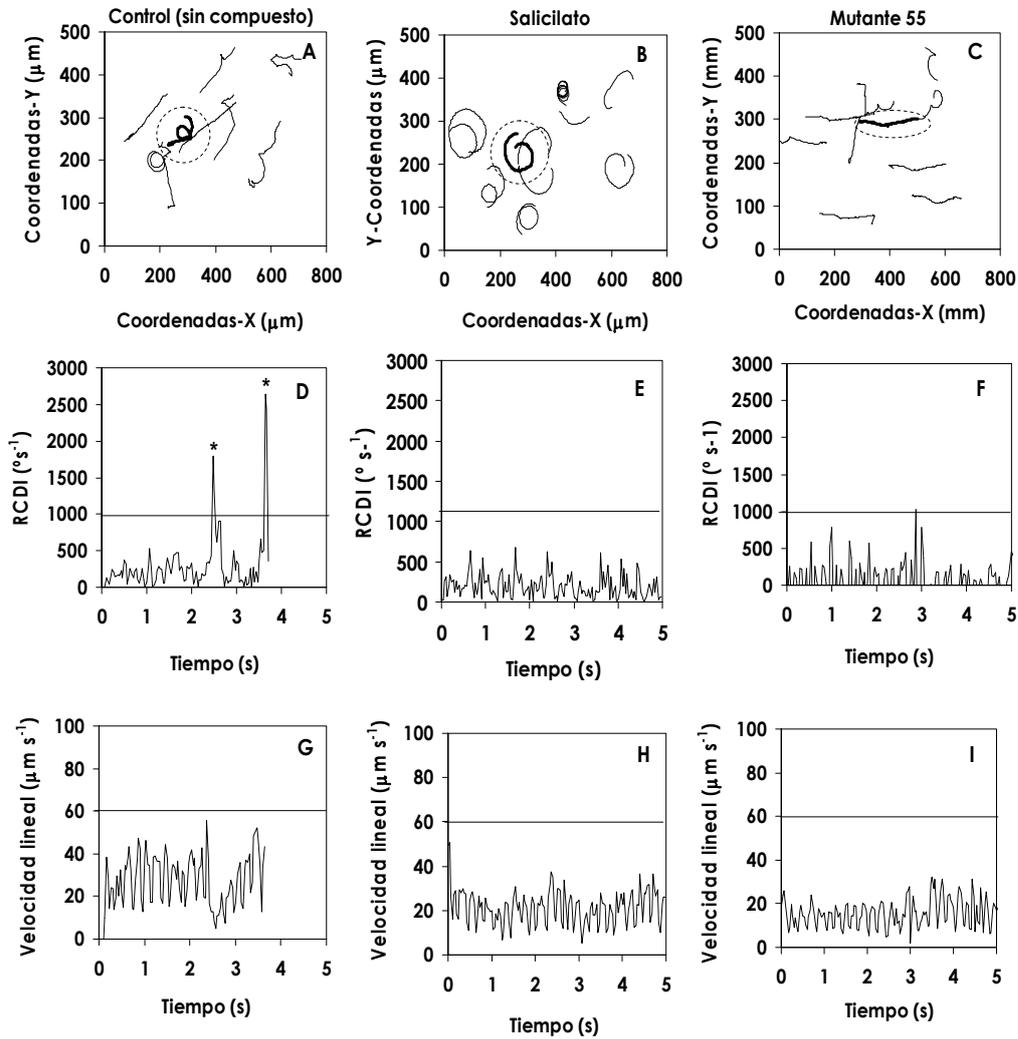
La visualización en el microscopio óptico del movimiento celular del mutante 55 en ausencia de compuesto hizo pensar que se trataba de un mutante deficiente en el cambio de dirección. Su movimiento estaba caracterizado por trayectorias rectilíneas mantenidas en el tiempo. De ahí que se analizaran las trayectorias seguidas con el programa Celltrak, comparándose con la estirpe silvestre en presencia y ausencia de salicilato, como ejemplo de patrón de movilidad sin cambios de dirección.

Las trayectorias celulares fueron rectilíneas, caracterizadas por la baja frecuencia de cambios de dirección (figura 4C, F, I), de forma similar a las trayectorias llevadas a cabo en presencia de un atrayente como el salicilato (figura 4A, D, G) en comparación a la movilidad intrínseca de la estirpe silvestre *P.putida* G7 en ausencia de compuesto (figura 4B, E, H ).

El número de cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$  del sumatorio de trayectorias analizadas para el caso del mutante 55 fue de  $19 \pm 5,7$ , significativamente inferiores a los  $51 \pm 0,7$  cambios de dirección que se cuantificaron para la estirpe silvestre.

De esta manera, la mutante 55 podría definirse como deficiente en cambiar la dirección de su movimiento, pudiendo denominarse como mutante "smooth", que es el movimiento típico en presencia de un atrayente.

Resultados



**Figura IV.4** Diagrama del patrón de movilidad de la la estirpe silvestre *P. putida* G7 en ausencia (A) y presencia del quimioefector positivo salicilato(B) en comparación con el movimiento del mutante 55 (C). Tasa de cambios de dirección (D-F) y velocidad (G-I) de trayectorias celulares representativas, rodeadas por un círculo punteado en las figuras A-C. Las líneas horizontales representan los valores umbrales de detección de los cambios de dirección superiores a  $1000\text{ }^{\circ}\text{s}^{-1}$  (D-F) y los picos de aceleración mayores de  $60\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$  (G-I). Los cambios de dirección por encima del umbral se representan con asteriscos.

### IV.3.2 MOVIMIENTO ABRUPTO

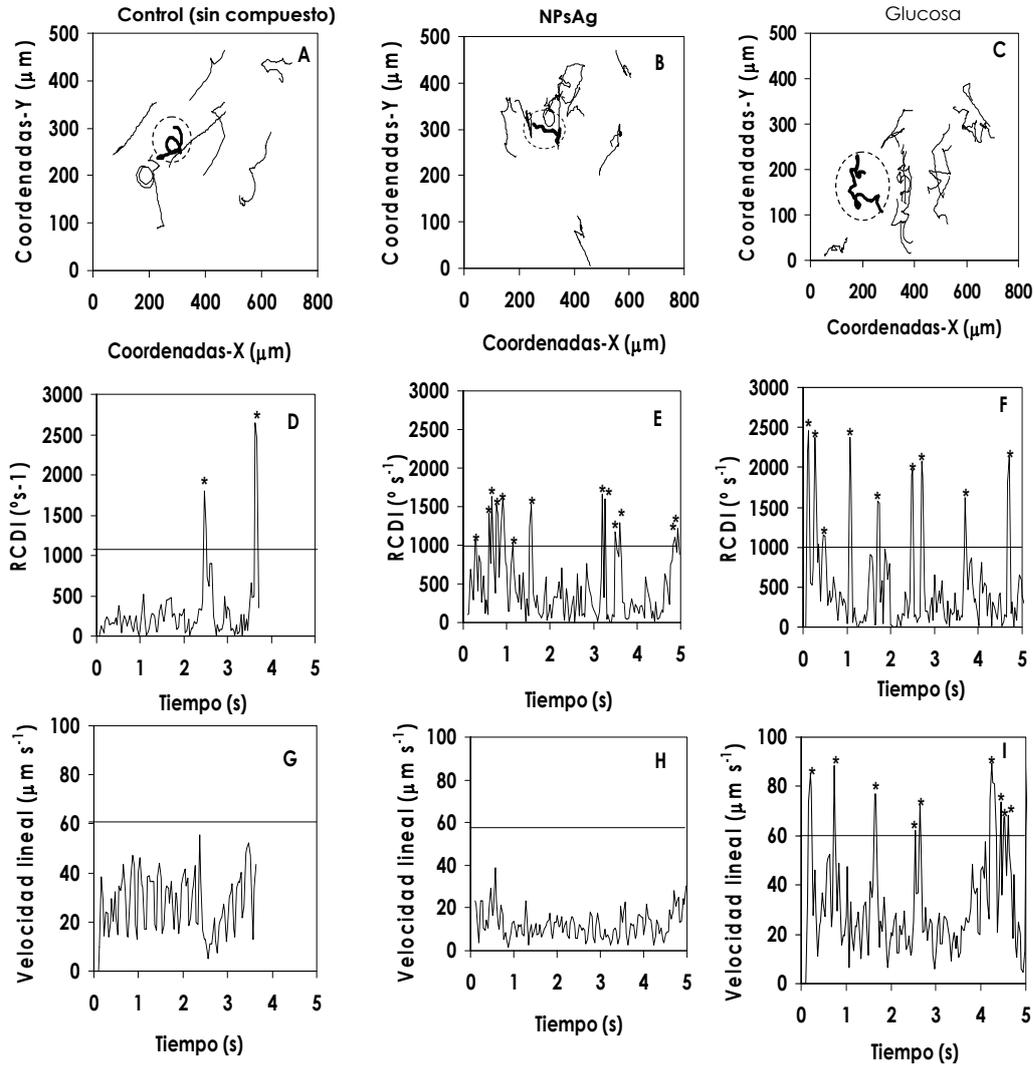
En contraposición al movimiento suave sin cambios de dirección descrito anteriormente, se ha descrito otro tipo de patrón de movilidad que se caracteriza por la alta frecuencia de cambios de dirección que siguen las trayectorias celulares. Esta variable de movimiento se ha observado en varios casos que analizaremos a continuación.

#### IV.3.2.1 Patrón de movilidad de la estirpe *P. putida* G7 en presencia de NPsAg y glucosa

Como se ha descrito más arriba, la movilidad intrínseca de la bacteria, esto es, en ausencia de efector táctico, se caracterizó por seguir trayectorias cortas con algunos cambios bruscos de dirección ocasionales en su movimiento (figuras IV.5A, D, G). En presencia de NPsAg (a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), las trayectorias pasaron a ser más cortas y los cambios de dirección fueron más frecuentes (figuras IV.5B, E,H), cuantificándose un total de  $114 \pm 3$  cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$ .

Las trayectorias celulares en presencia de glucosa fueron similares a cuando la bacteria detectó las nanopartículas en solución (figuras IV.5C, F, I), caracterizándose también por un alto número de cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$ ,  $78 \pm 18$ . En este caso, la velocidad celular también fue mayor, con un alto número de picos de aceleración superiores a  $60 \mu\text{m s}^{-1}$ , concretamente,  $76 \pm 3$  picos de aceleración en comparación a los  $18 \pm 0,3$  picos cuantificados en ausencia de compuesto (control).

La movilidad bacteriana en presencia de las nanopartículas se correspondía con las trayectorias celulares seguidas por una bacteria en cuando detecta un repelente en el medio. La alta frecuencia de cambios de dirección, marcada por un alto número de cambios superiores a  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$  fue observada por primera vez por otros autores que atribuyeron este tipo de movimiento a una respuesta de repelencia (Oosawa y Imae, 1983). En presencia de glucosa, además del número alto de cambios de dirección, la bacteria presentó una velocidad elevada, por lo que la glucosa indujo una respuesta de hipermovilidad que será comentada más adelante (véase epígrafe IV.4.1.3).



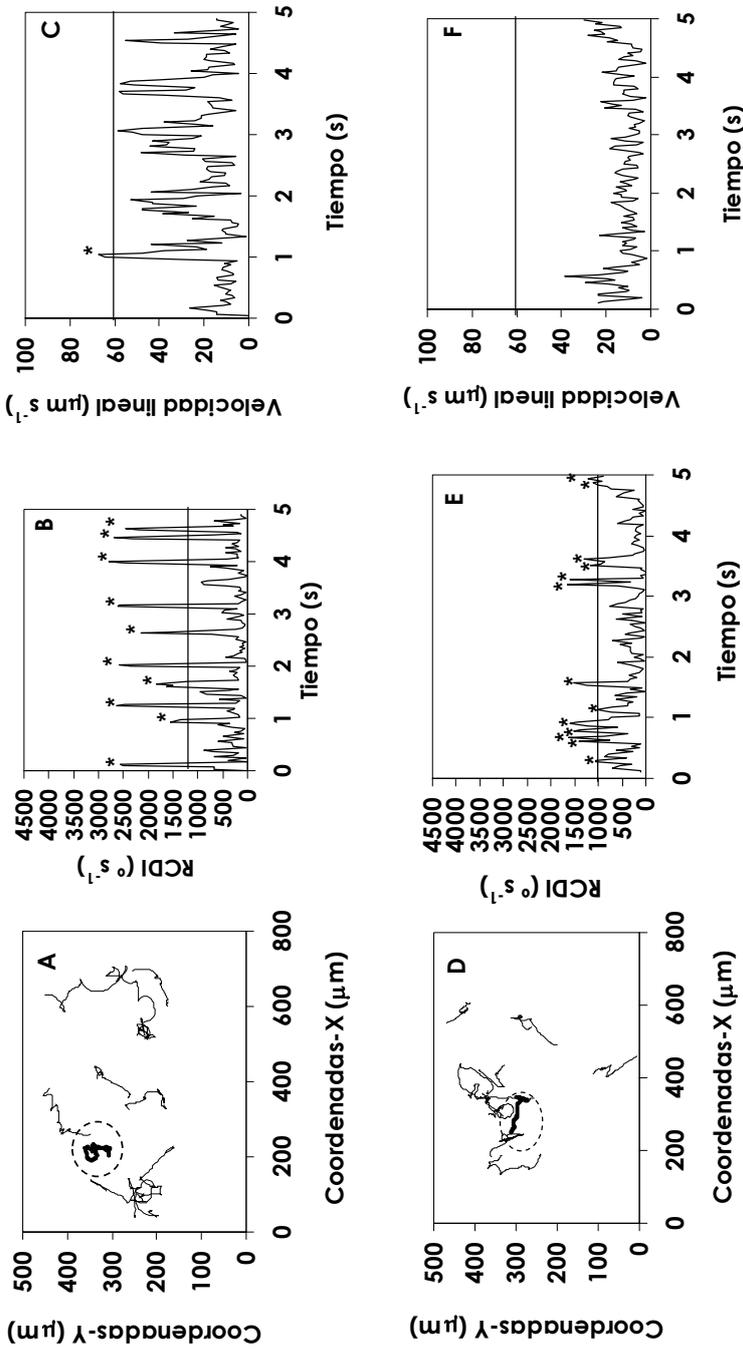
**Figura IV.5** Análisis de la movilidad celular de *P. putida* G7 en ausencia (A, B, C) y presencia de nanopartículas de plata (NPsAg) a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  (B, E, F) y glucosa a  $10 \text{ mM}$  (C, F, I). En A, B y C, se muestran 10 trayectorias celulares del vídeo como representación del patrón de movilidad celular. La tasa de cambios de dirección (D-F) y la velocidad lineal (G-I) con respecto al tiempo que duró el vídeo se corresponden con las trayectorias celulares rodeadas del círculo punteado en las figuras A-C. Las líneas horizontales representan los valores umbrales de detección de los cambios de dirección superiores a  $1000 \text{ }^\circ\text{s}^{-1}$  (D-F) y los picos de aceleración mayores de  $60 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$  (G-I). Los cambios de dirección y picos de aceleración por encima del umbral se representan con asteriscos

#### IV.3.2.2 Patrón de movilidad del mutante 184

La selección del mutante 184 también se basó, como en el caso anterior, en su peculiar patrón de movimiento que, en este caso, fue similar al exhibido por la estirpe G7 en presencia de un repelente. Cuando se visualizó el movimiento del mutante 184 en el microscopio óptico se distinguió un patrón de movilidad celular característico de la respuesta de repelencia, con la peculiaridad de una alta frecuencia de giros sobre el mismo eje celular y trayectorias en zig-zag para los tramos en línea recta.

El diagrama de movimiento reflejado mediante las trayectorias celulares del mutante 184 en ausencia de compuesto puede observarse en las figuras IV.6B,E,H en comparación con el diagrama de movilidad de la estirpe silvestre en ausencia (figuras IV.6A, D, G) y presencia de NPsAg (figuras IV.6C, F, I) como ejemplo de repelente para *P.putida* G7. El análisis cuantitativo de la movilidad del mutante 184 detectó un alto número de cambios de dirección,  $97 \pm 13$ , parecido al obtenido para el caso de la exposición a NPsAg,  $114 \pm 3$ , lo que lo caracterizó al mutante 184 como deficiente en mantener trayectorias rectilíneas durante un prolongado periodo de tiempo.

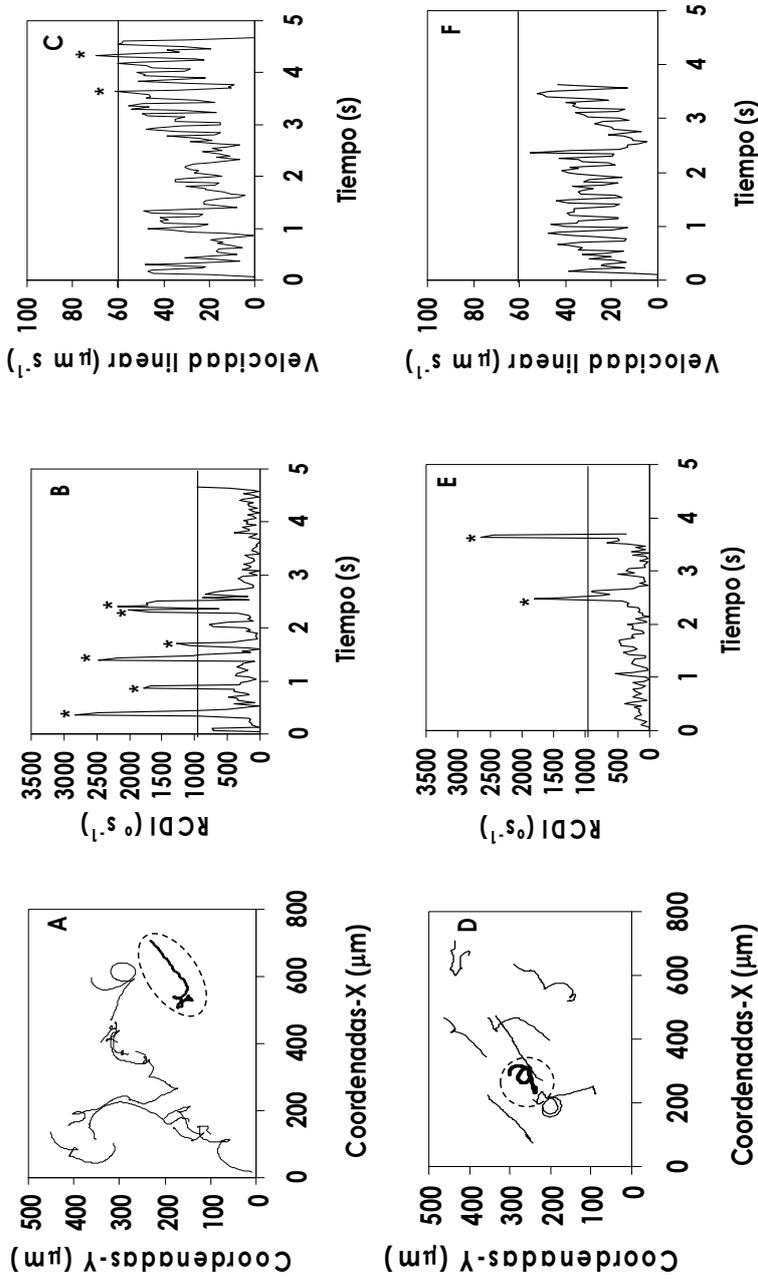
La intermitencia en la representación gráfica de la velocidad lineal del mutante 184 pudo reflejar el patrón de trayectoria en zig-zag característico durante el recorrido en línea recta.



**Figura IV.6** Diagrama de las trayectorias de movilidad del mutante 184 en ausencia de compuesto (A, B, C), en comparación con la movilidad de la estirpe silvestre P. putida G7 en presencia de NP5Ag como ejemplo de repelente (D, E, F). Tasa de cambios de dirección (B y E) y velocidad (C y F) de las trayectorias celulares rodeadas del círculo punteado en las figuras A y D. Las líneas horizontales representan los valores umbrales de detección de los cambios de dirección superiores a  $1000 \text{ }^\circ \text{s}^{-1}$  (B y E) y los picos de aceleración mayores de  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  (C y F). Los cambios de dirección y picos de aceleración se representan con asteriscos

### IV.3.2.3 Patrón de movilidad en la fase exponencial

Como ya comentamos en el epígrafe IV.2.3, la elongación celular en la fase exponencial es mayor que en fase estacionaria, que fue el momento en que se seleccionó el cultivo para hacer los experimentos. Además de la forma más alargada, el patrón de movilidad en la fase exponencial (figuras IV.7A, B, C) difirió del ya descrito (en ausencia de compuesto) (figuras IV.7D, E, F) para la estirpe silvestre G7 en fase estacionaria. Las diferencias en los diagramas de movilidad de las trayectorias celulares radican en el mayor número de cambios de dirección en fase exponencial,  $91 \pm 27$ , en comparación con la fase estacionaria donde se cuantificaron  $51 \pm 0,7$  cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$ . El patrón de movilidad seguido por *Pseudomonas putida* G7 en fase exponencial fue parecido al descrito de hipermovilidad en presencia de glucosa. Y de hecho, podrían atribuirse las mismas razones para explicar el comportamiento móvil de la bacteria en la fase exponencial. Durante este momento del ciclo, los nutrientes son muy abundantes en el medio, por lo que el efecto disipador de energía podría explicar el exceso de movilidad, marcado por una alta frecuencia de cambios de dirección y una alta velocidad, para liberar el exceso de energía por el aporte, en exceso, de nutrientes en el medio.

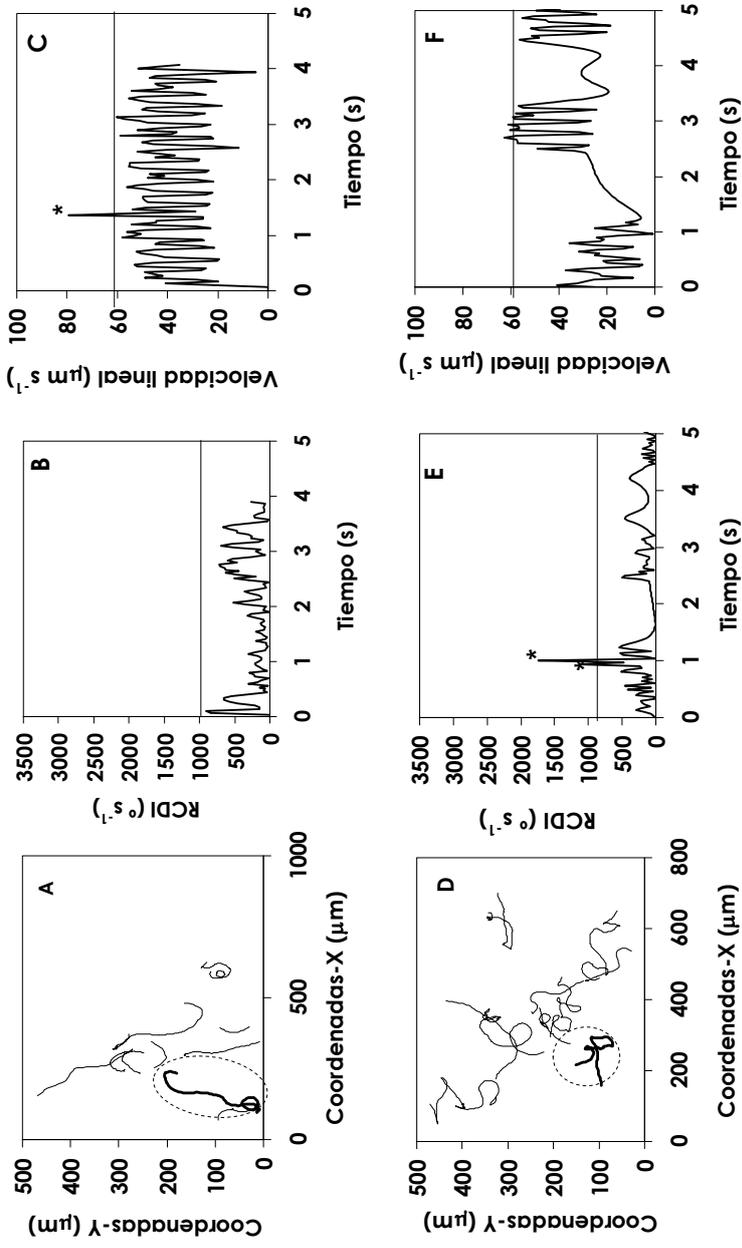


**Figura IV.7** Diagrama de las trayectorias de movilidad de la estirpe *P. putida* G7 en fase exponencial (A, B, C) y fase estacionaria (D, E, F). Tasa de cambios de dirección y velocidad de la trayectoria celular rodeada de la línea punteada en A y D. Las líneas horizontales representan los valores umbrales de detección de los cambios de dirección superiores a  $1000 \text{ }^\circ\text{s}^{-1}$  (D-E) y los picos de aceleración mayores de  $60 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$  (G-I). Los cambios de dirección y picos de aceleración se representan con asteriscos

### IV.3.3 INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA SOBRE EL PATRÓN DE MOVILIDAD

En presencia de un atrayente en el medio, como por ejemplo el salicilato, la estirpe *P. putida* G7 siguió trayectorias rectilíneas o curvas mantenidas sin cambios de dirección (figura IV.8A, D, G). Este patrón de movilidad se mantuvo de forma parecida en el caso de los exudados a alta concentración de carbono (figura IV.8B, E, F), mientras que en presencia de AH a alta concentración, las trayectorias celulares no siguieron el patrón típico de movimiento en presencia de un atrayente (figura IV.8D, H, L). La movilidad bacteriana en presencia del fertilizante oleofílico, a alta y baja concentración de carbono fue similar al patrón de movilidad intrínseca seguida por *P. putida* G7 en ausencia del fertilizante, por lo que tampoco pudo caracterizarse como un efector táctico positivo para la bacteria (datos gráficos no mostrados).

La respuesta táctica positiva descrita por el patrón de movilidad en presencia de exudados se confirmó por la baja frecuencia de cambios de dirección de las trayectorias celulares tanto a alta, como a baja concentración, cuantificándose un total de  $16 \pm 7,1$  y  $13 \pm 0,1$  cambios de dirección mayores de  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. En cambio, el número de cambios de dirección en presencia de AH a alta concentración,  $44 \pm 3,8$ , no fue significativamente diferente al cuantificado en ausencia de compuesto,  $51 \pm 0,7$ , no pudiéndose confirmar la respuesta de atracción hacia los AH.



**Figura IV.8** Análisis de la movilidad celular de *P. putida* G7 en presencia de exudados vegetales a  $129 \text{ mg L}^{-1}$  (A, B, C) y ácidos húmicos a  $138 \text{ mg L}^{-1}$  (D, E, F). En A y B, se muestran 10 trayectorias celulares del vídeo como representación del patrón de movilidad celular. La tasa de cambios de dirección (B y E) y la velocidad lineal (C y F) con respecto al tiempo que duró el vídeo se corresponden con las trayectorias celulares rodeadas del círculo punteado en las figuras A y B. Las líneas horizontales representan los valores umbrales de detección de los cambios de dirección superiores a  $1000 \text{ }^\circ\text{s}^{-1}$  (B y E) y los picos de aceleración mayores de  $60 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$  (C y F). Los cambios de dirección y picos de aceleración se representan con asteriscos

#### IV.3.4 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PATRONES DE MOVILIDAD

El análisis cuantitativo de la velocidad lineal y la tasa de cambios de dirección (RCDI) consistió en el sumatorio del número de picos de velocidad con valores superiores a  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  de las diez trayectorias analizadas en cada vídeo (por duplicado) y para cada tratamiento. Se cuantificó, además, el sumatorio del número de cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{s}^{-1}$ . En la tabla IV.3 se recogen, de forma comparativa, los datos para cada caso anteriormente explicado.

El número de cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{s}^{-1}$  en presencia de exudados fue significativamente menor que en el control, cuantificándose en este último caso un total de  $51 \pm 0,7$  cambios. Los cambios que se dieron en el caso de los exudados a  $129 \text{ mg L}^{-1}$  y a  $16 \text{ mg L}^{-1}$ , reflejaron un patrón de movilidad parecido al que se da en presencia de un atrayente, lo que confirmó los resultados obtenidos en el ensayo capilar. Por su parte, el número total de cambios de dirección cuantificados en presencia de los AH a  $138 \text{ mg L}^{-1}$  no fue significativamente diferente al número de cambios observados en ausencia de compuesto, por lo que la respuesta táctica hacia la alta concentración de AH no se pudo confirmar por el análisis de sus trayectorias celulares. Del mismo modo, los cambios de dirección superiores a  $1000^\circ \text{s}^{-1}$  cuantificados bajo la influencia de los AH a  $16 \text{ mg L}^{-1}$ , no fueron significativamente diferentes a los cambios cuantificados en el control en ausencia de compuesto. Tampoco fueron diferentes los cambios observados en presencia del fertilizante a  $123$  y  $13 \text{ mg L}^{-1}$ .

Resultados

**Tabla IV.3** Inventario de los análisis cuantitativos de la movilidad celular realizados en función del número de cambios de dirección mayores de  $1000^\circ \text{ s}^{-1}$  y número de picos de aceleraciones mayores de  $60 \mu\text{m s}^{-1}$ , bajo la influencia de distintos efectores químicos dependiendo de la fase del ciclo celular en que se encuentre la estirpe bacteriana

ESTIRPE	FASE DE CRECIMIENTO	MOVILIDAD	TRATAMIENTO	NÚMERO DE CAMBIOS DE DIRECCIÓN	NÚMERO DE PICOS DE ACCELERACIÓN
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Intrínseca	Control (MM)	$51 \pm 0,7$	$18 \pm 0,3$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Movimiento suave (taxis positiva)	Salicilato 10mM	0	$20 \pm 4$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Movimiento suave (taxis positiva)	Exudados $129 \text{ mg L}^{-1}$	$16 \pm 7,1$	$19 \pm 0,7$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Movimiento suave (taxis positiva)	Exudados $16 \text{ mg L}^{-1}$	$13 \pm 0,1$	$29 \pm 13$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Movimiento suave (taxis positiva)	AH $138 \text{ mg L}^{-1}$	$44 \pm 3,8$	$19 \pm 0,1$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Intínseca	AH $16 \text{ mg L}^{-1}$	$40 \pm 14$	$10 \pm 4$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Intínseca	S-200 $123 \text{ mg L}^{-1}$	$46 \pm 2,1$	$33 \pm 0,7$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Intínseca	S-200 $13 \text{ mg L}^{-1}$	$54 \pm 17$	$16 \pm 9$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Movimiento abrupto (taxis negativa)	NPsAg $0,2 \text{ mg L}^{-1}$	$114 \pm 3$	$9 \pm 3$
<i>P. putida</i> G7	Estacionaria	Movimiento abrupto (hipermovilidad)	Glucosa 10mM	$78 \pm 18$	$76 \pm 3$
<i>P. putida</i> G7	Exponencial	Movimiento abrupto	MM	$91 \pm 27$	$32 \pm 7$
Mutante 184	Estacionaria	Movimiento abrupto	MM	$97 \pm 13$	$40 \pm 2,8$
Mutante 55	Estacionaria	Movimiento suave	MM	$19 \pm 5,7$	$16 \pm 0,7$

La baja frecuencia de cambios de dirección de la mutante 55 fue significativamente menor al número de cambios detectados para la movilidad intrínseca de la estirpe silvestre en ausencia de compuesto, por lo que podemos concluir que se trata de un mutante "smooth" deficiente en cambiar la dirección en sus trayectorias celulares.

El movimiento abrupto, caracterizado por la alta frecuencia de cambios de dirección, se confirmó para la respuesta táctica negativa observada frente a NPsAg en el ensayo capilar de repelencia, ya que el número de cambios de dirección con respecto al control fue significativamente mayor. Así, pues, la respuesta de hipermovilidad fue comprobada para el caso de la glucosa, donde se confirmó que el número de aceleraciones mayores de  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  fue significativamente mayor respecto al control.

Para el caso del mutante 184, las diferencias entre el número de cambios de dirección fueron también significativas con respecto a la silvestre (control), confirmándose, con ello, que se trata de una mutante deficiente en seguir trayectorias rectilíneas mantenidas sin cambios de dirección.

La movilidad de la estirpe en fase temprana exponencial reflejó unas trayectorias abruptas, marcadas por un número alto de cambios de dirección, siendo significativamente diferente a los cambios cuantificados en fase temprana estacionara en ausencia de efector táctico (control). El número de picos de aceleración detectado, también superior al del control, verificó la hiperactividad observada en fase exponencial donde abunda la cantidad de nutrientes.

La velocidad celular de la estirpe *P. putida* G7 en presencia del fertilizante a  $123 \text{ mg L}^{-1}$  fue más alta que en ausencia de compuesto, dado que el número de picos de aceleración cuantificados fue significativamente mayores al observado en ausencia del fertilizante. La explicación a este aumento de velocidad podría encontrarse en que el fertilizante supone una fuente adicional de los nutrientes N y P, que provocarían el mismo efecto disipador de energía comentado en el caso de la glucosa, aunque en menor grado. Además, se ha comprobado el efecto fertilizante oleofílico en la interfase NAPL-agua proporcionando los nutrientes necesarios para que las bacterias degraden con mayor facilidad los contaminantes inmersos en el NAPL (del inglés, Non-Aqueous Phase Liquids)

(Tejeda Agredano y col., 2011). Lo cual indica que el fertilizante proporciona energía para el desarrollo de la actividad microbiana.

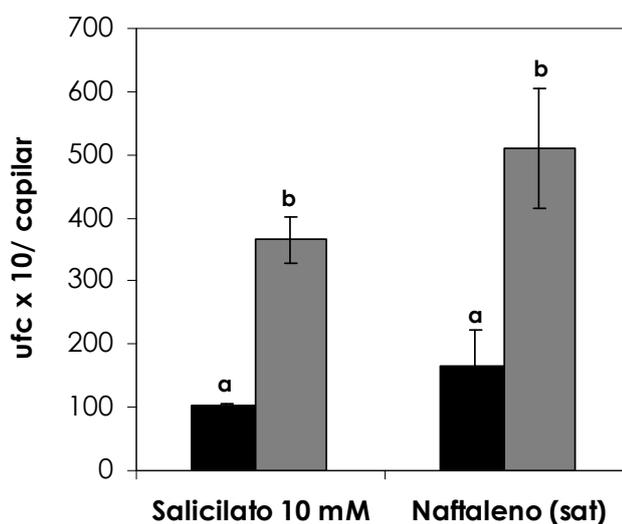
A su vez, el mutante 184, caracterizado por la alta frecuencia de cambios de dirección en sus trayectorias celulares, presentó un número de aceleraciones mayores que en la silvestre, lo cual hace que difiera aún más del patrón de movilidad intrínseco de la silvestre, *P. putida* G7 (control). Por lo que, el empleo de este mutante en los ensayos de transporte, ayudará a entender el papel del comportamiento móvil bacteriano en el transporte y adhesión a materiales porosos. Así como el mutante 55, cuyo patrón de movilidad es el contrapuesto al del 184.

#### IV.4 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TÁCTICA

##### IV.4.1 RESPUESTA TÁCTICA DETECTADA POR ENSAYO CAPILAR

###### IV.4.1.1 Respuesta táctica positiva

La respuesta de atracción manifestada en presencia de salicilato como un movimiento suave sin cambios de dirección en las trayectorias celulares se confirmó con el ensayo capilar. El número de células que entró en los capilares que contenían una disolución de salicilato (10mM) fue mayor que en ausencia de compuesto (sólo MM dentro del capilar), tal como se observa en la figura IV.9. El número de unidades formadoras de colonias (ufc) fue mayor también para el caso de la solución saturada de naftaleno.

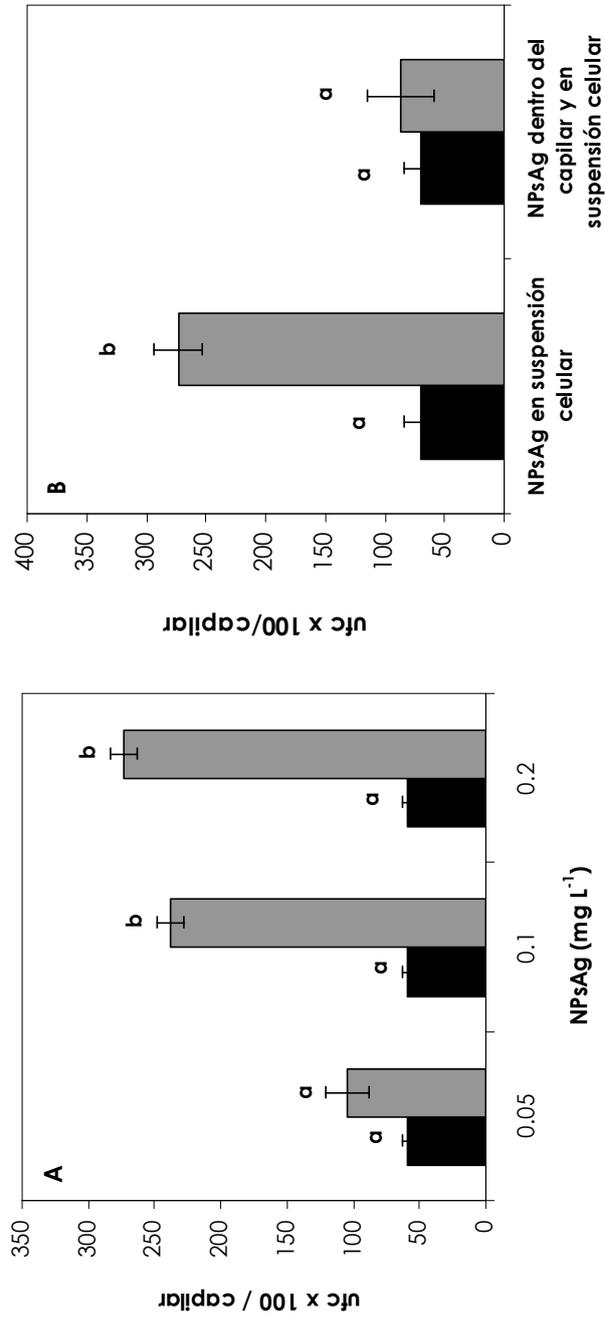


**Figura IV.9** Respuesta táctica positiva de *Pseudomonas putida* G7 frente a salicilato 10mM y naftaleno (disolución saturada en MM) (barras grises) en comparación con el control en ausencia de NPAg (barras negras) Las diferencias fueron significativas ( $P=0.01$ ) para las barras marcadas con letra distinta

#### **IV.4.1.2 Respuesta táctica negativa**

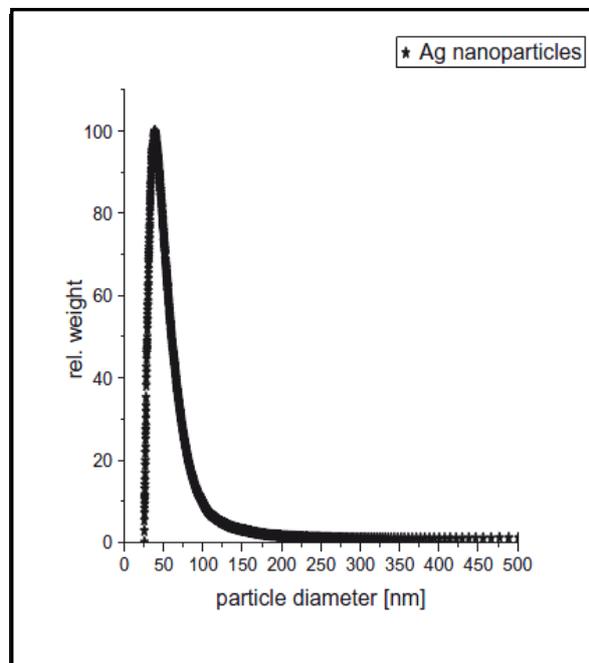
El efecto de repelencia causado por las nanopartículas (NPsAg) fue evidente, en los ensayos capilares, en un intervalo estrecho de concentración, que comprendió desde  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ . Ello indicó que la respuesta de taxis negativa era muy sensible a la concentración del compuesto. El número de células que entró en los capilares repelidas por las NPsAg en suspensión fue mayor que en ausencia de las nanopartículas (figura IV.10A). La respuesta táctica negativa o de repelencia es más sensible que la de atracción y resulta más difícil de visualizar y reproducir. Esto es porque la respuesta de repelencia frente a un determinado compuesto puede ser apreciable sólo a unas concentraciones determinadas. De hecho, no se observó taxis negativa a concentraciones de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e incluso, a la máxima concentración ensayada de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , el número de células que entró dentro de los capilares fue menor que en el control en ausencia de NPsAg, lo cual puede explicarse por la disminución de la viabilidad celular a esa concentración.

Con la finalidad de evaluar si la respuesta táctica negativa observada en presencia de nanopartículas de plata podría atribuirse a otros efectos sobre la movilidad celular, se realizó otro experimento en el que las nanopartículas ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) se colocaron tanto en contacto con la suspensión celular como dentro del capilar. Los resultados (fig. IV.10B) indicaron que la respuesta de repelencia no ocurría en presencia de nanomateriales a ambos lados de la cámara de quimiotaxis, no habiendo diferencias significativas en el número de células que entraron dentro del capilar con respecto al control ( $P = 0.01$ ).

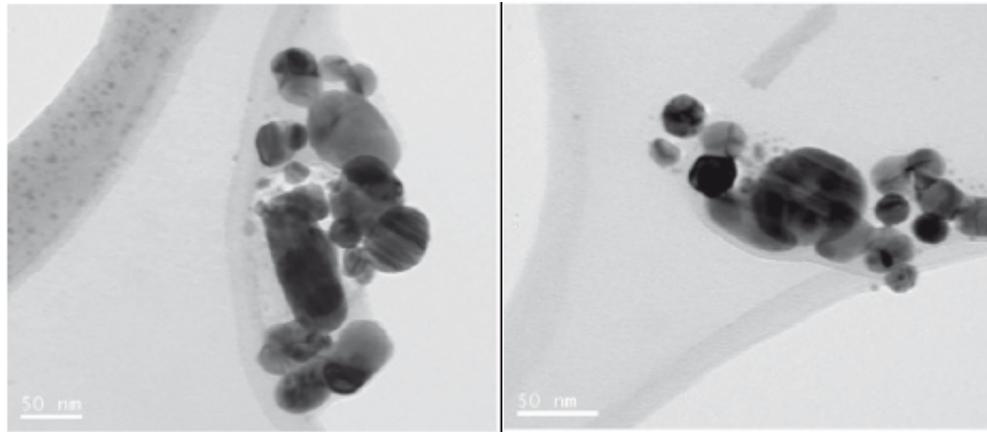


**Figura IV.10** En A, respuesta táctica negativa de *Pseudomonas putida* G7 frente a nanopartículas de plata verificada por la mayor entrada de células en capilares huyendo de las NP<sub>s</sub>Ag en solución (barras grises) en comparación con el control en ausencia de NP<sub>s</sub>Ag (barras negras). En B, inhibición de la respuesta táctica negativa de *Pseudomonas putida* G7 frente a nanopartículas de plata (0.2 mgL<sup>-1</sup>) presentes a ambos lados de la cámara quimiotáctica (dentro del capilar y en la suspensión bacteriana). Las diferencias fueron significativas (P=0.01) para las barras marcadas con letra distinta

En colaboración con el grupo del Dr. Thompson de la Universidad de Oxford se caracterizó la superficie de las nanopartículas. El área superficial específica, determinada mediante la teoría BET por el método de adsorción de nitrógeno, fue de  $7,92 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . La distribución del tamaño de partícula estimada mediante una centrífuga de disco CPS confirmó la escasa agregación de las NPSAg, dada la la riqueza en partículas de pequeño tamaño (figura IV.11). Las imágenes de las NPSAg obtenidas mediante el microscopio electrónico de transmisión apoyaron los resultados obtenidos para la distribución de partícula (figura IV.12).



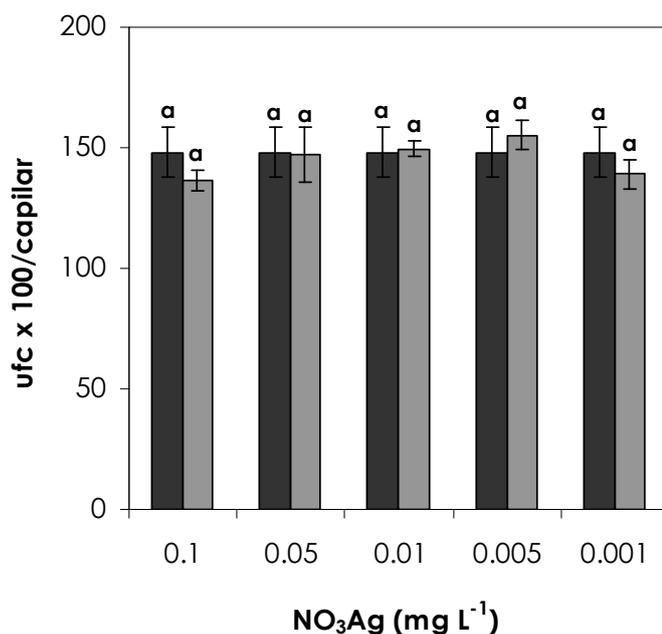
**Figura IV.11** Distribución del tamaño de nanopartículas de plata (NPSAg)



**Figura IV.12** Micrografías al microscopio electrónico de transmisión del tamaño de las nanopartículas de plata (NPsAg)

Se estudió la respuesta táctica negativa hacia distintas concentraciones de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  para determinar si la repelencia observada frente a NPsAg se debía a la presencia de los iones de plata que son liberados al medio por las NPsAg, o si se debe a la detección directa de las nanopartículas. Para ello, se utilizó un barrido de concentraciones de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  en MM por debajo y por encima de las utilizadas para el caso de las NPsAg. La respuesta táctica de repelencia no se observó a ninguna de las concentraciones utilizadas (figura IV.13).

Como comentamos anteriormente, a la concentración de NPsAg de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  se observó una menor viabilidad celular, lo que podría ser debido a la toxicidad de los iones  $\text{Ag}^+$  en solución. Recientemente se ha comprobado que el mecanismo antimicrobiano de las NPsAg se debe a la acción tóxica de los iones plata que se liberan de forma lenta y eficaz en las proximidades de la membrana celular (Xiu y col., 2012). De ahí que se justifique el uso de la plata como agente biocida en su estado nano y no en forma iónica, ya que el umbral de toxicidad es mucho más bajo para el último caso.



**Figura IV.13** Ausencia de respuesta táctica negativa de *Pseudomonas putida* G7 frente a NO<sub>3</sub>Ag. La misma letra encima de las barras indica que no existieron diferencias significativas ( $P=0,01$ ) entre el control en ausencia de NO<sub>3</sub>Ag (barras negras) y las distintas concentraciones del compuesto (barras grises).

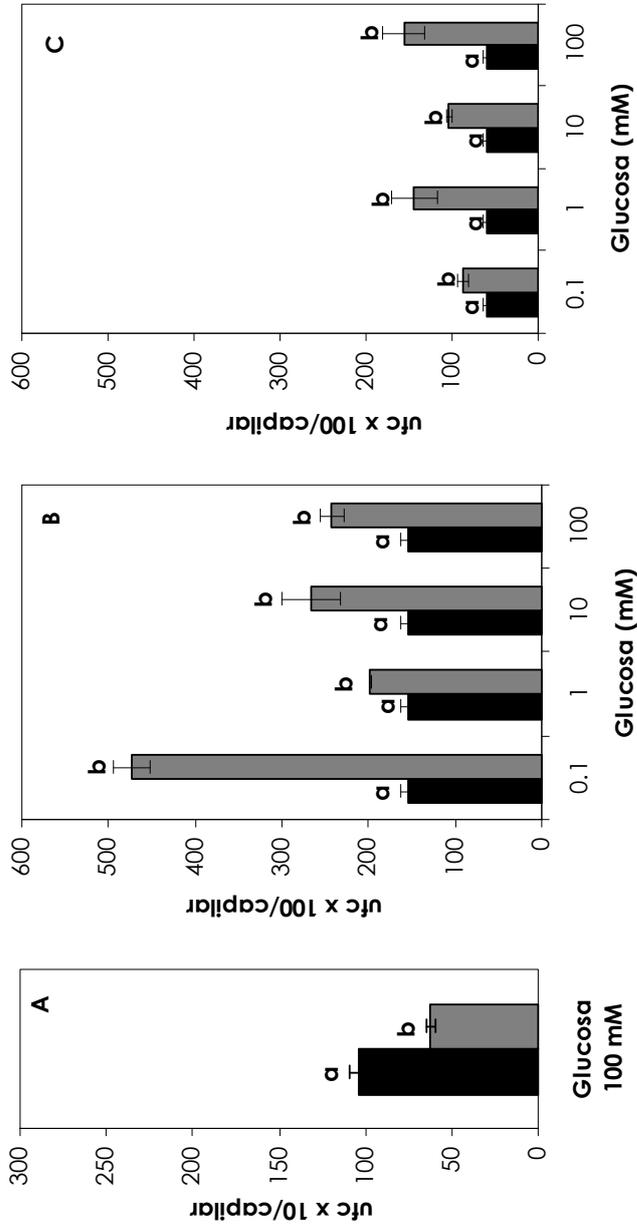
En nuestro estudio, a concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>, las NPsAg no resultaron ser tóxicas para *Pseudomonas putida* G7, pero sí lo fue el NO<sub>3</sub>Ag a esa misma concentración (figura IV.13) e incluso a la concentración de 0.1 mg L<sup>-1</sup>.

Por lo que podríamos decir que la repelencia a NPsAg supone una estrategia evolutiva de aviso hacia un posible efecto tóxico a concentraciones superiores del compuesto repelente, ya que además de ser sensible a concentraciones muy bajas del compuesto, la respuesta de repelencia se manifiesta como un mecanismo directo de las NPsAg en solución que no requiere de la liberación de los iones plata (que sí es necesaria para ejercer su acción bactericida).

#### IV.4.1.3 Hipermovilidad causada por la glucosa

Los resultados del experimento capilar del ensayo de atracción (figura IV.14A), sugirieron que la glucosa podría tratarse de un repelente, ya que el número de células que entraron dentro de los capilares que contenían glucosa era significativamente menor que en el control ( $P = 0.01$ ). Por lo que se llevó a cabo un ensayo capilar de repelencia para confirmar el papel de la respuesta táctica de la glucosa en *P. putida* G7. La entrada de células en los capilares huyendo del compuesto en solución fue mayor que en su ausencia (fig. IV.14B), siendo las diferencias estadísticamente significativas para  $P = 0.01$ .

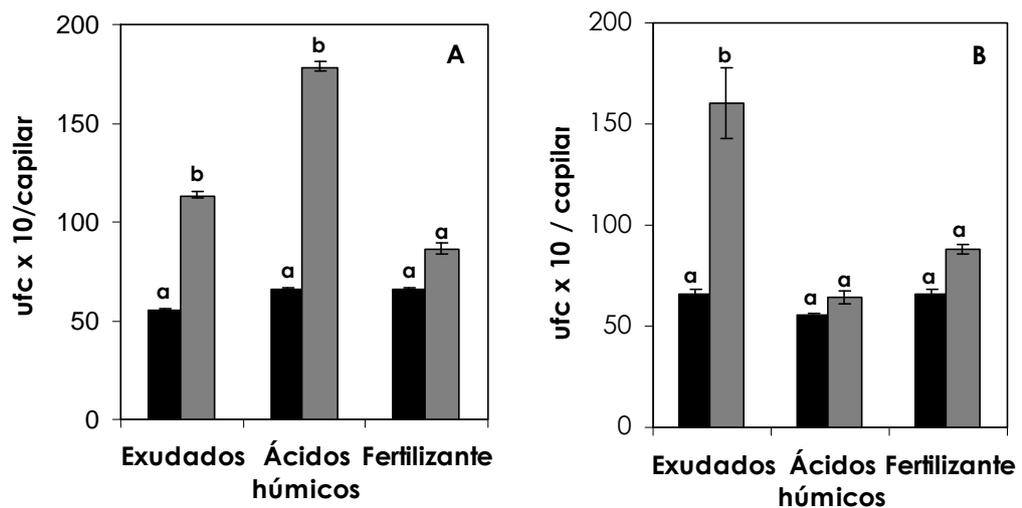
En presencia de glucosa, las células bacterianas presentaron una movilidad acelerada. De hecho, la mayor entrada bacteriana en los capilares durante los ensayos de repelencia puede también atribuirse a hipermovilidad, puesto que siguió siendo evidente cuando la glucosa se colocó dentro y fuera de los capilares (fig. IV.14C). Cabe destacar que, en este caso, el número de células en el interior de los capilares fue menor que cuando la glucosa sólo se encontraba en contacto con la suspensión bacteriana (figura fig. IV.14B), lo que puede ser debido a que, una vez dentro del capilar, las bacterias vuelven a detectar la glucosa, y la alta movilidad les conduce a salir de nuevo hacia la suspensión celular. Tal como ocurre en el ensayo capilar de atracción, las células tienen tendencia a salir de los capilares que contenían glucosa debido a una mayor dispersión celular en presencia de una fuente rica de carbono (Banitz y col., 2011). Se comprobó el crecimiento de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en presencia de glucosa a concentración de 5mM, caracterizado por una tasa de duplicación de 15 h ( $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ ) por lo que la mayor entrada celular en presencia de glucosa no pudo deberse a la proliferación celular utilizando glucosa como fuente de carbono.



**Figura IV.14** Ausencia de respuesta tática positiva de la estirpe *P. putida* G7 frente a glucosa 100 mM determinada mediante ensayo capilar de atracción (A). Ensayo capilar de repelencia frente a glucosa a distintas concentraciones. El número de células dentro de los capilares fue mayor cuando la glucosa estaba en la suspensión bacteriana (barras grises) en comparación con el control (barras negras) (B). Ausencia de repelencia confirmada por la mayor entrada de células en los capilares que contenían glucosa dentro y fuera junto con la suspensión celular (C). Las letras diferentes indican que las diferencias son significativas para  $P = 0.01$ . Cambiar epigrafe

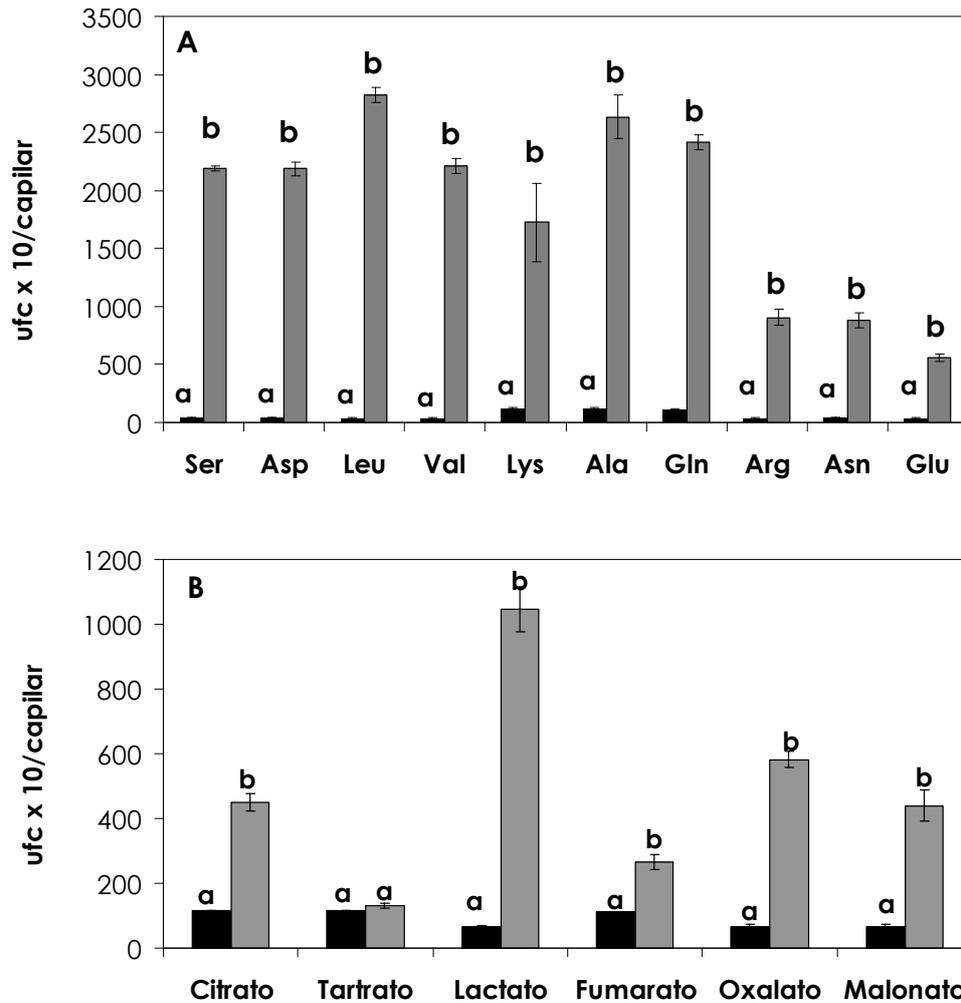
#### IV.4.1.4 Efecto de la materia orgánica disuelta en la respuesta táctica

Los exudados de raíces de girasol provocaron una mayor entrada celular en los capilares que los contenían, evidenciando una atracción quimiotáctica por parte de la estirpe *Pseudomonas putida* G7, tanto a alta concentración de carbono,  $129 \pm 3,5$  mg L<sup>-1</sup> (figura IV.15A), como a baja concentración,  $16 \pm 0,1$  mg L<sup>-1</sup> (figura IV.15B), siendo las diferencias significativas con respecto al control para  $P=0.01$ . En el caso de los ácidos húmicos, la respuesta de atracción fue evidente para la concentración alta de carbono,  $138 \pm 7,8$  mg L<sup>-1</sup> (figura IV.15A), pero no lo fue a la concentración baja,  $16 \pm 1,3$  mg L<sup>-1</sup> (figura IV.15B), donde el número de unidades formadoras de colonias (ufc) no fue significativamente diferente al número de colonias en el caso del control ( $P=0.01$ ). La estirpe *P. putida* G7 no respondió tácticamente al fertilizante oleofílico a ambas concentraciones ( $123$  y  $13$  mg L<sup>-1</sup>) (figuras IV.15A y 15B), sin existir diferencias significativas respecto al control ( $P=0.01$ ).



**Figura IV.15** Respuesta quimiotáctica de atracción (barras grises) de *Pseudomonas putida* G7 frente a diferentes fuentes de materia orgánica disuelta a alto (A) y bajo contenido en carbono orgánico (B) frente al control sin quimiofactor (barras negras). Las barras marcadas con la misma letra indican que no existieron diferencias significativas con respecto al control, mientras que una letra diferente muestra que las diferencias fueron significativas para  $P=0.01$

La respuesta táctica positiva en presencia de exudados de girasol se confirmó mediante ensayos capilares de atracción con los componentes individuales comúnmente presentes en los exudados vegetales, esto es, aminoácidos (figura IV.16A) y ácidos orgánicos (figura IV.16B) a una concentración de 100mM.

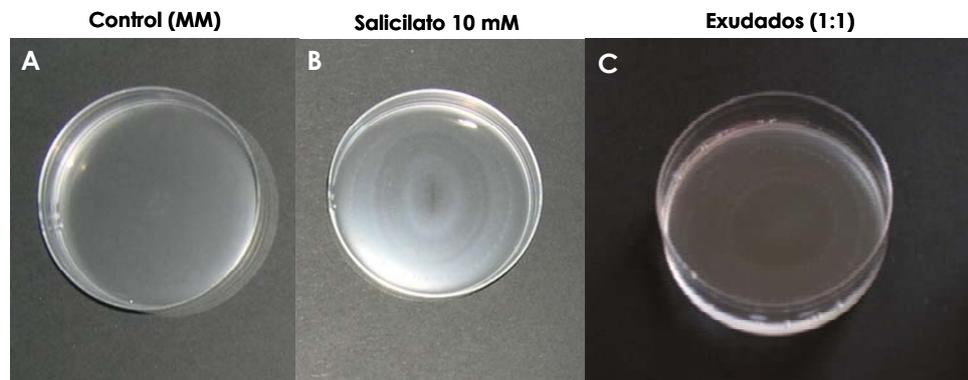


**Figura IV.16** Respuesta quimiotáctica de atracción de *Pseudomonas putida* G7 frente a aminoácidos (A) y ácidos orgánicos (B) presentes en los exudados vegetales

La respuesta de atracción frente a los aminoácidos fue muy alta y, en el caso de la leucina, se cuantificaron casi 30.000 ufc por capilar (figura IV.16A). Seguramente, los aminoácidos juegan un papel importante en la respuesta táctica positiva hacia exudados, pudiendo ser mayor la probabilidad de detección de los mismos por la existencia de varios receptores en la membrana celular bacteriana que reconozcan la variedad de aminoácidos presentes en los exudados. La respuesta táctica hacia los ácidos orgánicos también fue positiva (figura IV.16B), excepto para el tartrato, donde las diferencias con el control no fueron significativas ( $P=0.01$ ).

#### IV.4.2 RESPUESTA TÁCTICA EN MEDIO SEMISÓLIDO

La quimiotaxis bacteriana frente a exudados fue corroborada por la presencia de turbidez alrededor del centro de la placa de Petri, donde se había colocado el compuesto. Al tratarse de una sustancia viscosa, la hidroxipropilmetilcelulosa permitió el avance de las células bacterianas siguiendo el gradiente de concentración de exudados, pudiendo visualizar la formación de un anillo de turbidez alrededor del centro de la placa donde se colocó el compuesto (fig. IV.17).



**Figura IV. 17** Respuesta táctica positiva frente a exudados de raíces de girasol diluidos en MM (1:1) (C), en comparación con la ausencia de anillo de turbidez en el control sin compuesto (A) y la presencia del anillo en respuesta positiva hacia el salicilato a 10mM (B)

La quimiotaxis positiva hacia el fertilizante oleofílico no pudo ensayarse mediante este método, ya que al tratarse de una microemulsión, cuando se añadía al medio viscoso en el centro de la placa, difundía en toda su extensión, no quedando restringido en el centro. La respuesta de atracción observada para AH no fue evidente tampoco con este método, aunque cabe destacar que se emplearon los AH de origen artificial a una concentración en MM de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . La glucosa y NPsAg no se ensayaron, puesto que el método es válido sólo para observación de una respuesta táctica positiva.

## **IV.5 INFLUENCIA DEL PATRÓN DE MOVILIDAD EN LA ADHESIÓN BACTERIANA**

### **IV.5.1 ADHESIÓN A ARENA**

Los ensayos de adhesión confirmaron que el patrón de movilidad afectó a la adhesión bacteriana sobre la superficie de arena. Y, por ende, el efecto sobre la deposición podría afectar el transporte bacteriano. Bajo condiciones que favorezcan la intercepción por el colector, como es la alta frecuencia de cambios de dirección, la adhesión a la arena sería presumiblemente mayor. Cada momento de cambio de dirección supone la posibilidad de interacción con la superficie de arena. Las trayectorias rectilíneas o curvas mantenidas con una baja frecuencia de cambios de dirección no favorecerían, en cambio, la adhesión sobre superficies sólidas.

En la tabla IV.4 se recogen los datos de adhesión bacteriana a la arena de la estirpe silvestre en distintas fases del ciclo celular en presencia de distintos compuestos, así como la adhesión de las mutantes 184 y 55.

La adhesión bacteriana en fase exponencial fue mayor, tal como esperábamos por el patrón de movimiento seguido por la bacteria en esta fase (alto grado de cambios de dirección). Cabe destacar que la longitud celular en esta fase fue también mayor, lo cual podría haber sido que contribuyera a un aumento de la deposición bacteriana en las columnas, tal como se ha descrito anteriormente en la literatura (Weiss y col., 1995).

En cuanto a la fase de latencia, donde la movilidad era bastante reducida comparada a la dada en fase estacionaria, la adhesión fue menor que en el control, pero aún fue alta.

Con el empleo de mutantes, hemos comprobado que el patrón de movilidad seguido por la bacteria juega un papel en la adhesión bacteriana a la arena. Las trayectorias celulares seguidas por el mutante 184 (alta frecuencia de cambios de dirección), aumentaron la probabilidad de interacción con la superficie de arena, y con ello, el grado de adhesión fue mayor. En el caso del mutante 55 (de movimiento suave), la adhesión no fue significativamente menor que la de la silvestre, por lo que su patrón de movilidad sería susceptible de ser modificado con el empleo de quimioefectores que provoquen una mayor o menor adhesión sobre superficies sólidas.

Resultados

**Tabla IV.4** Porcentaje de adhesión de diferentes estirpes en función de la fase del ciclo celular y bajo la influencia de distintos efectores tácticos

ESTIRPE	FASE DE CRECIMIENTO	TRATAMIENTO	MOVILIDAD	NÚMERO DE CAMBIOS DE DIRECCIÓN (>1000° S <sup>-1</sup> )	% ADHESIÓN
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	Control (MM)	Intrínseca	51 ± 0,7	37,9 ± 1,7
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	Salicilato 10mM	Movimiento suave (taxis positiva)	0	7,8 ± 1,1
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	Exudados 129 mg L <sup>-1</sup>	Movimiento suave (taxis positiva)	16 ± 7,1	13,1 ± 0,9
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	Exudados 16 mg L <sup>-1</sup>	Movimiento suave (taxis positiva)	13 ± 0,1	8,61 ± 0,6
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	AH 138 mg L <sup>-1</sup>	Intrínseca	44 ± 3,8	7,08 ± 0,4
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	AH 16 mg L <sup>-1</sup>	Intrínseca	40 ± 14	35,8 ± 9
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	S-200 123 mg L <sup>-1</sup>	Intrínseca	46 ± 2,1	8,2 ± 0,5
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	S-200 13 mg L <sup>-1</sup>	Intrínseca	54 ± 17	40,2 ± 0,6
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	NPsAg 0.2mgL <sup>-1</sup>	Movimiento abrupto (taxis negativa)	114 ± 3	57,6 ± 4,4
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Estacionaria	Glucosa 10mM	Movimiento abrupto (hipermovilidad)	78 ± 18	54,9 ± 2,1
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Exponencial	MM	Movimiento abrupto	91 ± 27	43,9 ± 0,4
<i>Pseudomonas putida</i> G7	Latencia	MM	Movilidad casi nula	NA	33,4 ± 0,1
Mutante 184	Estacionaria	MM	Movimiento abrupto	97 ± 13	43,3 ± 1,6
Mutante 55	Estacionaria	MM	Movimiento suave	19 ± 5,7	39,9 ± 2,7
<i>Pseudomonas putida</i> G7	NA	Sonicación (MM)	Inmovilidad	NA	8,18 ± 1,8
<i>Pseudomonas putida</i> G7	NA	HgCl <sub>2</sub>	Bacteria muerta	NA	9,28 ± 4,6

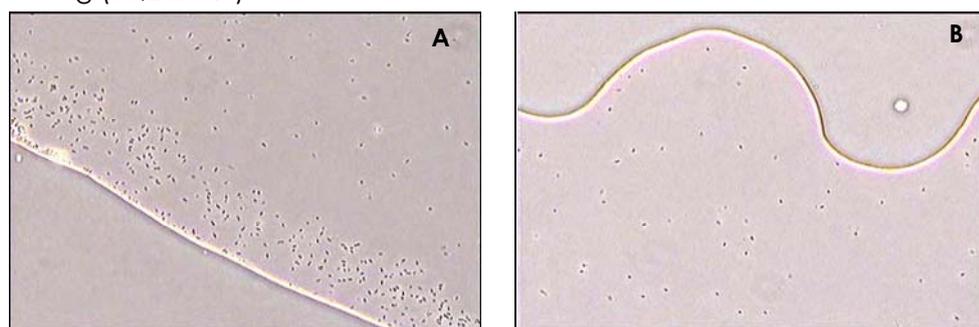
#### IV.5.2 ADHESIÓN A LAS ANILLAS DE SILICONA

El patrón de movilidad en presencia de un atrayente como los exudados de raíces de girasol a concentración de  $16 \text{ mg L}^{-1}$ , provocó que la adhesión sobre la superficie de la anilla de silicona fuese menor,  $30,6 \pm 3 \%$  frente a  $45,7 \pm 0,2 \%$  de adhesión de la bacteria en ausencia de compuesto (diferencias significativas para  $P=0,05$ ). Aunque, en este caso, la adhesión no fue tan baja como en la arena. Esto puede deberse a la capacidad adherente de la silicona, que ha sido evidenciada en otros estudios (Smith y col., 2012). La movilidad seguida por la estirpe *P. putida* G7 en presencia de las nanopartículas a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  provocó una mayor adhesión en la superficie de anilla,  $55,5 \pm 1,8 \%$  en comparación a la que se dio en ausencia de compuesto,  $45,7 \pm 0,2 \%$  (diferencias significativas par  $P=0,05$ ).

#### IV.5.3 ADHESIÓN A LA INTERFASE NAPL-AGUA

El patrón de movilidad en presencia de una disolución de NPsAg a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  hizo que las bacterias que se acercaron a la interfase DEHP-agua permanecieran adheridas, creando una película de células justo en la interfase, tal como se observa en la figura IV. 2A. En ausencia de nanopartículas de plata en la fase acuosa, las células no permanecieron asociadas a la interfase (figura IV.2B).

La tendencia a adherirse al NAPL, en este caso, al DEHP, fue comprobada por la medida de la  $DO_{600}$  según el método BATH, que determinó el % de células adheridas a la interfase en ausencia ( $3,2 \pm 0,7 \%$ ) y presencia de NPsAg ( $36,2 \pm 0 \%$ ).



**Figura IV.18** Adhesión bacteriana a la interfase DEHP-agua en presencia (A) y ausencia de NPsAg a concentración de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$

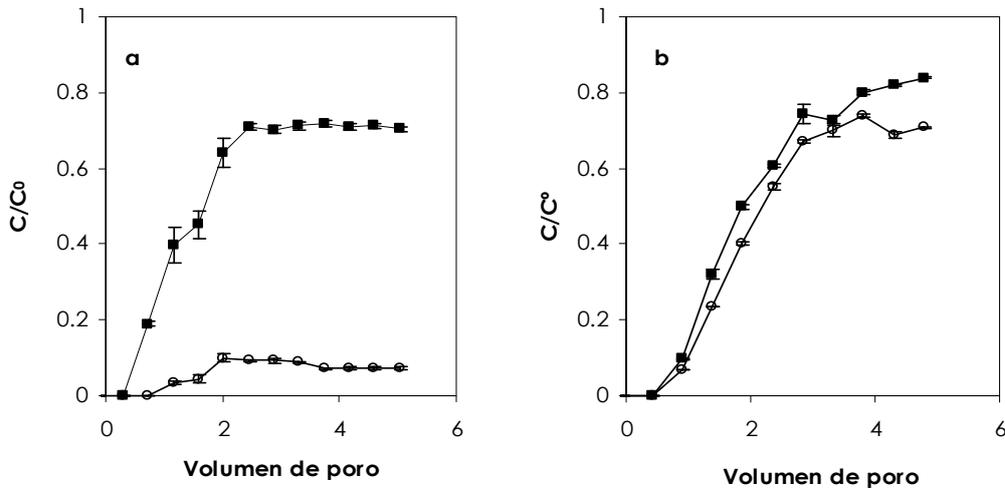
## IV.6 TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS

### IV.6.1 FACTORES INDEPENDIENTES DE LA MOVILIDAD QUE AFECTAN AL TRANSPORTE

#### IV.6.1.1. Efecto de la fuerza iónica

Según la teoría DLVO, al bajar la fuerza iónica del medio, aumenta el espesor de la doble capa eléctrica y, con ello, la repulsión electrostática. De esta manera, cuando el medio de mineralización que se utilizó para resuspender el cultivo celular, estuvo diez veces diluido, la deposición bacteriana en las columnas fue menor y, con ello, fue apreciable un aumento del transporte bacteriano (figura IV.19a).

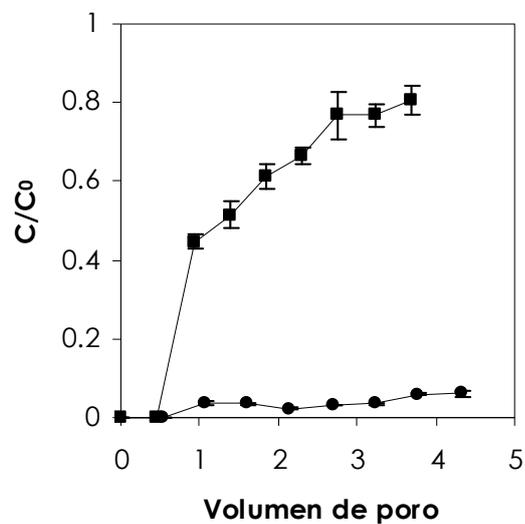
En condiciones de baja fuerza iónica, la eficacia de la salida bacteriana fue similar en presencia o ausencia de naftaleno (figura IV.19b). Se deduce que el efecto promotor del transporte por parte del quimioefector positivo naftaleno fue menos pronunciado a una menor fuerza iónica. Aún así, la quimiotaxis a naftaleno provocó que la curva de rotura estuviera por encima del control (en ausencia de compuesto).



**Figura IV.19** En a, efecto de la bajada de la fuerza iónica (■) en el transporte bacteriano de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 comparado con el control (○). En la figura b, la presencia de naftaleno (■) no provocó un aumento del transporte significativamente mayor que en su ausencia (○)

#### IV.6.1.2 Efecto del tamaño del colector

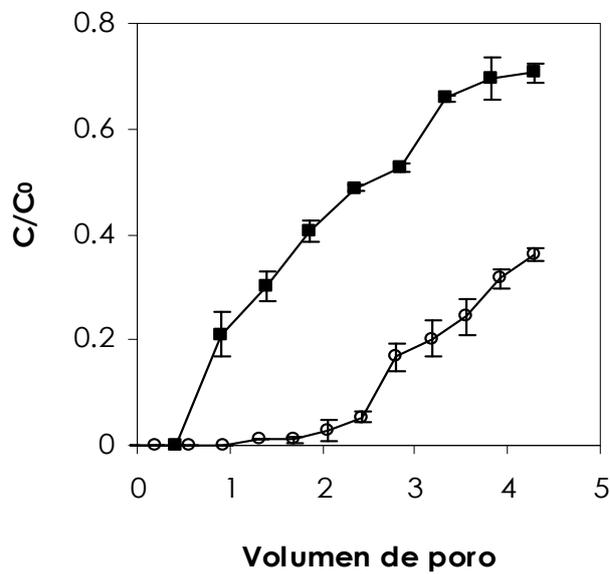
Al utilizar partículas de arena con un mayor diámetro, hubo un incremento del volumen de poro de 2,677 a 3,265 mL, lo que condujo a un aumento del transporte bacteriano (figura IV.20). La superficie específica de las partículas de arena fue menor, siendo la probabilidad de intercepción de las bacterias con la superficie de arena también más baja. El mayor aumento del espacio interparticulado permitió mayor libertad de movimiento favoreciendo la elución bacteriana a través de las columnas.



**Figura IV.20** Transporte bacteriano de la estirpe *P. putida* G7 en columnas empaquetadas con arena de grano fino de diámetro 0,4-0,25 mm (●) en comparación con aquellas preparadas con arena de grano más grueso de diámetro 0,4-0,5 mm (■)

#### IV.6.1.3 Efecto de la velocidad de flujo

Cuando la velocidad del flujo se redujo de 23 rpm a 11,5 rpm, la retención bacteriana en las columnas empaquetadas con arena fina fue mayor que a la velocidad de flujo habitual (figura IV.21). El tiempo de residencia en las columnas fue mayor, facilitando la intercepción de las células bacterianas con el colector. Los resultados de otro estudio se asemejan a los nuestros, donde se puso de manifiesto que a mayor tiempo de residencia, mayor adhesión al colector (Liu y col., 2011).



**Figura IV.21** Transporte bacteriano a una velocidad de flujo de 11,5 rpm en columnas empaquetadas con arena de grano fino en presencia (■) y ausencia (○) de salicilato 10mM.

La salida del frente bacteriano se produjo a partir de 2 VP, indicando la influencia del factor de bloqueo en las columnas. Al aumentar la probabilidad de que las bacterias interaccionen con el colector, la superficie cubierta por células evitó que las bacterias que se acercaron posteriormente a la superficie, se adhirieran, siendo transportadas a lo largo de las columnas.

A una velocidad de flujo menor, la movilidad bacteriana se ve favorecida y aumentada por la reducción en las interacciones hidrodinámicas (Kerchov y Elimelech, 2008). En condiciones no favorables para la retención (como en el caso de la fuerza iónica) la salida del frente bacteriano se dio a 1 VP, coincidiendo con la mitad del valor máximo de  $C/C_0$ . Mientras que al disminuir la velocidad de flujo, el valor de  $C/C_0$  a 1 VP no coincidió con la mitad del valor máximo observado, lo que indicó que hubo una pequeña retención bacteriana gradual.

A medida que se fue bombeando la suspensión celular, una parte de las células se fueron reteniendo, ya que la disminución en la velocidad de flujo favoreció la adhesión bacteriana al aumentar el tiempo de residencia en las columnas, lo que fomentó la adhesión bacteriana a la arena, y el bloqueo del colector.

#### **IV.6.2 PAPEL DE LA MOVILIDAD INTRÍNSECA EN EL TRANSPORTE**

##### **IV.6.2.1 Saturación del colector por alta densidad de células con movilidad intrínseca**

El transporte bacteriano de células móviles presentó una curva de rotura con un valor de eficiencia de la salida bacteriana menor del 10 %. Lo que indicó que la movilidad intrínseca de la bacteria favoreció la adhesión bacteriana sobre la superficie de la arena (figura IV.22). A partir de 4 volúmenes de poro se observó un aumento de la salida bacteriana, que se debió al bloqueo del colector. Hasta ese momento, la adhesión bacteriana había sido de manera gradual, y una vez que la superficie de arena estuvo cubierta de células, las siguientes que llegaron a las columnas fueron transportadas a través de las mismas, ya que no podían adherirse a la superficie.

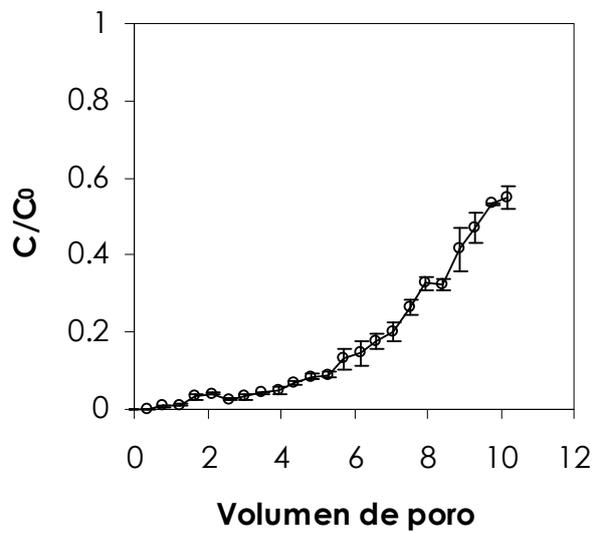


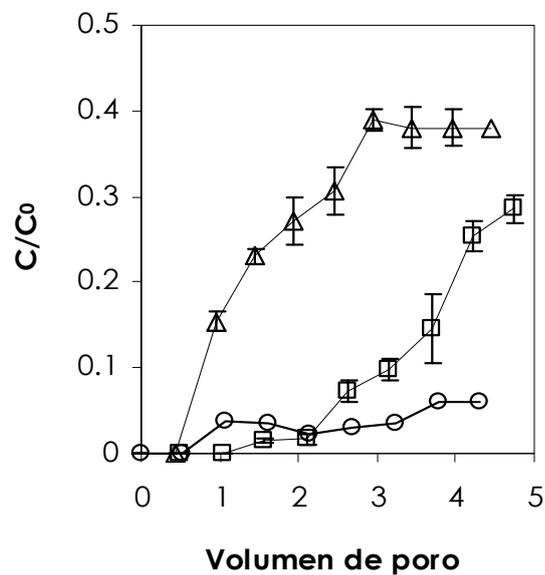
Figura IV.22 Transporte bacteriano de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 (en fase estacionaria temprana) en columnas empaquetadas con arena de grano fino (0,25-0,4 mm) bombeadas a un flujo de 23 rpm

En este caso, el colector se fue cubriendo de células de manera gradual, por lo que no hubo repelencia entre las bacterias ya adheridas a la arena y las que se aproximaban a la superficie. La salida bacteriana a través de las columnas comenzó a aumentar a partir de 4 volúmenes de poro, siendo el valor máximo de la eficacia de salida celular de aproximadamente el 60 %. La superficie cubierta por células evitó la interacción posterior de otras bacterias que se aproximaban al colector.

El resultado de este tratamiento, es decir, el transporte bacteriano de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 (en fase estacionaria temprana) en columnas empaquetadas con arena de grano fino (0,25-0,4 mm) y bombeadas a un flujo de 23 rpm, es el caso que consideraremos como control. En los experimentos posteriores, se explicarán diferentes curvas de rotura que atenderán a distintos patrones de movilidad bacteriana (entre otros parámetros fisiológicos), que serán comparadas con la curva de rotura obtenida para el control.

#### IV.6.2.2 Fases del ciclo celular bacteriano

El movimiento celular intrínseco puede verse afectado según la fase del ciclo en que se encuentre la célula bacteriana. En la fase estacionaria temprana todas las células eran móviles siguiendo trayectorias rectilíneas con cambios de dirección en su movimiento. Durante esta fase, las bacterias presentaron una alta movilidad que se manifestó por la competitividad que existía por el consumo de los escasos nutrientes que quedaban en el medio. Bajo estas condiciones, la intercepción de las bacterias con el colector fue muy alta y la mayoría de las células (90%) quedaron retenidas en las columnas (figuras IV.22 y IV.23).



**Figura IV.23** Transporte bacteriano en fase estacionaria (○) en comparación con el transporte en fase exponencial (□) y en fase de latencia (Δ)

En la fase de latencia la movilidad fue muy reducida y el aumento del transporte se hizo evidente con la salida del frente bacteriano a partir de 1 volumen de poro, coincidiendo con la mitad del valor máximo de  $C/C_0$ . Este dato indicó que no hubo retención bacteriana en las columnas de arena (tabla IV.5). La escasa movilidad celular hizo que la probabilidad de intercepción de las células con el colector no estuviese favorecida por la movilidad aleatoria, y las bacterias fueron transportadas como meros coloides a la velocidad de flujo determinada por la bomba peristáltica (23 rpm). La eficacia de la salida bacteriana fue cercana a 0.5, lo que indicó que prácticamente la mitad de las bacterias quedaron retenidas en las columnas y la otra mitad se transportaron desde 1 VP, siendo indicativo de una baja intercepción por el colector.

**Tabla IV.5** Influencia de la fase del ciclo celular en la movilidad y transporte bacteriano a través de medios porosos saturados

Fase del ciclo celular	Análisis de movilidad		Transporte y deposición <sup>a</sup>	
	RCDI <sup>b,c</sup>	Velocidad <sup>c,d</sup>	$C/C_0$ <sup>e</sup>	VP <sup>f</sup>
Temprana exponencial	91 ± 27	32 ± 7	0,04 (0,29)	1,10 (4,49)
Temprana estacionaria	51 ± 0,7	18 ± 0,3	0,04 (0,08)	1,10 (4,86)
Fase de latencia	NA <sup>g</sup>	NA <sup>g</sup>	0,23 (0,38)	1,44 (4,45)

<sup>a</sup>Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>b</sup>RCDI, sumatorio del número de cambios de dirección superiores a 1000 ° s<sup>-1</sup>. <sup>c</sup>Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>d</sup> Velocidad, sumatorio de los picos de aceleraciones mayores de 60 μm s<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>  $C/C_0$ , eficiencia de la salida bacteriana a través de las columnas. <sup>f</sup> VP, volumen de poro. <sup>g</sup> NA, no aplicable

El transporte de las células bacterianas en fase exponencial tardía fue mayor a partir de 2 volúmenes de poro. Esta curva de rotura fue parecida a la obtenida para el caso de un flujo bajo (11,5 rpm). La movilidad bacteriana en fase exponencial tardía presentó una frecuencia de cambios de dirección superior a la exhibida en fase estacionaria temprana (tabla IV. 4). Por lo que se relacionó el mayor número de cambios de dirección, con el aumento de la adhesión a la superficie de arena. Cada cambio de dirección le ofreció a la bacteria la oportunidad de interactuar con el colector. Cabe destacar que la longitud celular en la fase exponencial tardía fue mayor que en la fase estacionaria (véase tabla IV.2), lo que pudo contribuir a que se depositara en mayor grado. Según algunos autores, una mayor longitud celular se relaciona con una mayor adhesión bacteria sobre superficies (Gannon y col., 1991; Weiss y col., 1995)

#### **IV.6.2.3 Inmovilización celular**

El aumento de transporte observado en condiciones de reducida movilidad, como es el caso del cultivo en fase de latencia, fue atribuido a la menor probabilidad de interactuar con el colector, razón que fue corroborada cuando la célula bacteriana era inmóvil.

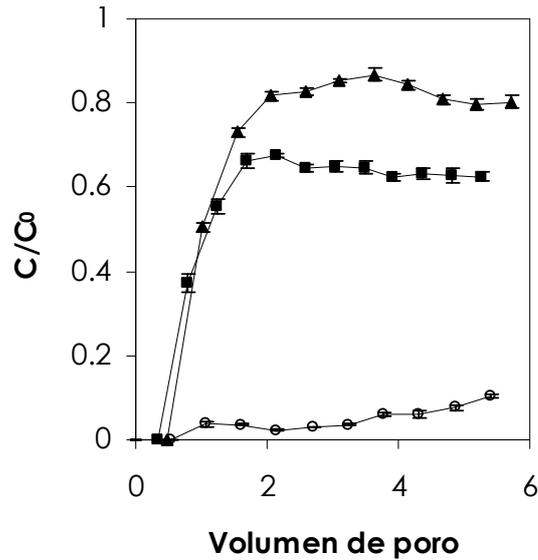
La inmovilidad se indujo por varias causas: inactivación del movimiento por efecto de la sonicación o de un aumento de la temperatura y muerte celular provocada por los biocidas nitrato de plata y cloruro de mercurio.

#### **IV.6.2.3a Inactivación del movimiento**

El transporte bacteriano de células inmóviles fue mayor que cuando la bacteria era móvil debido a que la deposición en la superficie de arena fue menor por la inexistencia de cambios de dirección en sus trayectorias (figura IV.24).

La salida del frente bacteriano se produjo aproximadamente a 1 VP, coincidiendo, además, con un valor de  $C/C_0$  de 0,55 y 0,5 para el transporte de células sonicadas y sometidas a un choque térmico a 45°C, respectivamente.

La forma de las curvas de rotura indicó que la retención no fue alta y que la mayoría de las células se movilizaron hasta el final de las columnas. El 80% de las células sometidas a 45° se recogió en el efluente de las columnas. Mientras que en caso de las células sonicadas, la recuperación celular fue del 60 % aproximadamente.



**Figura IV.24** Transporte de células bacterianas inmóviles debido al efecto de un choque térmico a 45 °C (▲) y de la sonicación (■) en comparación con el transporte de las bacterias móviles en fase estacionaria, condiciones fijadas como control (○)

Las células bacterianas se transportaron como coloides en suspensión. Esta observación fue descrita con anterioridad por otros autores (Camper y col., 1993). En dichos estudios se puso de manifiesto que la movilidad intrínseca favorecía la intercepción con las superficies sólidas.

Se ha comprobado que la viabilidad celular no se vio alterada por los cambios inducidos en la conformidad de los componentes de la pared celular bacteriana por el efecto causado por la sonicación o el efecto de la temperatura de 45° (tabla IV. 6). El número de unidades formadoras de colonias (ufc) obtenido del conteo de viables en placas de TSA no difirió

del control en los tratamientos de temperatura y sonicación llevados a cabo (diferencias no significativas para  $P=0.01$ ).

**Tabla IV.6** Efecto de la sonicación y choque térmico sobre la viabilidad y propiedades de la superficie celular de *Pseudomonas putida* G7 en fase estacionaria que pueden afectar al transporte bacteriano

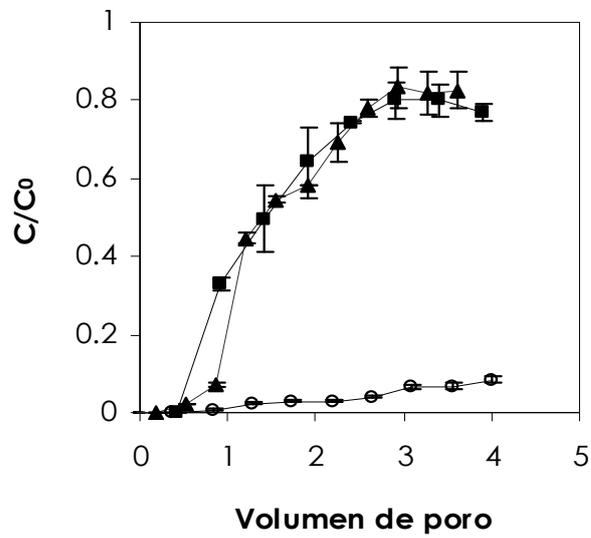
	Viabilidad <sup>a</sup> celular	Superficie celular <sup>a</sup>		Transporte bacteriano <sup>b</sup>	
	UFC x mL <sup>-1</sup>	$\theta_w$ <sup>c</sup>	$\zeta$ <sup>d</sup>	C/C <sub>0</sub> <sup>e</sup>	VP <sup>f</sup>
Control	2,44 x 10 <sup>8</sup> ± 23,9	47,1 ± 6,2	-34,1 ± 3,4	0,04 (0,08)	1,10 (4,86)
Sonicación <sup>g</sup>	2,64 x 10 <sup>8</sup> ± 59,2	69 ± 9	-30,9 ± 2,1	0,55 (0,63)	1,24 (4,82)
Choque térmico <sup>h</sup>	2,36 x 10 <sup>8</sup> ± 39,8	ND <sup>i</sup>	ND <sup>i</sup>	0,50 (0,80)	1,02 (4,67)

<sup>a</sup> Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>b</sup> Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>c</sup>,  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>d</sup>  $\zeta$ , Potencial zeta. <sup>e</sup> C/C<sub>0</sub>, eficacia de salida bacteriana. <sup>f</sup> VP, volumen de poro. <sup>g</sup> El cultivo bacteriano resuspendido en MM se sonicó durante 2 horas en frío para evitar el aumento de temperatura durante en proceso. <sup>h</sup> Para estudiar el efecto de la temperatura, el cultivo celular resuspendido en MM, se dejó a 45 ° en un baño de agua durante 2 horas. <sup>i</sup> ND, no determinando.

La mayor hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana determinada tras la sonicación, no fue motivo para aumentar la deposición bacteriana esperada en la superficie hidrofílica que supone la arena. Por el contrario, el transporte bacteriano fue alto llegando a ser la eficacia de la salida bacteriana casi del 70 %. El cambio en la hidrofobicidad pudo ser debido a la reorganización de los componentes de la membrana celular que se produjo al ser escindido el flagelo, provocando que los componentes hidrofílicos quedasen expuestos al interior y los hidrofóbicos, al exterior.

#### IV.6.2.3b Inducción de muerte celular

Como era de esperar bajo condiciones de inactivación celular, la ausencia de movilidad provocó una menor deposición en las columnas que se tradujo en un aumento del transporte bacteriano a partir de 1 volumen de poro. Ambos biocidas provocaron el mismo efecto en las columnas empaquetadas de arena (figura IV.25), indicando una baja retención bacteriana. Lo cual se manifestó con la salida del frente bacteriano a aproximadamente 1 VP, con valores de  $C/C_0$  de 0,44 y 0,5 para el tratamiento con  $HgCl_2$  y  $NO_3Ag$ , respectivamente.



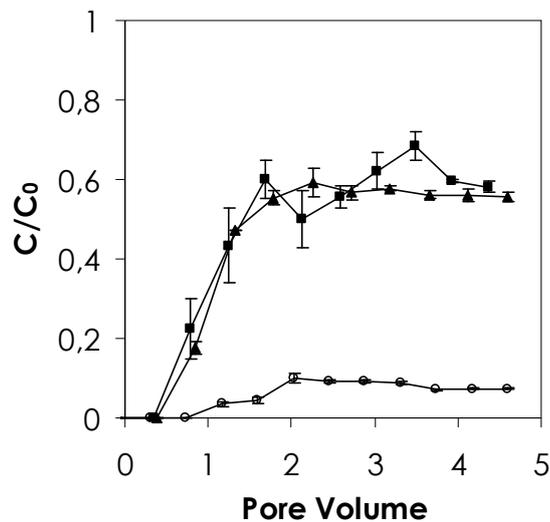
**Figura IV.25** Transporte de células muertas por el efecto biocidas nitrato de plata  $1\text{mgL}^{-1}$  (■) y  $HgCl_2$   $1.32\text{mgL}^{-1}$  (▲) en comparación con el control, células vivas en fase estacionaria (○).

La ausencia de movilidad se comprobó visualmente al microscopio óptico y la viabilidad celular se determinó por conteo de viables en placas de TSA. A la concentración de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  y  $1,32 \text{ mgL}^{-1}$  para  $\text{NO}_3\text{Ag}$  y  $\text{HgCl}_2$ , respectivamente, no se observó colonia alguna que creciera en las placas. De esta manera se confirmó la eficacia biocida de los compuestos a esas concentraciones escogidas.

#### IV.6.3 INFLUENCIA DEL PATRÓN DE MOVILIDAD INDUCIDO

##### IV.6.3.1 Promoción del transporte en presencia de quimioefectores positivos

El movimiento rectilíneo mantenido sin cambios abruptos en la dirección, en presencia de salicilato, favoreció el transporte bacteriano debido a que la probabilidad de interactuar con el colector se vio reducida en ausencia de cambios de dirección.



**Figura IV.26** Transporte bacteriano de la estirpe *P. putida* G7 en ausencia (control) (○) y presencia de salicilato a una concentración de 10 mM (■) y de cristales de naftaleno (▲) en las columnas

La salida del frente bacteriano se produjo a 1 VP coincidiendo con la mitad del valor máximo de la eficacia de salida bacteriana ( $C/C_0$ ), lo que indicó que la deposición fue baja y la mayoría de las células bacteriana pasaron a lo largo de las columnas (del 60 al 80 %). Esto es lo que ocurrió en presencia de los atrayentes salicilato sódico a concentración de 10 mM y naftaleno sólido colocado en forma de cristales en el extremo superior de la columna (figura IV.26). La baja probabilidad de interacción con la arena condujo a una escasa retención en las columnas, haciendo que el transporte bacteriano se observara ya desde 1 volumen de poro.

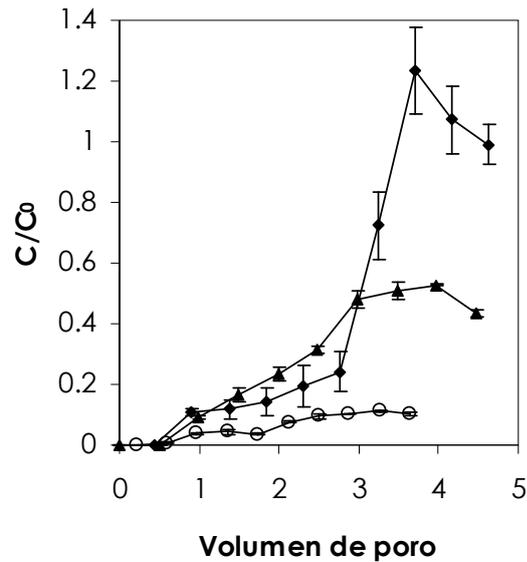
### **IV.6.3.2 Promoción del transporte debido al bloqueo del colector**

#### **IV.6.3.2.1 Efecto de las nanopartículas de plata (NPsAg)**

Las NPsAg promovieron el transporte bacteriano a la concentración de 0,2 mg L<sup>-1</sup>, pero la curva de rotura sugirió que la causa del aumento de transporte era diferente de la que explicaba el aumento de transporte bacteriano en presencia de un atrayente. En el caso de las NPsAg, el transporte bacteriano fue evidente a partir de 2 VP, coincidiendo con un valor de  $C/C_0$  de 0,31 (2,48 VP), siendo el transporte máximo a 3,97 VP, con un valor de  $C/C_0$  de 0,53 (figura IV.27).

La repelencia observada frente a NPsAg a 0,2 mg L<sup>-1</sup> pudo ser la causa del aumento de transporte, ya que la superficie celular bacteriana no se vio afectada en presencia del compuesto (tabla IV.7). Los cambios en la dirección de las trayectorias de las células, que pasaron a ser más abruptos y frecuentes en presencia de NPsAg, aumentaron la probabilidad de intercepción con la superficie de arena, ya que cada cambio en la dirección pudo ser aprovechado por la bacteria para adherirse a la superficie. Bajo estas condiciones, el bloqueo del colector se dio a un número de VP inferior a lo que ocurriría en ausencia de un repelente. El bloqueo del colector se dio a partir de 2 VP, mientras que en ausencia de repelente, se dio a partir de 4 VP cuando la superficie de arena comenzó a saturarse de bacterias (figura IV.22). En ausencia de NPsAg, el recubrimiento bacteriano de la superficie de arena fue de manera gradual, mientras que la alta probabilidad de intercepción por la superficie en presencia de NPsAg, hizo que el bloqueo fuera instantáneo,

provocando que las bacterias que se aproximaban a la superficie del colector, no pudieran interactuar con la arena, siendo repelidas por las que ya estaban adheridas, y provocando, con ello, un aumento del transporte bacteriano. La alta probabilidad de interactuar con el colector debido a la alta frecuencia de cambios de dirección provocó el bloqueo del colector con el consecuente aumento del transporte.



**Figura IV.27** Efecto directo de las nanopartículas de plata a  $0.2\text{mgL}^{-1}$  en el transporte bacteriano (▲) en comparación con el precondicionamiento de las columnas empaquetadas de arena con NPsAg a  $0.2\text{mgL}^{-1}$  (◆) y el control en ausencia de compuesto (○)

Cuando se bombeó la solución de NPsAg  $0,2\text{ mg L}^{-1}$  previamente a la suspensión bacteriana, el transporte bacteriano fue mucho mayor, observándose un pico máximo de salida bacteriana con un valor de  $C/C_0$  de 1,23 a 3,7 VP. Esto puede explicarse por la saturación del colector que conllevó, indirectamente, a un aumento del transporte bacteriano (donde además de intervenir el papel fisiológico de la respuesta de repelencia a

NPsAg, pudo intervenir el papel físico del impedimento de adhesión bacteriana por la pre-ocupación de la superficie de arena por parte de las nanopartículas).

El transporte bacteriano en presencia de NPsAg fue mayor una vez que las bacterias se habían adherido a la arena, dando lugar al fenómeno del bloqueo de filtro que provocó la salida bacteriana por repulsión entre las bacterias que se aproximaban al colector y las que estaban ya adheridas. Los valores entre paréntesis en la tabla IV.7 indicaron el aumento del transporte bacteriano a partir de 2 VP.

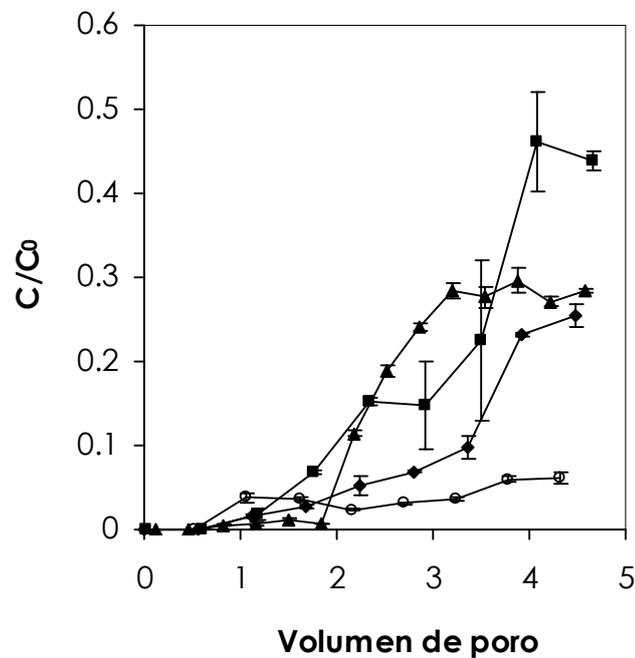
**Tabla IV.8** Efecto de las nanopartículas de plata (NPsAg) en el transporte bacteriano de *P. putida* a través de medios porosos saturados

Tratamiento	Análisis de movilidad RCDI <sup>b,c</sup>	Superficie celular		Transporte y deposición <sup>a</sup>	
		$\theta_w$ <sup>c,d</sup>	$\zeta$ <sup>c,e</sup>	C/C <sub>0</sub> <sup>f</sup>	VP <sup>g</sup>
<b>Control (MM)</b>	51 ± 0.7	47 ± 6	31 ± 2	0,04 (0,08)	1,10 (4,86)
<b>NPsAg 0,2mg L<sup>-1</sup> efecto directo</b>	114 ± 3	48 ± 5	32 ± 3	0,09 (0,53)	1,00 (3,97)
<b>NPsAg 0,2mg L<sup>-1</sup> pre-bombeadas</b>	81 ± 9 <sup>h</sup>	NA <sup>i</sup>	NA <sup>i</sup>	0,12 (1,23)	1,37 (3,70)

<sup>a</sup>Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>b</sup>RCDI, sumatorio del número de cambios de dirección superiores a 1000 ° s<sup>-1</sup>. <sup>c</sup>Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>d</sup>  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>e</sup>  $\zeta$ , Potencial zeta. <sup>f</sup> C/C<sub>0</sub>, eficiencia de la salida bacteriana a través de las columnas. <sup>g</sup> VP, volumen de poro. <sup>h</sup> El análisis de la movilidad se hizo del efluente bacteriano a la salida de las columnas. <sup>i</sup>, NA, no aplicable.

#### IV.6.3.2.2 Efecto de la glucosa

El bloqueo del colector y el consecuente aumento del transporte se observó también en presencia de glucosa a concentración de 10 mM (figura IV.28). Al no encontrarse diferencias significativas en cuanto a las propiedades de la superficie celular en presencia de glucosa (tabla IV.8), y debido a que el patrón de movilidad exhibido por las células se parecía al observado frente a un repelente, se atribuyó como efecto promotor del transporte, el patrón de movilidad bacteriano en presencia de glucosa que provocó una mayor adhesión bacteriana en las columnas, desencadenando la saturación del colector y el consecuente aumento del transporte.



**Figura IV.28** Perfil bacteriano del transporte de *P.putida* G7 en columnas empacadas con arena de grano fino en presencia de glucosa 0.1mM (▲), 10 mM (■) y 100 mM (◆) en comparación con el control en ausencia de compuesto (○)

Resultados

El aumento de transporte bacteriano también se observó a otras concentraciones de glucosa, por debajo y por encima de 10 mM, manifestándose como curvas de rotura parecidas para las distintas concentraciones. Esto es una prueba de la respuesta fisiológica (hipermovilidad) que supuso la presencia de glucosa para la estirpe *Pseudomonas putida* G7.

**Tabla IV.8** Efecto de glucosa a 10 mM en el transporte bacteriano de *P. putida* a través de medios porosos saturados

Tratamiento	Análisis de movilidad		Superficie celular		Transporte y deposición <sup>a</sup>	
	RCDI <sup>b,c</sup>	Velocidad <sup>c,d</sup>	$\theta_w$ <sup>c,e</sup>	$\zeta$ <sup>c,f</sup>	C/C <sub>0</sub> <sup>g</sup>	VP <sup>h</sup>
Control (MM)	51 ± 0.7	18 ± 0.3	47 ± 6	-31 ± 2	0,04 (0,08)	1,10 (4,86)
Glucosa (10mM)	78 ± 18	76 ± 3	47 ± 4	-29 ± 2	0,02 (0,44)	1,18 (4,65)

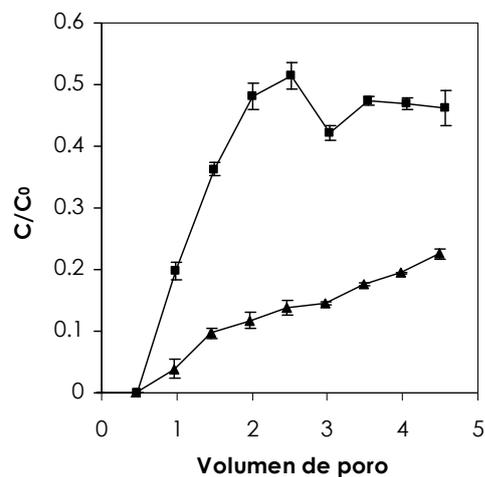
<sup>a</sup>Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>b</sup>RCDI, sumatorio del número de cambios de dirección superiores a 1000 ° s<sup>-1</sup>. <sup>c</sup> Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>d</sup> Velocidad, sumatorio de los picos de aceleraciones mayores de 60 μm s<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>f</sup>  $\zeta$ , Potencial zeta. <sup>g</sup>C/C<sub>0</sub>, eficiencia de la salida bacteriana a través de las columnas. <sup>h</sup> VP, volumen de poro.

El aumento de la eficacia de salida bacteriana en presencia de glucosa tras el bloqueo del filtro (el valor de C/C<sub>0</sub> aumentó de 0,08 a 0,44) se debió a la movilidad marcada por la alta frecuencia de cambios de dirección, 78 ± 18, así como por un número mayor de aceleraciones en su movimiento, 76 ± 3. La hipermovilidad observada con glucosa fue la causa del aumento de la adhesión, así como del aumento del transporte una vez que el colector se colapsó de células adheridas.

#### IV.6.3.3 Transporte bacteriano de los mutantes 55 y 184

Se han obtenido dos transformantes de *Pseudomonas putida* G7 que presentaron un patrón de movilidad distinto al de la silvestre en ausencia de compuesto. Estos patrones de movilidad se asemejaron a los observados en presencia de un atrayente (mutante 55) y un repelente (mutante 184). El estudio del transporte bacteriano de los mutantes en ausencia de compuesto sirvió para comprobar si el efecto del patrón de movimiento en la deposición bacteriana en las columnas de arena pudo ser la causa del perfil de transporte bacteriano observado en los tratamientos anteriormente descritos.

Las curvas de transporte obtenidas con estas estirpes en ausencia de efector corroboran la hipótesis de que el cambio en el patrón de movilidad afectó al transporte bacteriano (figura IV.29).



**Figura IV.29** Transporte bacteriano del mutante 55 (■) y del mutante 184 (♦) a través de columnas empaquetadas con arena de grano fino.

De esta manera, el mutante 55 mostró un perfil de transporte similar al observado en presencia de un atrayente, ya que su patrón de movilidad fue parecido al de la estirpe *P. putida* G7 en presencia de salicilato, donde el movimiento con trayectorias rectilíneas o curvas mantenidas sin cambios

de dirección, permitió que la eficiencia de adhesión fuera baja (véase tabla IV.9), y con ello, el transporte bacteriano fue alto desde que salió el frente celular (1 VP aproximadamente). Aunque cabe destacar que el % de recuperación celular estuvo por debajo del obtenido para la estirpe silvestre en presencia de salicilato. Se recuperó el 50 % de las células del mutante en comparación a la recuperación del 80 % para la silvestre en presencia de salicilato. Esta diferencia de recuperación se puede explicar en base a los resultados obtenidos en el ensayo de adhesión a arena, donde se determinó que la adhesión del mutante 55 no fue tan baja como la de la silvestre en presencia de salicilato.

Mientras que el patrón de movilidad del mutante 184, que se parecía a la movilidad característica de la estirpe silvestre en presencia de un repelente, hizo que la probabilidad de adherirse a la matriz arenosa fuese mayor, provocando el bloqueo del filtro, y el consecuente aumento de transporte bacteriano, tal como ocurrió en presencia de NPsAg. Los cambios de dirección, más frecuentes y abruptos, fueron aprovechados por las células mutantes para adherirse a la matriz arenosa, provocando el bloqueo del colector a partir de 2 volúmenes de poro. En la tabla IV.9 se recogen los datos del transporte bacteriano en cuanto a los valores de adhesión que pueden explicar el aumento del transporte bacteriano en las columnas.

**Tabla IV.9** Influencia del patrón de movilidad de los mutantes 55 y 184 en el transporte bacteriano a través de medios porosos saturados

Mutante	Análisis de movilidad		Transporte y deposición <sup>a</sup>	
	RCDI <sup>b,c</sup>	Velocidad <sup>c,d</sup>	C/C <sub>0</sub> <sup>e</sup>	VP <sup>f</sup>
<b>55</b>	19 ± 5,7	16 ± 0,7	0,36 (0,46)	1,49 (4,56)
<b>184</b>	97 ± 13	40 ± 2,8	0,09 (0,23)	1,46 (4,49)

<sup>a</sup>Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>b</sup>RCDI, sumatorio del número de cambios de dirección superiores a 1000 ° s<sup>-1</sup>. <sup>c</sup>Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>d</sup> Velocidad, sumatorio de los picos de aceleraciones mayores de 60 μm s<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>C/C<sub>0</sub>, eficiencia de la salida bacteriana a través de las columnas. <sup>f</sup>VP, volumen de poro.

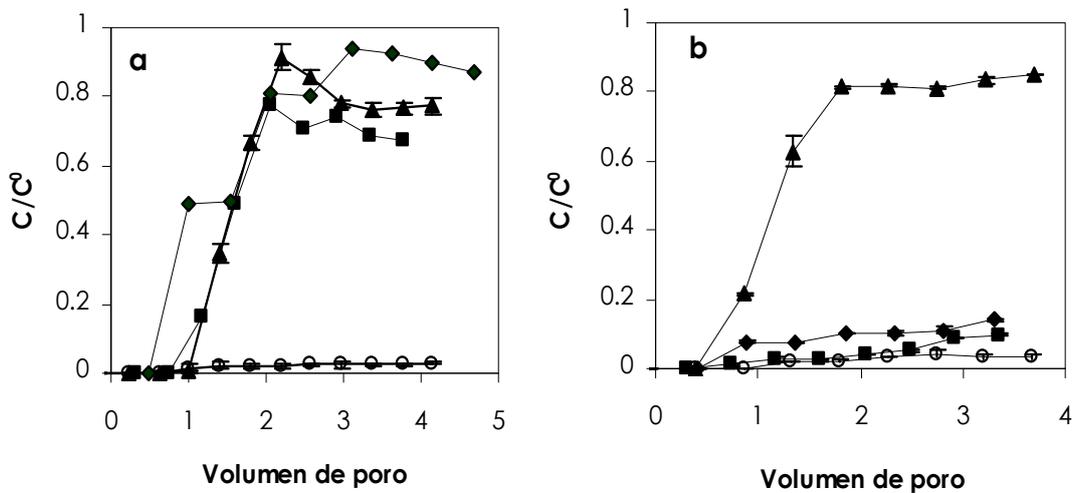
El patrón de movilidad del mutante 55 confirmó los resultados obtenidos en el transporte bacteriano en presencia de un atrayente, donde el movimiento rectilíneo con baja frecuencia de cambios de dirección 19 ± 5,7, provocó una menor adhesión bacteriana en la superficie de arena haciendo que C/C<sub>0</sub> aumentase desde la salida del frente bacteriano (1 VP).

La eficacia de la salida bacteriana es de 0,36 frente al valor de 0,09 para la mutante 184. En este caso, su patrón de movilidad, marcado por la alta frecuencia de cambios de dirección en sus trayectorias celulares (97 ± 13), provocó una mayor adhesión que causó el bloqueo del colector y el aumento de transporte a partir de 2 VP, siendo el máximo valor de C/C<sub>0</sub> de 0,23 a 4,49 VP.

#### IV.6.4 EFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL TRANSPORTE BACTERIANO

##### IV.6.4.1 Materia orgánica disuelta (MOD)

La materia orgánica disuelta (MOD) a una concentración de carbono del orden de  $130 \text{ mgL}^{-1}$  promovió el transporte bacteriano de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en las columnas de arena, tal como se muestra en la figura IV.30a.



**Figura IV.30** Efecto de la materia orgánica disuelta a alto (a) y bajo (b) contenido de carbono orgánico en la deposición bacteriana en columnas empaquetadas con arena de grano fino. Los exudados promovieron (▲) el transporte incluso a baja concentración, mientras que los ácidos húmicos (■) y el fertilizante oleofílico (◆) sólo cuando la cantidad de carbono fue alta, en comparación con el control (○) en ausencia de materia orgánica disuelta

La salida del frente bacteriano se produjo a 1 VP coincidiendo con la mitad del valor máximo de la eficacia de salida bacteriana ( $C/C_0$ ), lo que indicó que la deposición fue baja y la mayoría de las células se transportaron a lo largo del perfil de arena (del 60 al 80 %). En ausencia de materia orgánica, el transporte bacteriano fue prácticamente nulo, ya que la eficacia de la salida bacteriana fue menor de 0,1. Cuando

la concentración de carbono fue 10 veces menor, del orden de 15 mg L<sup>-1</sup>, sólo los exudados promovieron el transporte bacteriano (figura IV.30b). A efectos comparativos, y para comprender las causas del aumento de transporte bacteriano por parte de la materia orgánica en solución, se caracterizó la superficie bacteriana en presencia de la materia orgánica disuelta, tal como se muestra en la tabla IV.8.

**Tabla IV. 10** Efecto de la materia orgánica disuelta (MOD) en el transporte bacteriano de *P. putida* G7 a través de medios porosos saturados

MOD	[C <sub>org</sub> ] <sup>a,b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Análisis de movilidad RCDI <sup>b,d</sup>	Superficie celular		Transporte y deposición <sup>c</sup>	
			$\theta_w$ <sup>b,e</sup>	$\zeta$ <sup>b,f</sup>	C/C <sub>0</sub> <sup>g</sup>	VP <sup>h</sup>
<b>Control (MM)</b>	NA <sup>i</sup>	51 ± 0,7	47,1 ± 6,2	30,9 ± 2,1	0,04 (0,08)	1,10 (4,86)
<b>Exudados vegetales</b>	129 ± 3,5	16 ± 7,1	39,2 ± 7,4	31,5 ± 3,0	0,67 (0,77)	1,79 (4,15)
	16,3 ± 0,1	13 ± 0,1	41,1 ± 6,5	31,6 ± 2,5	0,63 (0,85)	1,33 (3,70)
<b>Ácidos húmicos</b>	138 ± 7,8	44 ± 3,8	41,8 ± 6,7	32,7 ± 1,6	0,49 (0,67)	1,61 (3,78)
	15,5 ± 1,3	40 ± 14	44,4 ± 4,9	33,5 ± 1,9	0,03 (0,09)	1,61 (3,34)
<b>Fertilizante oleofílico</b>	123 ± 0,7	46 ± 2,1	47,4 ± 4,6	30,5 ± 4,6	0,50 (0,89)	1,53 (4,15)
	13,3 ± 0,1	54 ± 17	ND <sup>i</sup>	ND <sup>i</sup>	0,07 (0,14)	1,37 (3,30)

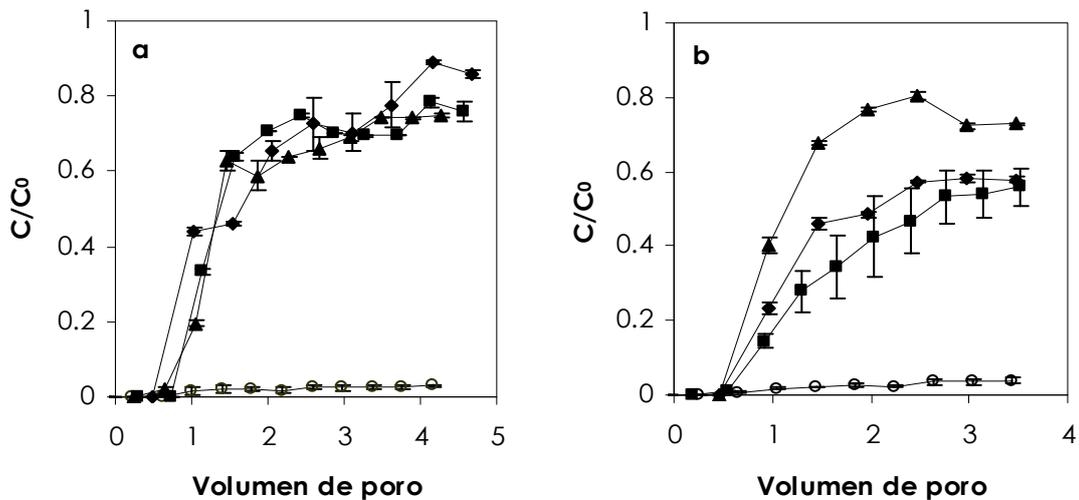
<sup>a</sup>[C<sub>org</sub>], concentración de carbono orgánico. <sup>b</sup> Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>c</sup> Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>d</sup> RCDI, número de cambios de dirección mayores de 1000° s<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>f</sup>  $\zeta$ , Potencial zeta. <sup>g</sup> C/C<sub>0</sub>, eficiencia de la salida bacteriana a través de las columnas. <sup>h</sup> VP, volumen de poro. <sup>i</sup> NA, no aplicable. <sup>i</sup> ND, no determinado.

La superficie celular no se vio afectada en cuanto a la carga superficial (medida por el potencial zeta) e hidrofobicidad (medida por el ángulo de contacto) en presencia de la materia orgánica disuelta, ya que los valores obtenidos para los distintos compuestos no fueron significativamente diferentes al valor del control. De esta manera, el aumento del transporte bacteriano no puede atribuirse a un cambio de estas propiedades físicas de la superficie celular debido al contacto con la materia orgánica, como ya habían sugerido con anterioridad otros autores (Johnson y Logan, 1996). Más bien, la explicación del aumento del transporte podría ser debido a algún efecto fisiológico causado por la materia orgánica, como podría tratarse de la respuesta táctica positiva detectada hacia los exudados vegetales por parte de *P. putida* G7. Las trayectorias celulares caracterizadas por una baja frecuencia de cambios de dirección en presencia de exudados (tabla IV.10) fomentarían una menor intercepción de las bacterias con el colector de arena, provocando una menor adhesión y, por tanto un transporte mayor.

Los AH y el fertilizante no provocaron ninguna respuesta táctica en la estirpe *P. putida* G7, por lo que la razón del aumento del transporte bacteriano podría deberse a la competencia entre la materia orgánica y las células bacterianas por la adhesión a la arena, tal como ya había sido descrito en publicaciones anteriores (Lahlou y col., 2000; Foppen y col., 2008; Park y Kim, 2009). En estos estudios se comprobó el impedimento estérico que suponen los AH, previamente adsorbidos sobre la superficie del colector, para la adhesión bacteriana a la superficie.

#### **IV.6.4.2 Materia orgánica adsorbida**

Para comprobar que el efecto promotor del transporte observado en la figura IV.30a podía deberse a la competencia entre la materia orgánica y las células bacterianas por adherirse a la superficie de arena, se estudió el efecto del pre-bombeo de la materia orgánica sobre el transporte bacteriano. En este caso, el efecto promotor del transporte fue evidente tanto a alta concentración de carbono (figura IV.31a) como a baja concentración (figura IV.31b).



**Figura IV.31** Transporte bacteriano de la estirpe *P. putida* G7 en columnas de arena pre-acondicionadas con exudados (▲), ácidos húmicos (■) y el fertilizante oleofílico(◆) a alta (a) y baja (b) concentración de carbono, en comparación con el control en ausencia de materia orgánica adsorbida(○)

En la figura IV.31 se corroboró el aumento del transporte bacteriano cuando la materia orgánica estuvo adsorbida a la superficie de arena, pero cabe destacar que, aunque en el caso de los exudados no influyó la concentración de carbono, en el de los ácidos húmicos y el fertilizante, sí. Los valores de eficacia de la salida bacteriana ( $C/C_0$ ) fueron menores cuando se prebombaron los AH y el fertilizante a concentración baja comparado con los valores de  $C/C_0$  a concentración alta de carbono, tal como se indica en la tabla IV.11. A mayor concentración de carbono, mayor fue el transporte bacteriano, ya que la superficie de arena pudo quedar cubierta por una mayor cantidad de materia orgánica que impidió a las células bacterianas adherirse a la arena. Estos datos están en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (Park y Kim, 2009) en donde se comprobó que la adhesión de *E. coli* sobre arena cubierta de hierro disminuyó con el aumento de la concentración de ácidos húmicos debido a la pre-ocupación de los sitios favorables para la adhesión por parte de la materia orgánica. De manera que se observó un incremento del transporte bacteriano del 63,4 % (cuando se bombaron AH a  $4\text{ mg L}^{-1}$ ) al 94,6% al bombar la solución de AH a  $16\text{ mg L}^{-1}$ .

**Tabla IV. 11** Efecto de la materia orgánica adsorbida en el transporte bacteriano de *P. putida* G7 a través de medios porosos saturados.

Materia orgánica adsorbida	[C <sub>org</sub> ] <sup>a, b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Transporte y deposición <sup>c</sup>	
		C/C <sub>0</sub> <sup>d</sup>	VP <sup>e</sup>
<b>Control (MM)</b>	NA <sup>i</sup>	0,04 (0,08)	1,10 (4,86)
<b>Exudados vegetales</b>	129 ± 3,5	0,63 (0,78)	1,46 (4,13)
	16,3 ± 0,1	0,68 (0,73)	1,46 (3,49)
<b>Ácidos húmicos</b>	138 ± 7,8	0,64 (0,70)	1,57 (3,70)
	15,5 ± 1,3	0,34 (0,56)	1,66 (3,51)
<b>Fertilizante oleofílico</b>	123 ± 0,7	0,46 (0,76)	1,53 (3,63)
	13,3 ± 0,1	0,46 (0,58)	1,46 (3,48)

<sup>a</sup>[C<sub>org</sub>], concentración de carbono orgánico. <sup>b</sup> Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>c</sup> Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>d</sup> C/C<sub>0</sub>, eficiencia de la salida bacteriana a través de las columnas. <sup>e</sup> VP, volumen de poro. <sup>f</sup> NA, no aplicable.

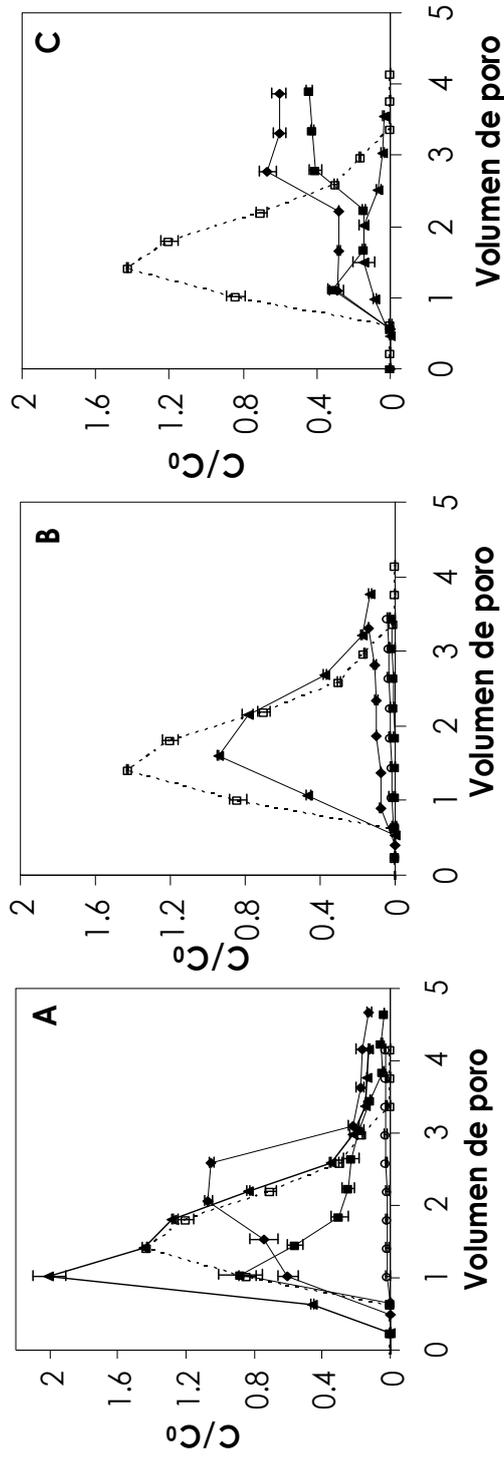
En nuestro estudio, el transporte bacteriano en presencia de exudados adsorbidos previamente a la arena, no se vio afectado por la concentración utilizada. Los valores de C/C<sub>0</sub> fueron similares al comienzo de la salida bacteriana, 0,63 para la alta concentración de carbono, y 0,68 para la baja. Estos datos apoyan la idea de la respuesta táctica como efecto promotor del transporte bacteriano que, como se vio anteriormente, es independiente de la concentración de carbono orgánico. Por lo que la quimiotaxis frente a exudados sería más efectiva que bombear AH o el fertilizante oleofílico, ya que el efecto promotor del transporte es el mismo a menor concentración de carbono.

El pre-bombeo de la solución de AH a  $16 \text{ mg L}^{-1}$  supuso una disminución de la eficacia de la salida bacteriana del 30% respecto al pre-bombeo de AH a  $138 \text{ mg L}^{-1}$ . Para el caso del fertilizante, la eficacia del transporte a la salida del frente bacteriano fue similar a ambas concentraciones. Aunque el pre-bombeo del fertilizante a  $13 \text{ mg L}^{-1}$  supuso una pérdida del 18% de la eficiencia en el transporte bacteriano a aproximadamente 3,5 VP, donde hay que tener en cuenta la dinámica del factor de bloqueo. Esto indicó una posible modificación de las propiedades físico-químicas de la superficie de arena en contacto con el fertilizante que discutiremos más adelante en el epígrafe IV.6.4.

La materia orgánica adsorbida promueve el transporte por impedimento de la asociación bacteriana por la pre-ocupación de la materia orgánica de los sitios de interacción con la arena, mientras que la materia orgánica disuelta compete con las células por los sitios de interacción en la arena, de ahí que los valores de  $C/C_0$  sean parecidos a alta concentración de carbono para el caso de la materia orgánica disuelta (tabla IV.10) y la materia orgánica adsorbida (tabla IV.11). Mientras que a baja concentración de carbono, el efecto de la materia orgánica adsorbida fue menor que a alta concentración. Cuando la materia orgánica estuvo disuelta, no hubo evidencias de un aumento de transporte ya que la concentración de carbono fue demasiado baja como para competir con las células bacterianas por los sitios de interacción a la arena.

#### **IV.6.4.3 Movilización de células adheridas**

El efecto promotor del transporte por parte de la materia orgánica se hizo más evidente cuando se indujo la movilización de bacterias previamente asociadas a la matriz arenosa (figura IV.32). La movilización fue posible gracias al bombeo de materia orgánica a alta concentración, que tendía a adherirse a la superficie de arena, provocando el despegue de las células bacterianas (figura IV.32A). La reversión a baja concentración de materia orgánica sólo fue posible con los exudados (figura IV.32B), poniendo de manifiesto la importancia de la quimiotaxis positiva a los exudados en la reversión del transporte, que quedó comprobada por la ausencia de movilización de bacterias inactivas, previamente adheridas a la columna (figura IV.32C).



**Figura IV.32** Movilización de bacterias adheridas mediante el bombeo de materia orgánica disuelta a alta (A) y baja (B) concentración de carbono orgánico. Los exudados ( $\blacktriangle$ ) revertieron el transporte incluso a baja concentración de carbono, mientras que los ácidos húmicos ( $\blacksquare$ ) y el fertilizante ( $\blacklozenge$ ) sólo cuando la cantidad de carbono fue elevada, en comparación con el control ( $\circ$ ) en ausencia de materia orgánica. (C), Movilización de bacterias inactivas adheridas mediante el bombeo de exudados( $\blacktriangle$ ) a baja concentración y de ácidos húmicos ( $\blacksquare$ ) y del fertilizante ( $\blacklozenge$ ) a alta concentración de carbono. La línea punteada indica la reversión de bacterias con el bombeo de agua desfilada

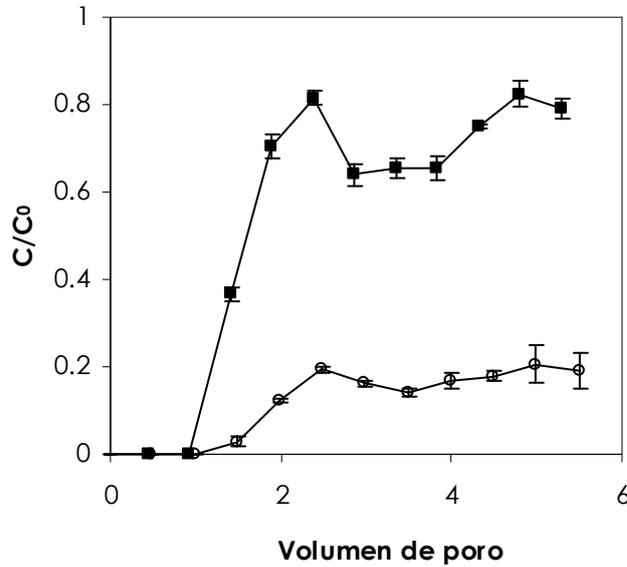
La movilización de células inactivas mediante el bombeo de ácidos húmicos o el fertilizante fue menor que cuando las células estaban vivas, poniendo de manifiesto la importancia del papel de la movilidad bacteriana en la dinámica del transporte. Los valores máximos de  $C/C_0$  bajaron de 0,8 a 0,4 en el caso de los ácidos húmicos y de prácticamente 1 a 0,65 en el caso del fertilizante. Cabe destacar que la reversión fue mayor con el fertilizante oleofílico debido a sus propiedades tensioactivas que explicaremos más adelante. Aún así, el efecto de los exudados sobre el transporte de células activas adheridas fue más eficaz que el de los AH o el fertilizante, ya que a una concentración de  $16 \text{ mg L}^{-1}$  se observó el mismo efecto que los AH y el fertilizante a concentraciones de 138 y 123  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente. Además, a la concentración de  $129 \text{ mg L}^{-1}$ , los exudados vegetales provocaron una movilización incluso mayor que la provocada por la repulsión bacteriana al bajar la fuerza iónica del medio (véase la línea punteada en la figura IV.32 que representa el bombeo de agua destilada para movilizar las células activas adheridas en las columnas).

#### **IV.6.4.4 Transporte bacteriano a través de suelo agrícola y un suelo forestal rico en materia orgánica**

Los experimentos de transporte llevados a cabo con arena como material poroso dieron unos resultados que fueron explicados por razones fisiológicas y/o físicas mediante el empleo de distintos compuestos que pudieron afectar al transporte bacteriano. Cabe destacar el papel de la quimiotaxis en el cambio del patrón de movilidad que afectó a la adhesión a la arena, y con ello, al transporte bacteriano.

Con el fin de acercar los resultados a una posible situación real, se empleó un suelo agrícola como material poroso en las columnas de transporte (figura IV.33).

Los exudados de raíces de girasol provocaron el aumento del transporte bacteriano de manera parecida a lo que ocurría en la arena. La mitad del valor máximo de la eficacia de la salida bacteriana se dio a 1 volumen de poro, siendo la deposición en las columnas alrededor del 20 % de la suspensión bombeada.

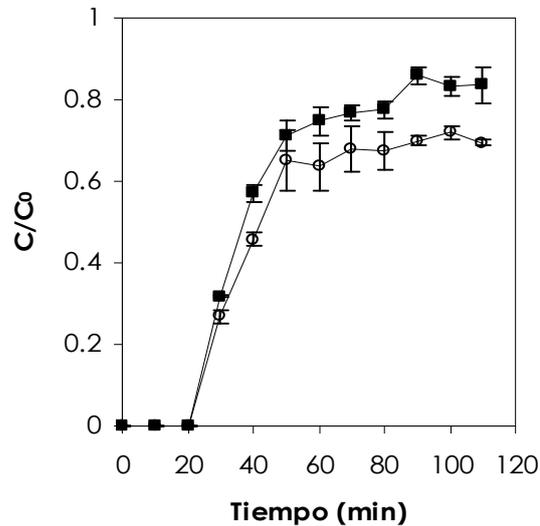


**Figura IV.33** Transporte bacteriano de la estirpe *P. putida* G7 en columnas empaquetadas con suelo agrícola en presencia (■) y ausencia (○) de exudados de raíces de girasol a 16 mg L<sup>-1</sup>

Cabe destacar que el transporte bacteriano en ausencia de exudados es algo mayor que con la arena, pudiendo deberse al aumento del volumen de poro en esta matriz de suelo que fue de 2.865 mL, siendo parecido a lo que ocurría cuando los granos de arena eran de un diámetro mayor al comúnmente usado en los experimentos.

Cuando se empleó un suelo forestal rico en materia orgánica (22% mo), el aumento del transporte fue evidente incluso en ausencia de exudados (figura IV.34) Esto refuerza los resultados obtenidos en el epígrafe IV.6.3.2 en el que se estudió el efecto de la materia orgánica adsorbida sobre el transporte bacteriano. Las columnas preparadas con una porción de suelo forestal se asemejaron a las columnas de arena pre-acondicionadas con la materia orgánica (exudados, AH y fertilizante oleofílico), donde la materia orgánica adsorbida a los granos de arena impidió la intercepción de las células bacterianas con el colector. Con este experimento, se puso de manifiesto, que aún en presencia de materia orgánica adsorbida que

facilite el transporte bacteriano, los exudados a  $16 \text{ mg L}^{-1}$  suponen un pequeño refuerzo añadido para facilitar el transporte bacteriano en el suelo.



**Figura IV.34** Transporte bacteriano en columnas empacadas con suelo forestal en presencia (■) y ausencia (○) de exudados vegetales a  $16 \text{ mg L}^{-1}$

#### IV.6.5 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA SUPERFICIE DE ARENA

Los compuestos utilizados para promover el transporte bacteriano no afectaron a la superficie celular durante el tiempo en que transcurrieron los ensayos de transporte (2-3 horas) tal como se ha comprobado por los valores de la carga superficial y el ángulo de contacto de la superficie celular en presencia de los distintos compuestos (tablas IV.4, 6 y 7). Este dato concuerda con un estudio de Harvey Ronald y colaboradores (Harvey y col., 2011) en el que se concluyó que sólo la exposición a largo plazo de altas cantidades de carbono orgánico disuelto podría modificar la superficie celular bacteriana, pero no si la exposición es corta.

Resultados

Para comprobar que los compuestos no afectaban a las propiedades físico-químicas de la superficie de la arena, y con ello, a la deposición bacteriana, se determinaron el potencial zeta y ángulo de contacto de las disoluciones utilizadas sobre la superficie de la arena. Además, se midió la tensión superficial de los compuestos, ya que es una propiedad que pudo afectar a la superficie de arena e interferir en el transporte bacteriano, (tabla IV.12). Tan sólo en el caso del fertilizante oleofílico pudo atribuirse el efecto tensioactivo como factor influyente en el transporte bacteriano, dado que su valor de tensión superficial fue significativamente diferente al del control (MM),  $33,7 \pm 0,4$  mN/m frente a  $61,6 \pm 0,9$  mN/m, respectivamente.

**Tabla IV.12** Influencia de los compuestos sobre las propiedades superficiales de la arena empaquetada en las columnas de transporte<sup>a</sup>

Concentración del compuesto	Tensión superficial (mN/m)	Efecto del compuesto en la superficie de arena <sup>a</sup>	
		Carga superficial (mV)	Ángulo de contacto (°)
<b>Control</b> NA	$61,6 \pm 0,9$	$-15 \pm 1,2$	$16 \pm 2,6$
<b>NpsAg</b> 0.2mg L <sup>-1</sup>	$58,6 \pm 1,2$	$-13 \pm 3,1$	$21 \pm 7,0$
<b>Glucosa</b> 10 mM	$59,8 \pm 0,4$	$-13 \pm 0,5$	$19 \pm 4,8$
<b>Exudados</b>	$129 \pm 3,5$	$-12 \pm 2,0$	$23 \pm 1,4$
	$16 \pm 0,1$	$64,9 \pm 1,4$	$-8 \pm 1,0$
<b>AH <sup>b</sup></b>	$138 \pm 7,8$	$-22 \pm 0,3$	$19 \pm 1,7$
	$15 \pm 1,3$	$59,8 \pm 1,8$	$-16 \pm 0,3$
<b>Fertilizante</b>	$123 \pm 0,7$	$-25 \pm 1,3$	$109 \pm 3,6$
	$13 \pm 0,1$	$54,4 \pm 0,4$	ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Los valores se dan como la media  $\pm$  desviación estándar. <sup>b</sup> AH, la medida de carga superficial y ángulo de contacto son referidas a los AH sintéticos. <sup>c</sup> ND, no determinado

Además, cabe destacar que el fertilizante presentó un valor de ángulo de contacto sobre la superficie de arena en ausencia de bacterias de  $109 \pm 3,6^\circ$  en comparación al valor del MM en contacto con la arena,  $16 \pm 2,6^\circ$ , indicando, por tanto, la hidrofobicidad del compuesto. Ello da idea de la complejidad de las interacciones que podrían darse entre las moléculas del fertilizante oleofílico y la superficie de arena, desencadenantes del aumento de transporte bacteriano.

Los valores de hidrofobicidad y carga superficial del resto de compuestos no fueron significativamente diferentes con respecto al control (MM). Se comprobó, además, que el volumen de poro en presencia de materia orgánica no cambió significativamente con respecto al control. El conjunto de estos datos contribuyen al refuerzo de la hipótesis de que el patrón de movilidad es determinante en el transporte y deposición de las células bacterianas en las columnas empaquetadas con arena.

#### **IV.6.6 AUSENCIA DE RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA**

##### **IV.6.6.1 Efecto de la fuente de cultivo en el transporte bacteriano**

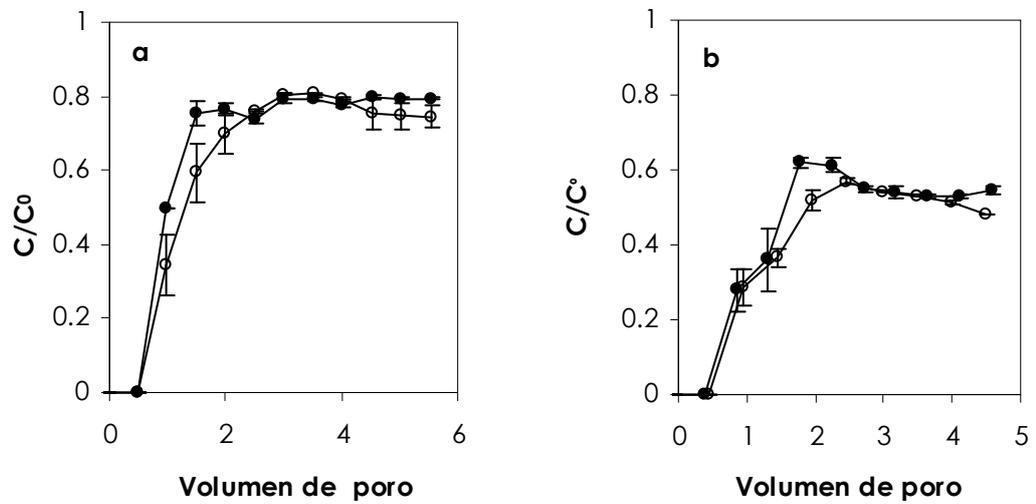
La quimiotaxis de *Pseudomonas putida* G7 hacia naftaleno es un fenómeno inducible (Grimm y Harwood, 1997), puesto que es necesaria la exposición a este durante el crecimiento de la estirpe (o bien un intermediario de su ruta de degradación) para que se transcriban los genes codificadores de la respuesta quimiotáctica (receptores y transductores de la señal). De ahí que hayamos utilizado el salicilato sódico (intermediario de la ruta de degradación del naftaleno) como fuente de carbono y asegurarnos, así, la capacidad quimiotáctica de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en todo momento.

Se probó el efecto de una fuente de cultivo distinta a salicilato para comprobar que la taxis positiva a naftaleno era inexistente durante el transporte bacteriano. Se utilizaron dos compuestos diferentes, descritos en el epígrafe IV.2.1, donde se estudió la curva de crecimiento en función de la fuente de carbono usada por el microorganismo. No hubo evidencia de aumento del transporte bacteriano en presencia de naftaleno (figura IV.35). Las curvas de rotura en presencia y ausencia de quimioefector son muy parecidas, lo que indicó que la ausencia de quimiotaxis a naftaleno no provocó un aumento del transporte. Al no haber crecido con naftaleno

(o algún intermediario de su ruta de degradación), los genes que codifican para los receptores de la respuesta táctica a naftaleno no estaban inducidos. Así pues, no hubo diferencias significativas entre el transporte bacteriano en ausencia y presencia de naftaleno.

La fuente de carbono distinta afectó al transporte bacteriano, ya que se observó una modificación de la curva de rotura típica obtenida en ausencia de quimioefector (cuando las bacterias crecieron con salicilato sódico). En el caso del cultivo en triptona, aunque la hidrofobicidad y carga superficial no variaron con respecto a la superficie bacteriana cuando se cultivó en salicilato, posiblemente la composición y/o distribución de los componentes de la membrana celular sea diferente, haciendo que se favoreciera el transporte bacteriano en vez de la adhesión (figura IV.35a).

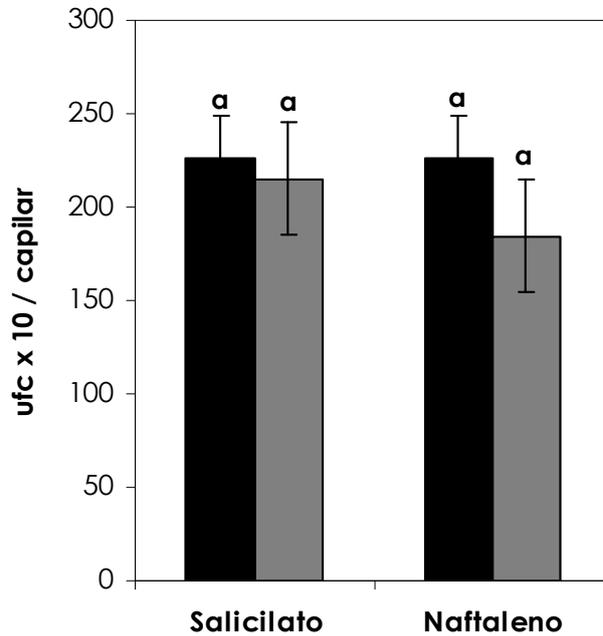
En el caso del acetato, la movilidad celular fue tan reducida que el aumento de transporte, en este caso, fue debido a la escasa interpección por el colector en ausencia de movilidad (que conlleva cambios en la dirección de movimiento para interactuar con la superficie de arena) (figura IV.35b). Además, la superficie celular fue más hidrofílica cuando la bacteria se cultivó en salicilato, lo que pudo haber contribuido al aumento de transporte por repulsiones electrostáticas con la arena (también hidrofílica).



**Figura IV.35** Transporte bacteriano en ausencia (○) y presencia de naftaleno (●) cuando el cultivo bacteriano de *Pseudomonas putida* G7 se preparó a base de triptona (a) y acetato (b) como fuente de carbono.

La ausencia de quimiotaxis bacteriana a naftaleno, y su intermediario de la ruta de degradación, salicilato, fue comprobada mediante ensayos capilares para el caso de la triptona (fig IV.36). El acetato no constituyó una fuente energética para el microorganismo y el ensayo capilar no fue posible (la movilidad celular era muy reducida cuando la bacteria se cultivó en acetato).

El número de células que entró en los capilares que contenían naftaleno y salicilato fue incluso menor que el control, aunque las diferencias no fueron significativas ( $P=0,01$ ).

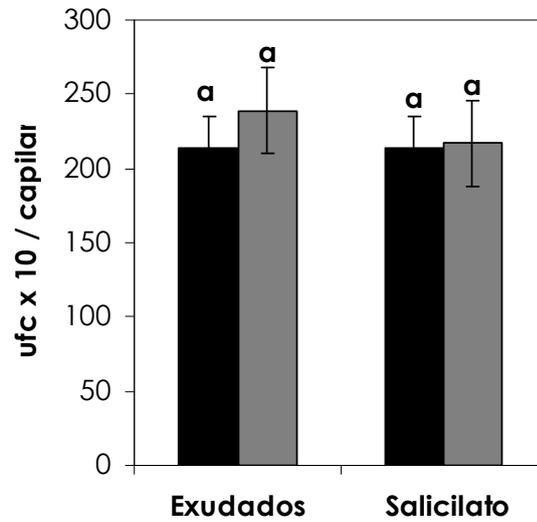


**Figura IV.36** Ausencia de quimiotaxis positiva hacia salicilato y naftaleno cuando *Pseudomonas putida* G7 se cultivó usando triptona como fuente de carbono.

#### IV.6.6.2 Mutante defectuoso en la quimiotaxis hacia exudados de girasol

El mutante 91 se seleccionó para corroborar el papel de la quimiotaxis a exudados en el aumento del transporte bacteriano en las columnas, ya que se seleccionó por ser deficiente en la respuesta quimiotáctica hacia salicilato y exudados a concentración de 129 mg L<sup>-1</sup>, tal como puede observarse en la figura IV.37 del ensayo capilar de atracción.

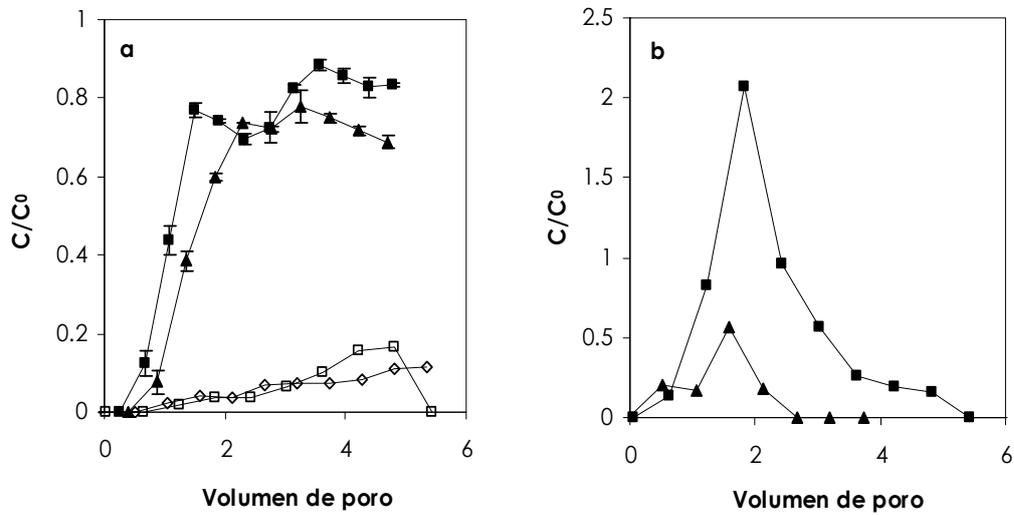
El número de células que entró en los capilares que contenían exudados y salicilato no fue significativamente diferente al número de células que había dentro de los capilares que sólo contenían medio de mineralización ( $P=0,01$ ).



**Figura IV.37** Deficiencia de quimiotaxis positiva hacia salicilato y exudados de raíces de girasol de la estirpe mutante 91

El transporte del mutante 91 fue mayor cuando los exudados, a concentración de 129 mg L<sup>-1</sup>, estuvieron presentes en las columnas como materia orgánica disuelta, poniendo de manifiesto que la menor deposición en la arena se debió a la competencia que existe entre los exudados y las células bacterianas por los sitios de interacción en el colector de arena (figura IV.38a).

Mientras que la reversión del transporte de células previamente adheridas, fue menor en el caso del mutante que para el caso de la estirpe silvestre *P. putida* G7 que sí tiene capacidad quimiotáctica frente a los exudados que fueron bombeados para provocar el transporte de las células adheridas (figura IV.38b).



**Figura IV.38** En a, transporte bacteriano del mutante 91 en presencia ( $\blacktriangle$ ) y ausencia de ( $\triangle$ ) de exudados a  $129 \text{ mg L}^{-1}$ , en comparación al transporte de la estirpe silvestre *Pseudomonas putida* G7 en presencia ( $\blacksquare$ ) y ausencia de ( $\square$ ) de exudados a  $129 \text{ mg L}^{-1}$ . En b, movilización de bacterias mutantes adheridas ( $\blacktriangle$ ) y bacterias silvestres ( $\blacksquare$ ) con el bombeo de exudados a  $129 \text{ mg L}^{-1}$

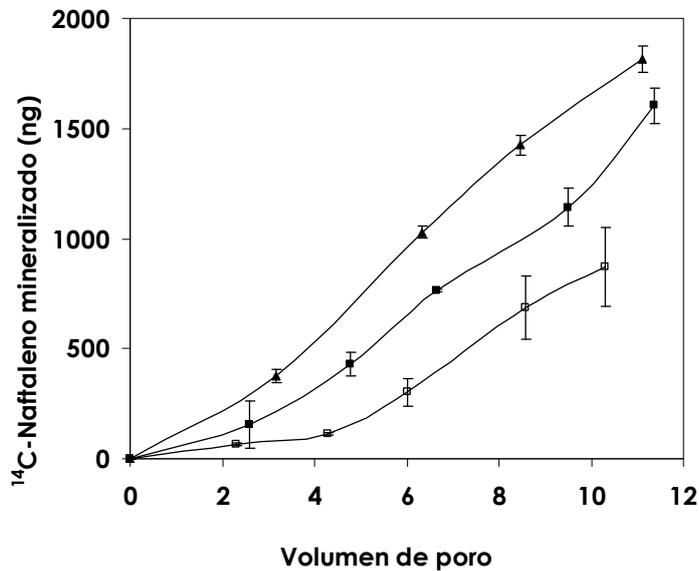
Este ensayo constituye un refuerzo para la hipótesis de que el patrón de movilidad seguido por la bacteria cuando detectó los exudados en solución fue una de las causas por las que aumentó el transporte bacteriano. Se ha comprobado que en ausencia de quimiotaxis, el efecto de los exudados en la reversión del transporte de bacterias adheridas fue menor para el caso del mutante 91 que para el de la silvestre *P. putida* G7.

#### IV.7 INFLUENCIA DEL PATRÓN DE MOVILIDAD BACTERIANO EN LA BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo con el objetivo de determinar si el aumento de transporte observado al modificar el patrón de movilidad podría conllevar a un aumento de la degradación de naftaleno en condiciones de baja biodisponibilidad (naftaleno adsorbido en las anillas de silicona) en un sistema poroso. Para ello, los experimentos se llevaron a cabo en las mismas columnas de percolación y bajo las mismas condiciones de ensayo que para el estudio del transporte bacteriano. La biodegradación se determinó según la cantidad de  $^{14}\text{C}$ -naftaleno mineralizado. Se seleccionaron como efectores tácticos, exudados ( $16 \text{ mg L}^{-1}$ ) y NPsAg ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ).

##### IV.7.1 BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO EN COLUMNAS DE TRANSPORTE

Para la representación gráfica de la biodegradación de naftaleno en presencia y ausencia de los efectores tácticos, se midió la cantidad (en ng) de  $^{14}\text{C}$ -naftaleno mineralizado en las columnas de transporte. La mineralización de naftaleno por parte de *P. putida* G7 fue mayor en presencia de ambos compuestos, en comparación a la mineralización detectada en su ausencia (figura IV.39). La tasa de mineralización en presencia de exudados y NPsAg fue de  $278 \pm 51 \text{ ng mL}\cdot\text{h}^{-1}$  y  $441 \pm 63 \text{ ng mL}\cdot\text{h}^{-1}$  respectivamente, en comparación a la tasa de mineralización máxima en el control,  $191 \pm 39 \text{ ng mL}\cdot\text{h}^{-1}$ . Las diferencias fueron significativas con respecto al control para  $P=0,05$ . Cabe destacar que la mineralización en ausencia de efector táctico fue mayor de lo esperado, lo que puede explicarse por el efecto quimioefector positivo que supondría el naftaleno desorbido de la anilla debido al flujo del fluido. La detección quimiotáctica del naftaleno, hizo que las bacterias se dirigieran hacia el extremo final de las columnas de manera más eficaz que cuando no hubo naftaleno. Esto se ha comprobado por el perfil de la curva de rotura, siendo el valor de  $C/C_0$  igual a 0,2 a (1,5 VP), mientras que en ausencia de naftaleno, el valor de  $C/C_0$  fue 0,04 (a 1, 6 VP).



**Figura IV.39** Mineralización de naftaleno marcado con  $^{14}\text{C}$  en ausencia (□) y presencia de exudados vegetales a  $16 \text{ mg L}^{-1}$  (■) y de NPsAg a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  (▲) en las columnas empaquetadas con arena

El fenómeno que explica el aumento de la biodegradación de naftaleno es diferente para cada efector táctico utilizado, y puede relacionarse con el efecto de los compuestos sobre el patrón de movilidad bacteriano y la adhesión a la arena, tal como se refleja en la tabla IV.13. Los valores del naftaleno desorbido en cada tratamiento pueden explicar los datos de mineralización obtenidos. Los exudados aumentaron la biodisponibilidad del naftaleno adsorbido, haciendo que la desorción fuese mayor (tanto a 2 como a 6 VP). Mientras que las NPsAg no afectaron a la desorción de naftaleno desde la anilla, no habiendo diferencias significativas entre los valores de desorción (a 2 y 6 VP) en ausencia y presencia de nanopartículas. La explicación a este fenómeno está en la adhesión bacteriana inducida por el patrón de movilidad. En presencia de NPsAg, la alta frecuencia de cambios de dirección, provocó una mayor adhesión a la arena y a la anilla, lo que condujo a un aumento de la degradación del naftaleno adsorbido mediante las bacterias adheridas. En el caso de los

exudados, la mineralización fue mayor por el aumento de la biodisponibilidad del naftaleno debido a la movilización de las células a lo largo del perfil de arena hasta el extremo final de las columnas (donde se encontraba el foco del contaminante). El escaso número de cambios de dirección en el patrón de movilidad bacteriana en presencia de exudados, provocó que las bacterias se dirigiesen de una forma más eficiente hacia el foco de contaminación.

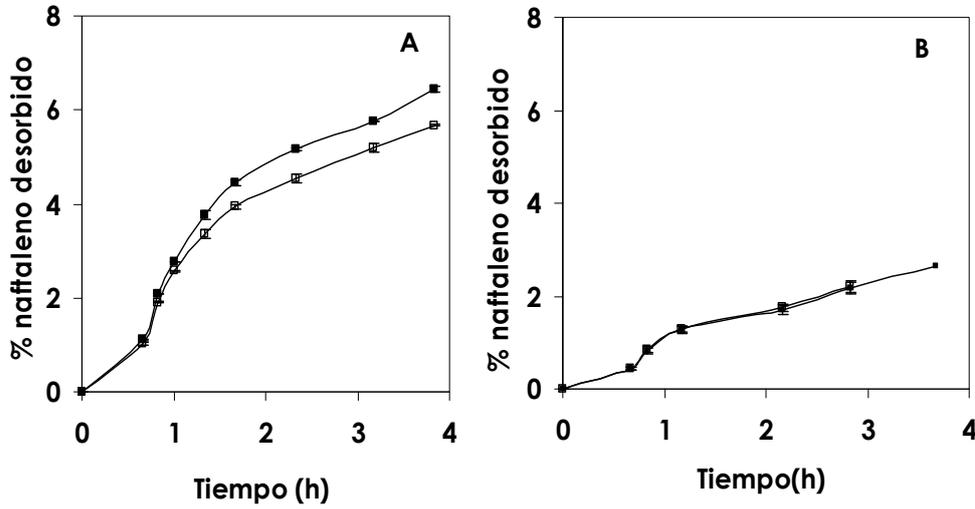
**Tabla IV.13** Influencia de la quimiotaxis bacteriana en la biodegradación de naftaleno en las columnas

Efactor táctico	Análisis <sup>a</sup> de movilidad	Adhesión (%) <sup>a</sup>		Transporte <sup>b</sup> bacteriano		Mineralización <sup>a</sup>		
	RCDI <sup>c</sup>	Arena	Anilla	C/C <sub>0</sub> <sup>d</sup>	VP <sup>e</sup>	N <sub>des</sub> <sup>f</sup> (ng)	N <sub>min</sub> <sup>g</sup> (ng)	N <sub>col</sub> <sup>h</sup> (ng)
Ninguno <sup>i</sup>	51 ± 0,7	38 ± 2	46 ± 0,2	0,1 (0,3)	2,3 (6,0)	850 ± 17 (772 ± 130)	67,3 ± 5 (191 ± 70)	980 ± 425
Exudados 16 mg L <sup>-1</sup>	13 ± 0,1	9 ± 1	31 ± 2	0,6 (0,8)	2,6 (6,6)	1000 ± 89 (989 ± 217)	332 ± 32 (266 ± 3,5)	531 ± 237
NPsAg 0,2 mg L <sup>-1</sup>	114 ± 3	58 ± 4	55 ± 2	0,7 (0,6)	3,1 (6,3)	886 ± 374 (789 ± 66)	375 ± 59 (654 ± 112)	258 ± 80

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media ± desviación estándar. <sup>b</sup> Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación del bloqueo de filtro. <sup>c</sup> RCDI, sumatorio del número de cambios de dirección superiores a 1000 ° s<sup>-1</sup>. <sup>d</sup> C/C<sub>0</sub>, Eficiencia de salida bacteriana a través de las columnas. <sup>e</sup> VP, Volumen de poro. <sup>f</sup> N<sub>des</sub>, naftaleno desorbido desde la anilla. <sup>g</sup> N<sub>min</sub>, naftaleno mineralizado. <sup>h</sup> N<sub>col</sub>, naftaleno desorbido no degradado acumulado en las columnas. <sup>i</sup> Los datos del control están tomados del experimento con exudados vegetales.

En la gráfica IV.40 se representa el % de naftaleno desorbido (estimado como <sup>14</sup>C eluído total frente al tiempo) desde la anilla en presencia de exudados (A) y de nanopartículas (B). Nótese que en B por razones desconocidas la cantidad de naftaleno desorbido desde la anilla, en ausencia de NPsAg, fue menor que en el experimento con exudados

(figura IV.40A), llegando casi al 4 %, mientras que la otra vez casi se alcanzó el 6%.



**Figura IV.40** Desorción de naftaleno desde la anilla de silicona colocada en el extremo final de columnas empaquetadas de arena en presencia (■) y ausencia (□) de exudados vegetales (A) y NPsAg (B)

Aunque hubo menos desorción de naftaleno con NPs y (su control), la biodegradación fue mayor para NPsAg, pero en el control, la biodegradación fue prácticamente igual a la representada en la figura IV.39 (datos no mostrados). En el caso de las NPs, precisamente es la razón que apoya la hipótesis de que hay más degradación porque hay más adhesión a la anilla. Aunque la desorción sea más lenta, la mineralización no dependió del naftaleno desorbido, sino de la adhesión bacteriana. En el caso del control, la mineralización fue prácticamente igual a la del control con el experimento de exudados, por lo que se pone en evidencia que la actividad degradadora de la bacteria fue siempre la máxima, independientemente del naftaleno que hubiera para degradar. De esta manera, las diferencias que hemos visto entre NPsAg y exudados pueden atribuirse a los efectos que causan estos compuestos en la adhesión y la

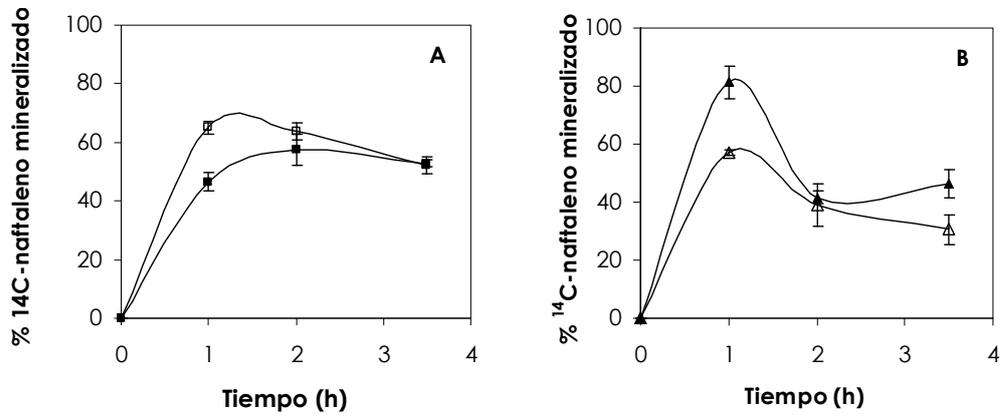
movilización de bacterias, respectivamente, ya que la bacteria actuó bajo condiciones de máxima capacidad degradativa.

### **V.7.2 BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO EN SUSPENSIONES BACTERIANAS**

En este caso, quisimos comprobar la hipótesis de que el aumento en la biodegradación de naftaleno por parte de los exudados fue debido a un aumento de la biodisponibilidad, y por ello, de la desorción de naftaleno, tal como hemos comentado en el epígrafe anterior. Para ello, el experimento de mineralización se realizó en suspensiones bacterianas en ausencia y presencia de exudados y/o NPsAg, con anillas cargadas con naftaleno inmersas en las suspensiones.

La mineralización de naftaleno fue menor en presencia de exudados en comparación al control (figura IV.41A). Los resultados concuerdan con los datos del experimento de biodegradación en columnas, donde se concluyó que el aumento de mineralización en presencia de exudados se debía a un mayor transporte bacteriano, es decir, a que la población degradadora que llegaba al extremo final de las columnas, donde está el naftaleno, fue mayor. Por lo tanto, en el experimento en fase acuosa, no fue evidente el aumento de la biodegradación debido al aumento del transporte. En su caso, se observó una disminución de la mineralización, porque la adhesión a la anilla fue menor en presencia de exudados (tabla IV.14).

Las NPsAg provocaron un aumento de la mineralización de naftaleno (figura IV.41B), lo que puede explicarse también, por el efecto de la mayor adhesión a la anilla. No se observó una mayor desorción del naftaleno desde la anilla en presencia de NPsAg, por lo que la mayor mineralización se debió a la acción de las bacterias adheridas que degradaron más eficientemente el naftaleno adsorbido a la anilla.



**Figura IV.41** Mineralización del naftaleno desorbido en un tubo de ensayo en fase acuosa bajo agitación continua en presencia (■) y ausencia (□) de exudados (A) y NPsAg (B)

En la tabla IV.14 se recogen los datos de adhesión a la anilla de silicona en presencia de los efectores utilizados, para corroborar que la mayor adhesión a la anilla en presencia de NPsAg, 55,5 % provocó una mayor degradación del naftaleno adsorbido por parte de las células adheridas una hora después del comienzo del experimento, como se observa, además, en la gráfica IV.41B.

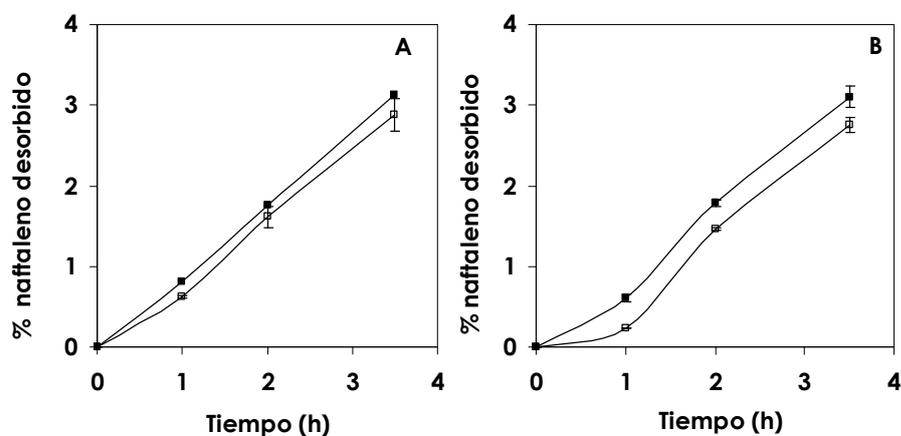
La cantidad de naftaleno desorbido a 2 horas del comienzo del experimento, fue algo mayor en presencia de exudados, pero las diferencias no fueron significativas ( $P=0,01$ ). Las NPsAg no provocaron una desorción mayor, tal como se había postulado anteriormente, ya que la degradación se da por parte de las bacterias adheridas sobre el naftaleno adsorbido.

La curva de desorción de naftaleno en fase acuosa puede observarse en la gráfica IV.42.

**Tabla IV.14** Influencia de la respuesta táctica bacteriana en la desorción y biodegradación de naftaleno en fase acuosa

Efecto táctico	Adhesión (%) <sup>a</sup>	Mineralización <sup>a</sup>		
		Momento de muestreo (h) <sup>b</sup>	N <sub>des</sub> (ng) <sup>c</sup>	N <sub>min</sub> (ng) <sup>d</sup>
Ninguno	45,7 ± 0,2	1 (3,5)	721 ± 37 (1450 ± 172)	469 ± 7,3 (749,4 ± 2,9)
Exudados 16 mg L <sup>-1</sup>	30,6 ± 2,6	1 (3,5)	922 ± 27 (1573 ± 327)	430 ± 60 (827 ± 131)
NPsAg 0,2 mg L <sup>-1</sup>	55,5 ± 1,8	1 (3,5)	729 ± 97 (1574 ± 224)	590 ± 3 (743 ± 258)

<sup>a</sup> Los valores son dados como la media ± desviación estándar. <sup>b</sup> Los momentos de muestreo (expresados en horas tras el comienzo del experimento), se corresponden con el momento de recogida de muestras en los ensayos de biodegradación en columnas, 1 h (~2,5 VP) y 3,5 h (~6 VP). <sup>c</sup> N<sub>des</sub>, naftaleno desorbido desde la anilla. <sup>d</sup> N<sub>min</sub>, naftaleno mineralizado



**Figura IV.42** Desorción de naftaleno desde la anilla de silicona colocada en el fondo de un tubo de ensayo en fase acuosa bajo agitación continua en presencia (■) y ausencia (□) de exudados (A) y NPsAg (B)

## Resultados

Se llevó a cabo un balance de masas para cuantificar la cantidad de naftaleno radiactivo recuperado en comparación al que originalmente se empleó para cargar las anillas, como punto de partida en los experimentos. El naftaleno pudo medirse como  $^{14}\text{-CO}_2$  producido por las bacterias tras la mineralización, ya que se recogió en trampas de sosa. En el experimento ensuspensiones, el naftaleno que quedó desorbido en solución sin degradar se midió directamente en el contador de centelleo. El naftaleno no desorbido de la anilla se extrajo con metanol y se midió directamente en el contador de centelleo. mientras que aquel que quedó en las columnas de arena sin ser degradado, se midió con la ayuda del oxidizador. El balance de radiactividad fue entre el 65 y 85 % de recuperación para el caso de los experimentos en suspensiones y entre el 75 al 90 % para los experimentos en columna.

## **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN**

## **V.1 MOVILIDAD BACTERIANA**

### **V.1.1 MOVILIDAD BACTERIANA INTRÍNSECA**

En este trabajo observamos que la movilidad celular cambiaba a lo largo del ciclo celular. Al comienzo de la fase exponencial, la densidad celular es baja y la concentración de nutrientes alta, por lo que el gasto energético en movilidad no es rentable para las células bacterianas, que pueden abastecer sus requerimientos nutricionales sin movilizarse activamente. A medida que avanza el ciclo, los nutrientes empiezan a escasear, y aumenta la concentración de metabolitos secundarios que podrían resultar tóxicos. Bajo estas condiciones, la movilidad bacteriana pasa a ser una ventaja para aquellas bacterias que tengan la capacidad de desplazarse hacia ambientes más favorables, siendo aún más ventajoso el poder detectar atrayentes que supongan una fuente de carbono para el microorganismo (mediante el fenómeno de quimiotaxis). En hábitats donde los nutrientes no sean escasos, pero su distribución no sea homogénea, no es necesario dirigir el movimiento por quimiotaxis; simplemente interesa tener la capacidad de moverse de forma aleatoria para asegurarse la ingesta de nutrientes. Es por ello, por lo que la movilidad aleatoria se ha seguido manteniendo a lo largo de la evolución, sin ser desvanecida por el movimiento dirigido que supone la quimiotaxis, que se hace relevante en condiciones de escasez de alimento (Wei y col., 2011).

En nuestras condiciones experimentales, la movilidad máxima se observó en fase estacionaria temprana (máximo grado de movilidad y mayor porcentaje de células móviles). En un estudio llevado a cabo con *Escherichia coli*, la movilidad máxima ocurría también en esta fase del ciclo, donde el número de flagelos fue máximo así como la longitud de los mismos. A medida que se avanzó en el ciclo, el grado de movilidad fue disminuyendo. En fase estacionaria tardía, el número y longitud de flagelos se mantuvo constante, por lo que la disminución en la velocidad se debió a una disminución de la fuerza protón motriz que controla la rotación del motor flagelar (Amsler y col., 1993). Tras la inoculación del cultivo bacteriano, la movilidad fue muy baja puesto que a las bacterias no les sale rentable gastar energía en hacer girar el rotor flagelar. Al final de la fase exponencial, los nutrientes comienzan a escasear y es entonces cuando la movilidad comienza a cobrar gran importancia. Estos datos

están en concordancia con el estudio de la menor dispersión observada para el caso de la estirpe *P. putida* G7 cuando los nutrientes en el medio fueron abundantes (Banitz y col., 2011).

Se ha comprobado que la velocidad del rotor flagelar de *E. coli* en fase exponencial es mayor debido a la alta actividad de la enzima fosfodiesterasa que mantiene el nivel de GMP<sub>c</sub> bajo. En fase estacionaria tardía, la actividad de la enzima es menor y el aumento de GMP<sub>c</sub> provoca que el rotor flagelar disminuya su velocidad (Armitage y Berry, 2010). Es posible que las diferencias observadas en nuestro estudio en cuanto a la movilidad bacteriana de la estirpe *P. putida* G7 a lo largo de las fases de crecimiento, se debieron al efecto del rotor flagelar. En fase exponencial tardía, el rotor flagelar opera a mayor velocidad, haciendo que los cambios de dirección en el patrón de movilidad celular sean mayores, tal como describimos en el epígrafe IV.6.4.1.1.

Además de la movilidad bacteriana, la forma y el tamaño celular también pueden cambiar a lo largo de las fases del ciclo celular. En nuestra investigación, comprobamos que la longitud celular fue mayor en la fase exponencial, 1,88  $\mu\text{m}$  en comparación con la longitud celular en fase temprana estacionaria que fue de 1,58  $\mu\text{m}$ . La alta densidad poblacional y la escasez de nutrientes en fase estacionaria, hizo que el tamaño celular fuera menor.

### V.1.2 RESPUESTA TÁCTICA POSITIVA

El análisis de la movilidad de las trayectorias celulares individuales sirve como herramienta para elucidar la respuesta táctica de un microorganismo frente a un determinado compuesto, tal como se hizo para demostrar la reacción de atracción de *Azospirillum lipoferum* hacia el ácido protocatéquico, donde se observó que la frecuencia de cambios de dirección disminuyó en presencia del atrayente (Lopez-de-Victoria y col., 1995).

El patrón movimiento de *P. putida* G7 mantenido sin cambios de dirección que observamos en presencia de salicilato se atribuyó a su efecto como atrayente en la respuesta táctica. La quimiotaxis positiva hacia salicilato se describió con anterioridad por otros autores (Grimm y Harwood, 1997), pero el análisis de las trayectorias celulares se ha descrito en este trabajo de investigación. La respuesta táctica positiva hacia salicilato se confirmó por coincidir con el patrón de movilidad descrito con anterioridad para la misma estirpe, pero con el ácido benzoico como atrayente (Harwood y col., 1989).

Las trayectorias curvas o rectilíneas mantenidas sin cambios de dirección en presencia del ácido benzoico fueron interpretadas como parte de la respuesta de atracción táctica. El análisis de la respuesta táctica positiva en cuanto al comportamiento móvil es decir, la descripción de su patrón de movilidad, se describió con anterioridad para el caso de *Escherichia coli*. La media de la velocidad angular y lineal fueron directa e inversamente proporcionales a la frecuencia de cambio de dirección, respectivamente (Sager y col., 1988).

### V.1.3 RESPUESTA TÁCTICA NEGATIVA

La respuesta de repelencia hacia las nanopartículas de plata (NPsAg) se ha descrito por primera vez para la estirpe *Pseudomonas putida* G7 en estudios de quimiotaxis y movilidad llevados a cabo por nuestro grupo de investigación. Cuando la bacteria detectó un repelente en solución, como las nanopartículas de plata, su patrón de movimiento cambió, de forma que las células pasaron a seguir trayectorias con una frecuencia mayor de cambios en la dirección.

Bajo estas condiciones, el movimiento se describió como abrupto, donde los cambios de dirección eran mayores de  $1000^\circ\text{s}^{-1}$ . Se ha atribuido al efecto directo de las nanopartículas sobre la superficie bacteriana como mecanismo de repelencia, ya que los iones plata en solución no provocaron reacción tática alguna en la bacteria. Se ha descrito la respuesta de toxicidad frente a NPsAg como un mecanismo que libera los iones plata al estar en contacto con la superficie celular bacteriana, haciendo que su acción antimicrobiana sea más eficaz (Xiu y col., 2012).

Un mecanismo parecido se describió en el estudio de quimiotaxis de *Escherichia coli* frente a nanopartículas de oro, en donde se concluyó que el efecto bactericida se debió al colapso del potencial de membrana, que condujo a la disfunción de la ATPasa de membrana y al desajuste del nivel energético en la célula (Cui y col., 2012). También fue descrito anteriormente para el efecto biocida de NPsAg, la posibilidad de que las nanopartículas se adhirieran a la superficie celular de membrana, alterando funciones vitales celulares como la permeabilidad y la respiración (Morones y col., 2005).

La respuesta de repelencia puede entenderse como un mecanismo de aviso para la toxicidad que ocurre a concentraciones superiores del compuesto. De esta manera, las trayectorias celulares se caracterizaron por una alta frecuencia en cambios de dirección, que hizo que los recorridos en línea recta fuesen más cortos, dando como resultado un movimiento más abrupto. Este patrón de movilidad fue descrito por primera vez para la estirpe *Escherichia coli* en su reacción de repelencia hacia etilenglicol y glicerol (Oosawa y Imae, 1983).

Posteriormente se han descrito respuestas de repelencia al peróxido de hidrógeno, hipoclorito y N-clorotaurina por parte de *E. coli* (Benov y Fridovich, 1996) y hacia pireno o antraceno para *Pseudomonas putida* (Ortega-calvo y col. 2003). El método capilar para la detección de la respuesta de repelencia fue descrita por primera vez para la estirpe *E. coli* frente a los iones  $\text{Co}^{++}$  y  $\text{Ni}^{++}$ .

La respuesta de repelencia puede manifestarse de forma directa por reconocimiento de la superficie celular. Tal como se ha descrito en un estudio llevado a cabo sobre el efecto en la adsorción de Ni<sup>2+</sup> en la superficie celular de la estirpe *E. coli* K-12 (AW607) en la respuesta de repelencia frente a los iones en solución (Borrok y col., 2005). La magnitud de la respuesta táctica negativa estuvo relacionada con la concentración de iones Ni<sup>2+</sup> adsorbidos a la superficie celular bacteriana.

#### **V.1.4 RESPUESTA DE HIPERMOVILIDAD**

La respuesta de hipermovilidad observada en presencia de glucosa se documenta por primera vez en esta Tesis Doctoral. El número de picos con aceleraciones mayores de  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  fue muy alto en presencia de glucosa 10 mM, con respecto al control en ausencia de compuesto. Esta respuesta de hipermovilidad puede atribuirse a un efecto disipador de energía en un medio con un exceso de nutrientes. Algo parecido ocurrió en el caso del metabolismo fermentativo de *Escherichia coli* en presencia de un exceso de glucosa en el medio (Kleman y Strohl, 1994). La glucosa se transformó en acetato cuando el consumo superó su conversión en biomasa y CO<sub>2</sub>. De esta manera, la liberación de acetato constituyó un mecanismo bacteriano para liberar o disipar energía.

La quimiotaxis positiva hacia glucosa se ha estudiado para el caso de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, pero no se han encontrado referencias bibliográficas que identifiquen la glucosa como un atrayente para la especie *Pseudomonas putida*.

#### **V.1.5 EFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LA MOVILIDAD BACTERIANA**

El análisis de la movilidad bacteriana en presencia de materia orgánica disuelta supuso un enfoque más cercano a una situación natural en los ecosistemas microbianos, que suelen enfrentarse a mezclas complejas de distintos compuestos orgánicos, con distinta susceptibilidad para su asimilación.

Los exudados vegetales suponen una fuente de materia orgánica disuelta que fue detectada por la estirpe *Pseudomonas putida* G7 incluso a concentraciones bajas (del orden de  $16 \text{ mg L}^{-1}$ ). La respuesta quimiotáctica bacteriana hacia exudados de origen vegetal se ha descrito en diversos estudios (Gitte y col., 1978; Gaworzewska y Carlile, 1982; Scher y col., 1985; Barbour y col., 1991) en los que se confirmó la respuesta de atracción, mediante ensayo capilar y de "swarm plate". La quimiotaxis positiva se ha atribuido a los componentes mayoritarios en los exudados vegetales (aminoácidos, ácidos orgánicos y ácidos grasos), siendo confirmada además, la atracción táctica hacia estos componentes de forma individual. Al igual que en nuestro estudio, la máxima contribución para la respuesta de atracción se debió a la detección de los aminoácidos, dada la máxima respuesta quimiotáctica observada hacia estos componentes. En nuestro estudio, dado que estábamos interesados en el transporte a través de materiales porosos, hemos avanzado en la caracterización del movimiento celular individual, en cuanto a la descripción de la velocidad y cambios de dirección (RCDI) de las trayectorias celulares analizadas. La respuesta quimiotáctica positiva hacia los exudados de raíces de girasol (a  $129 \text{ mg L}^{-1}$  y  $16 \text{ mg L}^{-1}$ ) detectada mediante el ensayo capilar se corroboró por el análisis de sus trayectorias celulares.

En cuanto a la respuesta táctica frente a exudados de origen vegetal detectada por los cambios en el patrón de movimiento, cabe destacar el estudio de la atracción hacia los componentes de los exudados de *Macrophomina phaseolina*, un hongo fitopatogénico, por parte de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*. La atracción se manifestó como una disminución de la frecuencia de cambios de dirección de 1,5 veces en presencia de los aminoácidos y azúcares presentes en los exudados, y 1,2 veces para los ácidos orgánicos constituyentes (Singh y Arora, 2001).

Nuestro estudio de la respuesta táctica de atracción de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 hacia exudados de raíces de girasol está muy relacionado con los resultados obtenidos para el caso del estudio anterior, pudiéndose concluir que la mayor contribución a la respuesta de atracción se debió a los aminoácidos presentes en los exudados vegetales. El análisis de la respuesta táctica frente a los exudados fue más difícil de esclarecer, ya que se trata de una mezcla de sustancias, en la que el análisis de sus componentes por separado pudo ayudar a mejorar el estudio.

De esta manera, los exudados vegetales se confirman como un potente atrayente para las células bacterianas que pueden detectarlos en el suelo, incluso a concentraciones bajas del orden de  $16 \text{ mg L}^{-1}$  (véase figura IV.7), poniendo en evidencia la importancia de las interacciones entre diversos compartimentos en el ecosistema (suelo-planta-microorganismo). En nuestro estudio, la interacción entre plantas y comunidades bacterianas del suelo mediante la quimiotaxis positiva hacia exudados vegetales puede jugar un papel importante en la biodegradación de contaminantes adsorbidos al suelo en las proximidades de la planta, haciendo que la población microbiana aumente en el foco de contaminación debido a la movilidad dirigida mediada por quimiotaxis. La respuesta de atracción detectada hacia exudados de raíces por parte de bacterias asociadas a la rizosfera provocó una mayor degradación de HAP, tales como el naftaleno, fenantreno o pireno (Ortega Calvo y col., 2003).

No se observó respuesta táctica frente a los ácidos húmicos y el fertilizante oleofílico. Es posible que, en el caso de los AH, al tratarse de moléculas de estructura compleja, las células bacterianas no reconocieron estos compuestos como fuente de carbono y/o energía, pasando desapercibidos para los microorganismos en el suelo.

Por su parte, la detección del fertilizante oleofílico podría suponer una ventaja para aquellas bacterias que pudieran ejercer una respuesta quimiotáctica positiva hacia este compuesto. Ya que se ha comprobado que el fertilizante funciona como bioestimulante en técnicas de biorremediación.

Recientemente, se ha descrito el mecanismo de actuación. El fertilizante oleofílico supone una fuente de nutrientes de N y P en la interfase NAPL-agua, bajo condiciones de baja biodisponibilidad de contaminantes hidrofóbicos, haciendo que los microorganismos proliferen justo en la interfase, como un mecanismo dirigido de bioestimulación (Tejeda Agredano y col., 2011).

Para el caso de los ácidos húmicos (AH), la detección quimiotáctica hacia la materia orgánica disuelta por parte de *P. putida* G7 no fue comprobada por el análisis de sus trayectorias celulares. Por su parte, los resultados del ensayo capilar atribuyeron propiedades atrayentes a la concentración de 138 mg L<sup>-1</sup>, ya que el número de células que entró en los capilares que contenían los AH fue mayor que en ausencia del compuesto. Se ha comprobado que el desplazamiento celular es menor en presencia de una fuente rica de nutrientes (Banitz y col., 2011). Los AH podrían suponer una fuente de nutrientes para *P. putida* G7, haciendo que las bacterias que entran en los capilares que contienen AH, permanecieran en el interior, debido a una menor dispersión o desplazamiento hacia el exterior del capilar. En nuestro estudio, no hemos comprobado el crecimiento de la bacteria con AH, aunque en el caso de que se tratara de una fuente de nutrientes para los microorganismos, la concentración de los mismos (138 mg L<sup>-1</sup>) no permitiría el crecimiento celular dentro del capilar (DO<sub>600nm</sub> de 0,02). De todos modos, los AH no se reconocen como una fuente de carbono utilizada comúnmente por las células bacterianas. En un estudio llevado a cabo en el año 1989 para determinar la capacidad degradadora de bacterias heterótrofas sobre compuestos de naturaleza húmica, se concluyó que los AH no fueron fácilmente metabolizados, tanto los de origen natural como artificial, así como los ácidos fúlvicos (que resultaron ser aún más difícilmente degradables) (Thomas, 1997).

La respuesta táctica positiva hacia ácidos húmicos en particular, y sustancias húmicas en general, no ha sido documentada para el caso de los microorganismos, pero cabe destacar el efecto de atracción táctica positiva que supuso la materia húmica, tanto natural como artificial para el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Menzel y col., 2005).

El papel del fertilizante oleofílico en la respuesta táctica bacteriana no pudo comprobarse ni mediante el ensayo capilar ni por el análisis de sus trayectorias celulares. Aunque cabe destacar que la bacteria presentó una movilidad acelerada en presencia del compuesto tanto a la concentración de 124 mg L<sup>-1</sup> como a la de 13 mg L<sup>-1</sup>.

Esto pudo deberse a que el fertilizante supone una fuente adicional de N y P, que pudo hacer que la bacteria manifestase una actividad incrementada en respuesta a un aporte extra de nutrientes. El fertilizante oleofílico supondría una fuente de nutrientes adicional. Además, se ha comprobado que el S-200 actúa de manera dirigida (Tejeda Agredano y col., 2011). La fertilización localizada en la interfase NAPL-fase acuosa provocó un aumento de la biodegradación debido a la acción bioestimulante sobre la degradación de fenantreno adsorbido a NAPL.

## **V.2 PAPEL DE LA MOVILIDAD BACTERIANA EN LA ADHESIÓN**

La frecuencia de los cambios de dirección se ha relacionado, en esta Tesis, con la probabilidad de interaccionar con la superficie del colector. Cada momento de cambio de dirección pudo aumentar la probabilidad de que las células colisionasen con la superficie. Nuestra hipótesis es que la movilidad celular confiere a la bacteria una mayor capacidad de adherirse al colector, ya que los valores de la eficiencia de adhesión fueron menores para las células inactivas o inmóviles, frente a los valores obtenidos para la bacteria activa. Así, pues, el empleo de efectores tácticos puede modificar la adhesión bacteriana a superficies sólidas cambiando el patrón de movilidad, y con ello, la frecuencia de cambios de dirección.

Los datos de adhesión a la arena en los experimentos llevados a cabo en ausencia de flujo continuo en viales de cristal en agitación, apoyaron la hipótesis del efecto del patrón de movilidad en la adhesión bacteriana, ya que a un mayor número de cambios de dirección, se observó un % mayor de adhesión a la arena. El mismo efecto se determinó para la adhesión a las anillas de silicona en presencia de exudados vegetales y de las nanopartículas de plata, que provocaron menor y mayor adhesión, respectivamente, en comparación al control en ausencia de compuesto.

El número de cambios de dirección también estuvo relacionado con la mayor adhesión a la interfase NAPL-fase líquida. Las NPsAg en solución provocaron que las células bacterianas quedasen asociadas a la interfase. Los resultados descritos en otra Tesis Doctoral llevada a cabo con anterioridad en nuestro grupo de trabajo, mostraron que la adhesión bacteriana al NAPL en presencia de naftaleno fue menor que en su ausencia (Velasco-Casal, 2007). La desorción de naftaleno fue mayor debido a la taxis positiva hacia el mismo, haciendo que la bacteria permaneciera en fase acuosa, siendo por tanto, la adhesión a la fase orgánica (NAPL) más baja que en ausencia de naftaleno. Estos datos están en concordancia con los obtenidos en un trabajo de investigación donde se estudió el efecto de la quimiotaxis en la acumulación bacteriana en la interfase NAPL-agua. Se concluyó que la movilidad era el factor determinante para la adhesión, ya que no hubo diferencias para la estirpe no quimiotáctica pero móvil (Che-) y la quimiotáctica (Che-), mientras que la adhesión fue menor para la estirpe no móvil (Mot-) (Law y Aitken, 2003).

Nuestro estudio postula que la adhesión a NAPL se puede fomentar por el empleo de un repelente como las NPsAg que provoca una mayor acumulación en la interfase NAPL-agua debido a la mayor frecuencia de cambios de dirección, y por tanto una alta adhesión.

### **V.3 PAPEL DE LA MOVILIDAD BACTERIANA EN EL TRANSPORTE**

#### **V.3.1 MOVILIDAD BACTERIANA INTRÍNSECA**

La movilidad bacteriana permite a las células aumentar la probabilidad de colisionar con el colector, aumentando de esta manera, la retención bacteriana sobre superficies sólidas. Tal es el caso de los resultados obtenidos en los ensayos de transporte de la estirpe *P. putida* en fase estacionaria temprana, cuya retención fue aproximadamente del 90%. Este hecho coincide con un estudio de Becker y colaboradores donde se concluyó que la movilidad bacteriana aumentó la probabilidad de interaccionar con la superficie sólida. La movilidad bacteriana permitió a las células colisionar de manera eficaz con la superficie sólida debido al aumento de la tasa de difusión, que provocó un incremento en la tasa de adsorción. Además, la movilidad ofreció a la bacteria la posibilidad de

penetrar en el mínimo secundario aumentando la probabilidad de interaccionar de forma reversible (Becker y col., 2004).

#### **V.3.1.1 Factores fisiológicos que afectan al transporte y deposición celular**

Algunos autores han señalado que la fase de crecimiento en que se encuentre la estirpe bacteriana es un factor determinante para la deposición bacteriana en superficies sólidas. Tal fue el estudio en el que se concluyó que la uniformidad en la carga superficial de la membrana celular podía afectar a la deposición bacteriana (Walker y col., 2005). De hecho, cuando ésta era uniforme, como ocurrió en fase exponencial, la repulsión se vio favorecida, siendo la adhesión más baja. Pero por el contrario, en fase de latencia, la heterogeneidad de la carga superficial hizo que la repulsión fuera menor, y por tanto, la adhesión se vio favorecida. Este dato está en contraposición a lo indicado en otro trabajo de investigación (Gargiulo y col., 2007) donde se concluyó que la estirpe *Deinococcus radiodurans* disminuyó la hidrofobicidad de su superficie bacteriana a medida que avanzó en el ciclo celular.

En el estudio de Walker y colaboradores, el experimento de transporte se llevó a cabo en un sistema estanco denominado por sus siglas en inglés como RSPF (Radial Stagnation Point Flow) donde se visualiza y cuantifica la deposición de bacterias individuales en una superficie uniforme plana de cuarzo a intervalos regulares (de 10 a 20 segundos). Bajo estas condiciones experimentales, la adhesión bacteriana estuvo favorecida en el mínimo primario (donde la reversión no es posible), mientras que en el trabajo de Gargiulo y col., el experimento de transporte en columnas permitió la adhesión reversible en el mínimo secundario, siendo mayor la retención en fase exponencial que en fase de latencia, tal como se ha observado en los resultados de los experimentos de transporte mostrados en esta Tesis Doctoral.

En nuestro caso, hemos profundizado aún más porque se comprobó que, además de la hidrofobicidad y la carga superficial de la superficie bacteriana, dependiendo de la fase del ciclo en que se encuentre, su patrón de movilidad es un importante factor influyente en su deposición.

En el estudio de transporte llevado a cabo por Gargiulo y colaboradores, la estirpe bacteriana *Deinococcus radiodurans* (aerobia estricta gram

positiva), disminuyó la hidrofobicidad de su pared celular a medida que avanzó en el ciclo celular, ya que la carga de proteínas disminuyó en la pared celular a medida que la bacteria agotaba los nutrientes del medio (Castellanos y col., 2000), y con ello la hidrofobicidad marcada por estos componentes. De esta manera, la deposición fue menor a medida que avanzó el ciclo, tal como hemos observado en nuestro estudio para la estirpe *P. putida* G7, donde la deposición fue mayor en fase tardía exponencial, seguida de la fase temprana estacionaria y la entrada en fase de latencia.

Además de la movilidad bacteriana, la forma y el tamaño celular también pueden cambiar a lo largo de las fases del ciclo celular. La mayoría de los estudios acerca del efecto del tamaño del coloide o célula bacteriana en la deposición sobre superficies sólidas concuerdan en que a menor tamaño, menor es la deposición, ya que el transporte se ve favorecido por la baja resistencia a la advección causada por el flujo del fluido. Tal es el caso del estudio del transporte bacteriano de diferentes géneros como *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Arthrobacter*, que difieren en la composición y propiedades de su superficie celular, así como en su tamaño. Se concluyó que el tamaño celular era un factor importante a tener en cuenta en la dinámica del transporte, pero que era necesario valorar otros parámetros como la movilidad o la caracterización de la superficie celular en cuanto a carga superficial e hidrofobicidad (Gannon y col., 1991). La mayor longitud celular se relacionó con el aumento de la deposición debido al efecto físico de la filtración coloidal y al efecto de tensión (traducido del inglés, "straining") (Weiss y col., 1995). En nuestra investigación, comprobamos que la longitud celular fue mayor en la fase exponencial, 1,88  $\mu\text{m}$  en comparación con la longitud celular en fase temprana estacionaria que fue de 1,58  $\mu\text{m}$ . En este caso, la mayor adhesión bacteriana en las columnas de transporte se explicó por el patrón de movilidad que presentaron las células individuales en fase exponencial, y no por su mayor longitud que no es tan grande como para provocar la retención bacteriana por el efecto de tensión anteriormente comentado. Además de la longitud y agregación celular, la mayor frecuencia de cambios de dirección en su patrón de movimiento, provocó una mayor probabilidad de adhesión a la arena. Lo que se tradujo en la salida bacteriana tras el

bombeo de 2 VP, una vez que la arena se colapsó de células bacterianas. La agregación celular en fase exponencial y el consecuente aumento en la retención bacteriana, ha sido anteriormente descrita. En la fase exponencial, las células tendieron a unirse formando agregados de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro en condiciones de alta concentración de nutrientes, como inicio del proceso de formación de biofilms en un microhábitat favorable para la reproducción. Por el contrario, en la fase estacionaria, las células permanecen de forma individual sin formar agregados, con el objetivo de no adherirse a la superficie y no formar biofilms, sino de ir en busca de nuevo alimento y nuevos hábitats más favorables para la reproducción bacteriana. De esta manera, la deposición y adhesión bacteriana sobre superficies sólidas se vio favorecida en la fase exponencial (Gargiulo y col., 2008) debido al efecto de colmatación.

Aunque cabe destacar algunas referencias bibliográficas donde se ha descrito el caso contrario. Es decir, se observó una disminución de la retención bacteriana al aumentar la longitud celular. La deposición de una bacteria heterotrófica marina FL2 aislada del interior de un bivalvo (*Arctica islandica*) fue mayor al disminuir su longitud celular, coincidiendo con el inicio de la fase de latencia. La causa se atribuyó a la diferencia en la excreción de exopolímeros durante la fase de latencia y la exponencial. Los exopolímeros en fase de latencia provocaron la agregación de las bacterias y el diámetro celular fue mayor de 7  $\mu\text{m}$ , provocando la retención bacteriana, debido al efecto de la colmatación (Heise y Gust, 1999). Además de la excreción de exopolímeros que pudieran afectar a la adhesión bacteriana, hay que tener en cuenta el efecto de la termodinámica en la interacción de superficies entre bacteria y superficie sólida (Chen y Strevett, 2001). En fase estacionaria, la adhesión bacteriana sobre la matriz sólida fue mayor, lo cual se atribuyó al incremento de grupos funcionales en la membrana celular que fomentan los enlaces por puentes de hidrógeno. Esto mismo podría haber ocurrido en nuestro estudio cuando la estirpe *P. putida* G7 se cultivó con triptona. Aunque la superficie celular no cambió significativamente en cuanto a carga superficial e hidrofobicidad respecto al cultivo con salicilato (control), podría ser que hubiera un menor número de grupos funcionales para interaccionar por puentes de hidrógeno con la superficie de arena, y con ello, la deposición fue menor. Para ello, podríamos haber estudiado la

distribución de los grupos funcionales en la superficie celular mediante espectroscopía infraroja, tal como se hizo en el citado artículo. Otro estudio que apoya la teoría de que a mayor longitud celular, menor deposición bacteriana, fue el estudio del transporte de la estirpe *Rhodococcus* sp. strain DN22 en columnas empaquetadas con arena (Priestley y col., 2006)

Como ya hemos comentado, la fase del ciclo celular es un factor que afectó a la deposición bacteriana sobre superficies sólidas, viéndose involucradas algunas propiedades celulares como la longitud, la hidrofobidad y carga de superficie o la movilidad. Al comienzo de la fase estacionaria, todas células eran móviles siguiendo trayectorias rectilíneas con cambios de dirección en su movimiento. La adhesión a la arena en las columnas de transporte estuvo favorecida por la movilidad marcada por los cambios de dirección. Una prueba de ello, es que la retención de bacterias inmóviles (por sonicación o por el efecto de una temperatura de 45 °C) fue menor que cuando la bacteria era móvil.

#### **V.3.1.2 Factores físicos que afectan al transporte y deposición celular**

Las células inmóviles se transportan como coloides en suspensión, arrastradas por la fuerza advectiva del fluido, sin interactuar con la superficie de arena (Liu y col., 2011). Esta pudo ser la causa del aumento de transporte bacteriano observado en nuestro estudio para el caso de las células inactivadas con los biocidas  $\text{NO}_3\text{Ag}$  y  $\text{HgCl}_2$ , así como para el caso de las células sonicadas y sometidas a 45 ° de temperatura (durante 2 horas).

En un estudio de la deposición bacteriana de células de *E. coli*, se comprobó que las especies flageladas móviles presentaron una mayor deposición que las flageladas inmóviles o las no flageladas (que fueron las se transportaron a mayor velocidad) (Haznedaroglu y col., 2010). Las bacterias flageladas móviles pudieron emplear el rotor flagelar para colocarse en espacios de poros inaccesibles para las células inmóviles. De esta manera, la movilidad fue un factor suficiente para permitir el transporte contracorriente y, por ende, la deposición en sitios del colector que son inaccesibles para las células inmóviles (debido al efecto de sombra), que comentaremos a continuación. Aunque las células flageladas no móviles también presentaron valores mayores de adhesión que las inmóviles, el flagelo sólo cobró importancia bajo condiciones

favorables para la adhesión (en ausencia de fuerzas repulsivas), donde la distribución peritrica de los flagelos favoreció la deposición en los poros de arena.

El efecto de sombra se conoce como la zona que queda inaccesible para la adhesión debido a la fuerza de cizalla del fluido a su paso por la superficie del colector. La zona de sombra es menor para aquellas bacterias móviles por flagelo que pueden acceder a estas zonas por la presencia del rotor flagelar que permite la propulsión contracorriente (Ko y Elimelech, 2000).

El transporte bacteriano puede verse afectado por factores físicos como la fuerza iónica, la velocidad de flujo y el tamaño de partícula del colector.

Según la teoría DLVO (Van Loosdrecht y col., 1987; Van Loosdrecht y col., 1987a; Van Loosdrecht y col., 1989; Van Loosdrecht y col., 1990), a menor fuerza iónica, aumenta la doble capa electrostática, por lo que la repulsión entre célula-colector es mayor. La concentración electrolítica influye tanto en la cinética de deposición inicial así como en la dinámica de interacción (Liu y col., 1995). El aumento de la fuerza iónica (o de la concentración electrolítica) provocó una bajada del potencial electroquímico que se atribuyó a la compresión de la doble capa eléctrica y a la reducción del potencial de Stern. Bajo estas condiciones, la repulsión entre superficie bacteriana y superficie del colector se vio desfavorecida. La corta distancia para la interacción (ya que la doble capa es más delgada) aumentó la probabilidad de adhesión bacteriana. En nuestro estudio, comprobamos que al bajar la fuerza iónica del medio, se produjo un aumento de la repulsión porque el espesor de la doble capa aumentó y con ello, la repulsión y el transporte bacteriano.

Según la teoría de filtración de coloides (Rijnaarts y col., 1996a; 1996b), la disminución de la velocidad del fluido en las columnas de transporte con materiales porosos saturados aumenta el número de colisiones de los coloides con la superficie del colector, y con ello, la retención aumenta. Esto no es fácilmente aplicable para el caso de las células móviles, que pueden conseguir bajar la intercepción favorecida por la bajada de la velocidad del fluido (por interacciones hidrodinámicas) y depositarse menos en la superficie. Cuando la velocidad del fluido es más alta, la movilidad bacteriana no supone una ventaja tan importante. En

condiciones de alta velocidad de flujo, las interacciones hidrodinámicas favorecen las fuerzas repulsivas para transportar las células que van acercándose al colector. Mientras que a una menor velocidad de flujo, aumenta el número de colisiones con el colector, lo que conlleva a un incremento de la retención bacteriana (Camesano y Logan, 1998). En nuestro estudio, comprobamos que la retención bacteriana en las columnas fue mayor al disminuir la velocidad de flujo. El tiempo de residencia en las columnas es mayor, aumentando la probabilidad de intercepción de las células bacterianas con el colector. Este dato se apoya en un estudio en el que se puso de manifiesto que a mayor tiempo de residencia, mayor adhesión al colector (Liu y col., 2011).

El tamaño de poro del material poroso empleado también afecta al transporte bacteriano. Las simulaciones "Montecarlo" del estudio de Kevin Kusy y Roseanne Ford sugieren que a menor tamaño de poro y mayor superficie específica para la adhesión, la deposición se ve favorecida frente al transporte. La reducción en el tamaño de poro disminuye la probabilidad de que la bacteria penetre a través de los canales verticales existentes entre las partículas del medio poroso (Kusy y Ford, 2007). Este hecho provocó que al aumentar el diámetro de arena, en el estudio en columnas llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, la salida bacteriana fue mayor desde 1 VP, indicando que la retención en las columnas fue más baja.

En nuestro trabajo, hemos comprobado que las células sonicadas (desprovistas de flagelo) se depositaron en la superficie de arena en menor grado que las células sometidas a 45 °C o las que fueron inactivadas con los biocidas nitrato de plata y cloruro de mercurio. La sonicación celular pudo afectar a la membrana celular en cuanto a la reorganización de sus componentes, haciendo que la hidrofobicidad fuese mayor tras la sonicación celular, lo que desencadenó cierta retención bacteriana respecto al transporte bacteriano de las células inactivas, donde la salida bacteriana a través de las columnas fue casi del 80 %, frente al 60 % observado en el caso del cultivo sonicado. En un estudio sobre el efecto de la sonicación en la membrana celular de *E.coli* se determinó, mediante visualización al MET, que a la frecuencia de 20 kHz, la membrana

citoplasmática estaba retraída de la membrana externa. E incluso, algunas células habían perdido el contenido citoplasmático (Koda y col., 2009).

Previamente a los estudios sobre el efecto del flagelo en la deposición celular, se describió que las células móviles de *Pseudomonas fluorescens* (Mot<sup>+</sup>) presentaron mayor adhesión y colonización de la superficie que la estirpe mutante Mot<sup>-</sup>, lo que se observó por una mayor dispersión celular sobre superficies para el caso de la estirpe móvil (Korber y col., 1989).

Como hemos comentado en este epígrafe, la movilidad bacteriana aumenta la posibilidad de deposición celular sobre superficies sólidas, pudiendo ser modificada, a su vez, a lo largo del ciclo celular. Así como hemos descrito otras propiedades como la longitud celular, la abundancia de grupos funcionales para la interacción por puentes de hidrógeno o la hidrofobicidad y carga superficial bacteriana que también varían a lo largo de las fases del ciclo celular, y que también, tienen un efecto en la deposición y el transporte bacteriano a través de medios porosos saturados.

De esta manera, las estirpes móviles serían útiles en el empleo de técnicas de bioremediación in situ, ya que podrían acceder a poros de diámetro pequeños o finales muertos que son inaccesibles para las células inmóviles. Aunque por otro lado, la desventaja sería que la velocidad de migración en el medio poroso es muy lenta (Becker y col., 2003). Para ello, a continuación comentaremos la posibilidad de mejorar el transporte bacteriano con el uso de compuestos que cambian el patrón de movilidad, fomentando o disminuyendo la adhesión bacteriana. De este modo, podríamos conducir el movimiento bacteriano a través de medios porosos según sea conveniente para aumentar la degradación de los contaminantes.

### **V.3.2 INFLUENCIA DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN EL TRANSPORTE BACTERIANO**

La respuesta táctica se hace relevante en condiciones de escasez de nutrientes, como ocurre en el comienzo de la fase estacionaria. Es por eso que se seleccionó este momento para llevar a cabo los experimentos con el fin de estudiar el papel de la quimiotaxis en el transporte a través de medios porosos.

Los patrones de movilidad característicos de la estirpe bacteriana *P. putida* G7 en presencia de los distintos quimioefectores utilizados (NPsAg, glucosa

y exudados vegetales) provocó que el transporte bacteriano adquiriera una curva diferente según el patrón de movilidad observado. Tal es el caso del aumento de transporte a partir de 1 VP, en presencia del atrayente salicilato o en presencia de los exudados vegetales. El movimiento rectilíneo caracterizado por una baja frecuencia de los cambios de dirección, hizo que la intercepción por el colector de arena fuese baja, y con ello, el transporte aumentó desde la salida del frente bacteriano (a 1 VP). Este dato fue confirmado, para el caso del salicilato, en estudios previos del grupo de investigación (Velasco Casal y col., 2008) y se ha confirmado con el empleo de exudados vegetales.

En cambio, la curva de transporte en presencia de un repelente, confirmó que la salida bacteriana se dio a partir de 2 VP, indicando que existió retención en la columna de arena. El incremento en la retención se ha atribuido a la mayor probabilidad de interacción bacteriana en presencia de un repelente, debido a la alta frecuencia de cambios de dirección. Al aumentar la adhesión a la arena, se produjo un colapso del colector que provocó la salida bacteriana de las células que se acercaban a la superficie (siendo repelidas por las que ya estaban adheridas) y, por tanto, se transportaron a través de las columnas porque no pudieron interaccionar con la superficie de arena. Este tipo de transporte se ha observado en otros estudios en los que se propuso el bloqueo del colector como explicación al aumento de transporte bacteriano a partir de 2 VP (Jucker y col., 1996; Rijnaarts y col., 1996a; Camesano y Logan, 1998).

Aunque la teoría de filtración de lecho limpio predice que la concentración coloidal (o bacteriana) no tiene efecto en la retención (Dabroś y Van de Ven, 1982) se ha comprobado que la alta concentración coloidal puede afectar a la retención, disminuyendo o aumentando dependiendo de la estirpe celular de que se trate. El aumento de la concentración celular puede conducir a la repulsión entre células ya depositadas y las que se aproximan a la superficie sólida, provocando el aumento del transporte debido al bloqueo del colector (Camesano y Logan, 1998). Esto es lo que ocurriría en el caso de las NPsAg y la glucosa, en vez de aumentar la concentración celular en el influente, aumenta la probabilidad de interaccionar con el colector, haciendo que el número de células depositadas sea mayor. En el caso del control, en ausencia de

compuesto, la interacción bacteriana con el colector es progresiva. Los granos de arena se van cubriendo de bacterias poco a poco, ya que las células se mueven de manera aleatoria y cambian, ocasionalmente, su dirección de movimiento (momento en el cual pueden interaccionar con los granos de arena). De esta manera, el colector se va cubriendo de bacterias de manera gradual sin existir un colapso del colector ni repelencia entre bacterias.

El bloqueo del colector es un fenómeno que se produce como consecuencia de la deposición de células en la superficie de arena. A partir de un número de volúmenes de poro, la deposición comienza a bajar como consecuencia de la repelencia de células entre las que ya estaban depositadas y las que se aproximan, siendo transportadas a lo largo de las columnas, y observándose, con ello, una bajada en la retención bacteriana (Rijnaarts y col., 1996a)

El efecto de bloqueo impide que se cubra toda la superficie del colector (el máximo cubrimiento celular de la superficie del colector no es posible). La máxima cobertura del colector en presencia del factor de bloqueo no es posible debido a que la zona bloqueada no deja opción a ser cubierta (Kerchov y Elimelech, 2008). A este factor hay que sumarle el efecto de sombra creado por la corriente del fluido y el ángulo de la interacción del coloide (o bacteria) con la superficie del colector (Ko y Elimelech, 2000). Cuando los coloides son células bacterianas, la deposición se ve favorecida por la movilidad intrínseca del microorganismo cuyo movimiento de propulsión contracorriente hace posible que acceda a las zonas influidas por el efecto de sombra, que son zonas inaccesibles para aquellas bacterias no móviles, haciendo que el valor de cubrimiento máximo de superficie sea mayor (Kerchov y Elimelech, 2008). Esto es lo que ocurrió en el caso del transporte bacteriano de *P. putida* G7 en ausencia de compuesto (control). En este caso, la movilidad intrínseca celular provocó el máximo recubrimiento celular de la superficie de arena.

El aumento de la eficacia de la salida bacteria ( $C/C_0$ ) a partir de 2 VP, como consecuencia del bloqueo del colector fue descrito en el estudio de la adhesión de *Stenotrophomonas maltophilia* 70401 sobre superficie de vidrio y teflón. El transporte bacteriano se dio a partir de 2 VP como consecuencia del bloqueo producido por las células adheridas sobre

teflón a una fuerza iónica de 1 M. La curva de rotura es muy parecida a la obtenida en nuestro estudio para el caso del transporte bacteriano en presencia de NPsAg y de glucosa.

La modificación del transporte bacteriano mediante el patrón de movilidad puede influir en el transporte y deposición independientemente de la velocidad de flujo y fuerza iónica del medio. La relación entre el patrón de movilidad y la interacción con superficies sólidas ha sido estudiada con anterioridad por otros autores. En un estudio llevado a cabo con la bacteria *Escherichia coli* y dos mutantes caracterizados por su movimiento exclusivo en línea recta y exclusivamente abrupto (alta frecuencia de cambios de dirección), se observó que el porcentaje de células con movimiento rectilíneo que quedaron retenidas en la columna fue menor que en el caso de la silvestre. Además, la retención no se vio influida por la velocidad de flujo ni la fuerza iónica. Mientras que para el caso del mutante de movimiento abrupto, las diferencias no fueron tan significativas con respecto a la silvestre, aunque también se observó una leve retención menor (McClaine y Ford, 2002). Como se ya se ha comentado, independientemente de la velocidad del fluido y de la fuerza iónica, las diferencias en la retención bacteriana fueron atribuidas exclusivamente al patrón de movilidad.

El aumento del transporte por la presencia de un atrayente en las columnas de ensayo también se confirmó en un estudio del transporte de la estirpe *E. coli* AW405 en columnas empaquetadas con gel de sílice. Se comprobó que el transporte bacteriano fue más rápido para la estirpe *E. coli* AW405 en presencia del atrayente L-serina que para el caso del mutante no flagelado, *E. coli* C600 y el mutante no quimiotáctico, *E. coli* cheB287 (Zaval'skii y Voloshin, 2003).

En un estudio más reciente se demostró que la migración transversal de la estirpe *Escherichia coli* HCB1 aumentó en presencia del atrayente metilaspártato (Wang y Ford, 2009).

Los patrones de movilidad observados en presencia de los atrayentes salicilato y exudados, así como el patrón descrito en presencia de NPsAg y glucosa, se han detectado bajo otras condiciones experimentales, como las trayectorias celulares seguidas por los mutantes obtenidos en nuestro trabajo de investigación. Así como el patrón de movilidad observado

durante la fase exponencial del cultivo de la estirpe silvestre *P. putida* G7, lo que apoya la hipótesis de que el patrón de movilidad bacteriano afectó a la deposición en las columnas de arena, ya que las curvas de transporte son muy parecidas para cada caso de patrón de movimiento.

### **V.3.3 INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL TRANSPORTE BACTERIANO**

La presencia de materia orgánica hace que se complique el estudio del transporte y deposición, ya que puede adsorberse a la superficie del material poroso y enmascarar heterogeneidades subyacentes de la carga superficial, alterando de este modo la dinámica de deposición de los coloides y su movilización o transporte (Liu y col., 1995).

Se ha descrito la presencia de materia orgánica en los suelos como un factor promotor del transporte bacteriano a través de medios porosos. La materia orgánica puede modificar la deposición bacteriana en una superficie sólida, cambiando las propiedades de la carga superficial de las células y/o de la superficie del material e interfiriendo en la interacción entre partículas. Asimismo, en el caso de los ácidos húmicos, al tratarse de complejas moléculas de gran tamaño y peso molecular, podrían competir con las células bacterianas por los sitios de interacción en el colector.

En un estudio de transporte se determinó que la materia orgánica disuelta aumenta la carga negativa de la superficie bacteriana, provocando la repulsión entre las partículas de cuarzo (colector) y las células que se aproximan a la superficie. Por lo que se produjo un aumento del transporte bacteriano (Johnson y Logan, 1996). En nuestro estudio, la carga superficial no se vio alterada en presencia de los ácidos húmicos, por lo que el transporte aumentó debido a otras causas, como podría ser la competencia entre los complejos húmicos y las células bacterianas por los sitios de interacción en la superficie de arena.

Investigaciones anteriores han propuesto que la materia orgánica facilita el transporte bacteriano al competir con las bacterias por los sitios de adsorción en la superficie del material empleado en los ensayos de transporte (Harvey y col., 1989; Scholl y Harvey, 1992). En otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, los ácidos húmicos (los

mismos que se han usado en esta Tesis Doctoral) adsorbidos a la arcilla en columnas empaquetadas con suelo, provocaron el aumento del transporte bacteriano, debido a la interferencia entre los AH y las células por la interacción con la arcilla (Lahlou y col., 2000). Recientemente, Foppen y colaboradores han sugerido que los ácidos húmicos podrían promover el transporte de *Escherichia coli* a través de columnas de arena recubiertas de goetita por alteración de la carga de la superficie del colector y por impedimento estérico en la interacción bacteriana con la superficie del colector (Foppen y col., 2008). La hipótesis sobre la competencia por los sitios de interacción ha sido apoyada por Seong-Jik Park y Song-Bae Kim, donde la adhesión bacteriana a una superficie arenosa cubierta por hierro, disminuyó al aumentar la concentración de ácidos húmicos debido a la pre-ocupación de los sitios favorables de adsorción por parte de los AH. La salida bacteriana de la especie *E. coli* a través de las columnas incrementó de un 2,9% (en agua desionizada) a un 94,6% en presencia de ácidos húmicos a una concentración de 16 mg L<sup>-1</sup> (Park y Kim, 2009). En este contexto, los AH empleados en nuestro estudio podrían haber provocado el aumento del transporte bacteriano de *P. putida* G7 por competencia con las células bacterianas por los sitios de interacción en la arena. Una prueba de ello, fue que el transporte aumentó cuando la concentración de los AH adsorbidos a la arena fue mayor. Estos datos están en concordancia con los resultados descritos anteriormente, donde se comprobó que la adhesión de *E. coli* sobre arena cubierta de hierro disminuyó con el aumento de la concentración de ácidos húmicos debido a la pre-ocupación de los sitios favorables para la adhesión por parte de la materia orgánica. De manera que se observó un incremento del transporte bacteriano del 63,4 % (cuando se bombearon AH a 4mg L<sup>-1</sup>) al 94,6% al bombear la solución de AH a 16 mg L<sup>-1</sup> (Park y Kim, 2009).

Otra forma de modificar la superficie de colector y por tanto, la interacción entre las células y las partículas de la superficie es mediante el uso de tensioactivos. La propiedad tensioactiva del fertilizante oleofílico a la concentración de 123 mg L<sup>-1</sup> explicó el aumento de transporte observado en nuestro estudio con *P. putida* G7 en presencia del fertilizante. Lahlou y colaboradores descubrieron que el surfactante no iónico Triton X-100 podía absorberse tanto a la superficie bacteriana como a la del material poroso,

## Discusión

promoviendo el transporte bacteriano interfiriendo en la interacción entre las superficies celulares y la matriz sólida. (Lahlou y col., 2000). En otro estudio sobre el efecto de los tensioactivos en el transporte bacteriano, se observó que los ramnolípidos aniónicos aumentaron la densidad de carga negativa de la superficie del medio poroso de arena, mientras que la densidad de carga superficial de las bacterias (hidrófobos e hidrófilos) no se vio modificada en presencia de los ramnolípidos (Bai y col., 1997). El fertilizante S-200 no provocó un cambio en la carga superficial de la arena, pero en cambio, hizo que la hidrofobicidad de la misma fuese mayor en presencia del fertilizante. Ello corrobora la complejidad de las interacciones que se dan entre las moléculas del fertilizante oleofílico y la superficie de arena, desencadenantes del aumento de transporte bacteriano.

## V.6 INFLUENCIA DE LA RESPUESTA TÁCTICA EN LA BIODISPONIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO

Existen varios estudios en los que se sugirió que el aumento del transporte bacteriano inducido por quimiotaxis positiva podría aumentar la biodegradación (Parales y Haddock, 2004; Ford y Harvey, 2007; Strobel y col., 2011), pero pocos estudios han comprobado realmente esta hipótesis.

La biodegradación del pesticida metil paratión en un microcosmos de suelo fue mayor por parte de la estirpe silvestre *P. putida* DLL-1 que para los mutantes auxótrofo, no móvil y no quimiotáctico, poniendo en evidencia que la detección táctica del pesticida supuso una ventaja para la estirpe silvestre de localizarlo y aumentar su degradación por la alta densidad poblacional asociada a las proximidades del pesticida (Guo y col., 2009).

En cuanto a la degradación de naftaleno, Aitken y colaboradores demostraron que la quimiotaxis hacia naftaleno aumentó su biodegradación en un sistema acuoso heterogéneo (Marx y Aitken, 2000). Pero la explicación del aumento del transporte que conlleva a un aumento en la biodegradación de naftaleno queda aún por determinar.

En un estudio llevado a cabo con la estirpe *Pseudomonas stutzeri* KC se comprobó que el aumento de transporte debido a quimiotaxis positiva hacia nitrato, provocó un aumento de la degradación del contaminante tetracloruro de carbono tanto adsorbido como en fase acuosa (Witt y col., 1999). Nuestros resultados concuerdan con estos datos, pero en nuestro caso, la quimiotaxis positiva a exudados aumentó la biodisponibilidad del naftaleno, y con ello, su biodegradación. El patrón de movilidad en presencia de exudados provocó un aumento del transporte bacteriano hasta el extremo final de la columna, lo que se tradujo en un porcentaje mayor de células que alcanzaron la fuente de contaminante, es decir, el naftaleno adsorbido en la anilla. De esta manera, la biodegradación del naftaleno fue mayor, ya que aumentó la biodisponibilidad del mismo porque las bacterias pudieron acceder a la fuente de carbono de forma eficaz.

Por su parte, el patrón de movilidad en presencia de NPsAg provocó una mayor adhesión a la anilla donde se encontraba el naftaleno adsorbido, (así como a la arena adyacente), provocando un aumento de la biodegradación del naftaleno adsorbido. En otros estudios del grupo se ha comprobado que la adhesión a la interfase NAPL-fase acuosa aumentó la degradación de naftaleno debido al incremento en la transferencia de masa del compuesto desde la fase orgánica a la fase acuosa (Ortega-Calvo y Alexander, 1994). Así como se ha comprobado que la mayor biodegradación observada en presencia del fertilizante S-200 se debió a una proliferación bacteriana en la interfase NAPL-agua promovida por el aporte de nutrientes N y P justo en la interfase (Tejeda Agredano y col., 2011). En esta Tesis Doctoral hemos contribuido al conocimiento de cómo provocar una mayor adhesión a la interfase NAPL-fase acuosa para fomentar así la biodegradación de un contaminante poco biodisponible.

Las aportaciones más interesantes de esta Tesis Doctoral podrían centrarse en el papel de la quimiotaxis en la biodegradación de contaminantes orgánicos, postulando que podemos modificar el patrón de movilidad bacteriano con el empleo de efectores tácticos que promuevan un mayor transporte, o que por el contrario, provoquen el confinamiento de la población microbiana, según la situación de contaminación frente a la que nos encontremos. De esta manera, el empleo de un atrayente, como los exudados, podría aplicarse para fomentar el transporte dirigido de bacterias hacia el foco de contaminación. Por ejemplo, en el tratamiento de descontaminación de acuíferos a gran profundidad. Por el contrario, podría pensarse en el uso de un repelente, como las NPsAg, en biorreactores para fomentar la formación de biofilms necesarios para la degradación de contaminantes adsorbidos.

## **VI. CONCLUSIONES**

Las conclusiones a destacar de esta Tesis Doctoral son:

1. El patrón de movilidad de las trayectorias celulares individuales puede utilizarse para estudiar la respuesta táctica de la estirpe bacteriana *Pseudomonas putida* G7 en presencia de distintos compuestos.
2. Los exudados constituyeron un potente efector táctico positivo para la estirpe, lo cual fue evidente incluso a concentraciones de  $16 \text{ mg L}^{-1}$ . Las trayectorias celulares en presencia de los mismos, se caracterizaron por un escaso número de cambios de dirección, haciendo que las trayectorias fueran curvas o en línea recta. La respuesta de atracción se confirmó con el ensayo capilar.
3. Las nanopartículas de plata (NPsAg) ejercen una respuesta táctica negativa sobre *Pseudomonas putida* G7, haciendo que sus trayectorias celulares presenten una alta frecuencia de cambios de dirección. La respuesta de repulsió fue confirmada mediante el ensayo capilar.
4. La respuesta táctica tiene un efecto en la adhesión bacteriana sobre superficies sólidas. La alta frecuencia de cambios de dirección favorece la intercepción de las células con el material, provocando una mayor adhesión. En presencia de exudados, las trayectorias celulares mantenidas sin cambios de dirección evitaron la adhesión a la arena.
5. El empleo de efectores tácticos, como los exudados y las NPsAg, aumenta el transporte bacteriano.
6. Los exudados promueven la movilización celular, evitando la adhesión con la superficie sólida. En presencia de exudados, el transporte aumentó debido a que las trayectorias rectilíneas mantenidas sin cambios de dirección, causaron una menor probabilidad de intercepción por el colector, provocando, así, la movilización celular hacia el extremo final de las columnas.
7. Las NPsAg fomentan la adhesión a superficies sólidas debido a la respuesta de repulsió. Las NPsAg provocan que la estirpe *Pseudomonas putida* G7 cambie con mayor frecuencia de

dirección, haciendo que sea más probable la adhesión. En las columnas de transporte, los cambios de dirección fueron aprovechados por las bacterias para adherirse a la superficie del colector, haciendo que la adhesión fuera muy alta. Esto provocó el bloqueo del colector y el aumento del transporte. Las bacterias que se aproximaban a la superficie no podían adherirse, siendo repelidas por las que ya estaban depositadas, y por tanto, siendo transportadas hacia el final de las columnas.

8. Los ácidos húmicos no constituyen un efector táctico positivo para *Pseudomonas putida* G7. Las trayectorias celulares en presencia de estos compuestos no fueron significativamente diferentes a las observadas en ausencia de los mismos.
9. Los ácidos húmicos aumentan el transporte de la estirpe *P. putida* G7 como materia orgánica disuelta, compitiendo con las células bacterianas por los sitios de interacción en la superficie de arena en las columnas de transporte.
10. El fertilizante oleofílico no es un atrayente para *P. putida* G7. Las células bacterianas presentaron una cierta velocidad mayor en presencia del compuesto, ya que se trata de una fuente de N y P para la proliferación celular.
11. El fertilizante oleofílico aumenta el transporte de la estirpe bacteriana objeto de estudio. En este caso, las propiedades tensioactivas del compuesto hicieron que las interacciones entre células bacterianas y superficie de arena se vieran afectadas, impidiendo que *Pseudomonas putida* G7 se depositara en la superficie de arena, provocando con ello, un aumento del transporte bacteriano.
12. El empleo de efectores tácticos, como los exudados y las NPsAg, aumenta la biodegradación de naftaleno. El mecanismo es diferentes en ambos casos.
13. Los exudados aumentan la biodisponibilidad de naftaleno porque aumenta la movilización bacteriana dirigida hacia el foco del contaminante. El aumento del transporte, provocó un aumento de

## Conclusiones

la biodegradación del naftaleno que se encontraba retenido en el final de la columna.

14. Las NPsAg aumentan la biodegradación del naftaleno adsorbido a la anilla de silicona. Los cambios de dirección aumentaron la adhesión a la arena, así como a la anilla, provocando que la biodegradación de las células adheridas a la anilla fuera mayor.

## **CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

- Adler, J., 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal General Microbiology* 74, 77-91.
- Ahmed, T., Shimizu, T., Stocker, R., 2010. Microfluidics for bacterial chemotaxis. *Integrative Biology* 2, 604-629.
- Alexander, M., 1999. Biodegradation and bioremediation. Academic Press Inc. San Diego, CA.
- Amsler, C.D., Cho, M., Matsumura, P., 1993. Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *Journal of Bacteriology* 175, 6238-6244.
- Armitage, J., Berry, R., 2010. Time for bacteria to slow down. *Cell* 141, 24-26.
- Bai, G., Brusseau, M.L., Miller, R.M., 1997. Influence of a rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1866-1873.
- Banitz, T., Johst, K., Wick, L.Y., Fetzer, I., Harms, H., Frank, K., 2011. The relevance of conditional dispersal for bacterial colony growth and biodegradation. *Microbial ecology* 63, 339-347.
- Barbour, W.M., Hattermann, D.R., Stacey, G., 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2635-2639.
- Becker, M.W., Collins, S.A., Metge, D.W., Harvey, R.W., Shapiro, A.M., 2004. Effect of cell physicochemical characteristics and motility on bacterial transport in groundwater. *Journal of contaminant hydrology* 69, 195-213.
- Becker, M.W., Metge, D.W., Collins, S.A., Shapiro, A.M., Harvey, R.W., 2003. Bacterial transport experiments in fractured crystalline bedrock. *Groundwater* 41, 682-689.
- Berg, H.C., Brown, D.A., 1972. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* 239, 500-504.
- Borrok, D., Borrok, M.J., Fein, J.B., Kiessling, L.L., 2005. Link between chemotactic response to Ni<sup>2+</sup> and its adsorption onto the *Escherichia coli* cell surface. *Environmental Science & Technology* 39, 5227-5233.

- Busscher, H.J., Van der Mei, H.C., 2006. Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 127-141.
- Caetano-Anolles, G., Wall, L.G., De Micheli, A.T., Macchi, E.M., Bauer, W.D., Favelukes, G., 1988. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 86, 1228-1235.
- Camesano, T.A., Logan, B.E., 1998. Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. *Environmental Science & Technology* 32, 1699-1708.
- Camper, A.K., Hayes, J.T., Sturman, P.J., Jones, W.L., Cunningham, A.B., 1993. Effects of motility and adsorption rate coefficient on transport of bacteria through saturated porous media. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3455-3462.
- Castellanos, T., Ascencio, F., Bashan, Y., 2000. Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS microbiology ecology* 33, 1-9.
- Celani, A., Vergassola, M., 2010. Bacterial strategies for chemotaxis response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 1391-1396.
- Corgie, S.C., Beguiristain, T., Leyval, C., 2004. Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3552-3557.
- Cui, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Zhang, W., Lu, X., Jiang, X., 2012. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials* 33, 2327-2333.
- Chen, G., Strevett, K.A., 2001. Impact of surface thermodynamics on bacterial transport. *Environmental Microbiology* 3, 237-245.
- Dabroś, T., Van de Ven, T.G.M., 1982. Kinetics of coating by colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 89, 232-244.
- DeFlaun, M.F., Oppenheimer, S.R., Streger, S., Condee, C.W., Fletcher, M., 1999. Alterations in adhesion, transport, and membrane characteristics in an adhesion-deficient pseudomonad. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 759-765.

## Bibliografía

Dunn, N.W., Gunsalus, I.C., 1973. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 114, 974-979.

Eisenbach, M., 2001. Bacterial chemotaxis. *Nature Encyclopedia of Life Sciences* Nature Publishing Group, 1-14.

El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current opinion in microbiology* 8, 268-275.

Elimelech, M., Omelia, C.R., 1990. Kinetics of deposition of colloidal particles in porous media. *Environmental Science & Technology* 24, 1528-1536.

Foppen, J., Liem, Y., Schijven, J., 2008. Effect of humic acid on the attachment of *Escherichia coli* in columns of goethite-coated sand. *Water research* 42, 211-219.

Ford, R.M., Harvey, R.W., 2007. Role of chemotaxis in the transport of bacteria through saturated porous media. *Advances in Water Resources* 30, 1608-1617.

Gannon, J.T., Manilal, V.B., Alexander, M., 1991. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 190-193.

Garcia-Junco, M., Gomez-Lahoz, C., Niqui-Arroyo, J.L., Ortega-Calvo, J.J., 2003. Biosurfactant and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology* 37, 2988-2996.

Gargiulo, G., Bradford, S.A., Å imunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H., Klumpp, E., 2007. Transport and deposition of metabolically active and stationary phase *Deinococcus radiodurans* in unsaturated porous media. *Environmental Science & Technology* 41, 1265-1271.

Gargiulo, G., Bradford, S.A., Simunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H., 2008. Bacteria transport and deposition under unsaturated flow conditions: The role of water content and bacteria surface hydrophobicity. *Vadose Zone Journal* 7, 406-419.

Gaworzewska, E.T., Carlile, M.J., 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *Journal of General Microbiology* 128, 1179-1188.

Gitte, R.R., Rai, P.V., Patil, R.B., 1978. Chemotaxis of *Rhizobium* sp. towards root exudate of *Cicer Arietinum* L. *Plant and Soil* 50, 553-566.

Grimm, A.C., Harwood, C.S., 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4111-4115.

Guo, X., Chen, K., Wen, Y., Li, R., Li, S., 2009. Comparison of in-situ biodegrading abilities of *Pseudomonas putida* mutants: *leuB*(-) auxotroph, *fliC*(-) non-motility, and *cheA*(-) non-chemotaxis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 576-581.

Haftka, J.J.H., Parsons, J.R., Govers, H.A.J., Ortega Calvo, J.J., 2008. Enhanced kinetics of solid-phase microextraction and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1526-1532.

Hansen, L.H., Sorensen, S.J., 2001. The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems. *Microbial Ecology* 42, 483-494.

Harvey, R.W., George, L.H., Smith, R.L., LeBlanc, D.R., 1989. Transport of microspheres and indigenous bacteria through a sandy aquifer: results of natural-and forced-gradient tracer experiments. *Environmental Science & Technology* 23, 51-56.

Harvey, R.W., Metge, D.W., Mohanram, A., Gao, X., Chorover, J., 2011. Differential effects of dissolved organic carbon upon re-entrainment and surface properties of groundwater bacteria and bacteria-sized microspheres during transport through a contaminated, sandy aquifer. *Environmental Science & Technology* 45, 3252-3259.

Harwood, C.S., Fosnaugh, K., Dispensa, M., 1989. Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *Journal of Bacteriology* 171, 4063-4066.

Harwood, C.S., Nichols, N.N., Kim, M., Ditty, J.L., Parales, R.E., 1994a. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *Journal of Bacteriology* 176, 6479-6488.

Harwood, C.S., Nichols, N.N., Kim, M.K., Ditty, J.L.a., Parales, R.E., 1994b. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*:

## Bibliografía

involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *Journal of Bacteriology* 176, 6479-6488.

Harwood, C.S.F., K., Dispensa, M., 1989. Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *Journal of Bacteriology* 171, 4063-4066.

Hawkins, A.C., Harwood, C.S., 2002. Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 968-972.

Haznedaroglu, B.Z., Zorlu, O., Hill, J.E., Walker, S.L., 2010. Identifying the role of flagella in the transport of motile and nonmotile *Salmonella enterica* serovars. *Environmental Science & Technology* 44, 4184-4190.

Heise, S., Gust, G., 1999. Influence of the physiological status of bacteria on their transport into permeable sediments. *Marine Ecology Progress Series* 190, 141-153.

Hiementz, P.C., 1986. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker Inc: New York.

Homma, M., Oota, H., Kojima, S., Kawagishi, I., Imae, Y., 1996. Chemotactic responses to an attractant and a repellent by the polar and lateral flagellar systems of *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* 142, 2777-2783.

Hunter, R.J., 1988. Zeta potential In *colloid science: principles and applications*. Accademic Press, UK.

Imae, Y., Oosawa, K., Mizuno, T., Kihara, M., Macnab, R.M., 1987. Phenol: a complex chemoeffector in bacterial chemotaxis. *Journal of Bacteriology* 169, 371-379.

Jeong, H., Lee, S., Kim, J., Kim, H., Kim, Y., Yoo, J., Chang, W., Lee, C., 2010. Microfluidic monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis under the continuous chemical gradient. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 351-356.

Johnson, W.P., Logan, B.E., 1996. Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter. *Water Research* 30, 923-931.

Jones, J.F., Feick, J.D., Imoudu, D., Chukwumah, N., Vigeant, M., Velegol, D., 2003. Oriented adhesion of *Escherichia coli* to polystyrene particles. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6515-6519.

Jucker, B.A., 1998a. Polymer Interactions and Bacterial Adhesion. Tesis Doctoral. Swiss Federal Institute of Technology Zurich.

Jucker, B.A., 1998b. Polymer Interactions and Bacterial Adhesion. Ph. D. thesis. Swiss Federal Institute of Technology. Zurich.

Jucker, B.A., Harms, H., Zehnder, A.J., 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology* 178, 5472-5479.

Kanally, R.A., Harayama, S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182, 2059-2067.

Kerchove, A.J., Elimelech, M., 2008. Bacterial swimming motility enhances cell deposition and surface coverage. *Environmental Science & Technology* 42, 4371-4377.

Kleman, G.L., Strohl, W.R., 1994. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3952-3958.

Ko, C., Elimelech, M., 2000. The "shadow effect" in colloid transport and deposition dynamics in granular porous media: measurements and mechanisms. *Environmental Science & Technology* 34, 3681-3689.

Koda, S., Miyamoto, M., Toma, M., Matsuoka, T., Maebayashi, M., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500kHz. *Ultrasonics Sonochemistry* 16, 655-659.

Korber, D.R., Lawrence, J.R., Sutton, B., Caldwell, D.E., 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot<sup>+</sup> and Mot<sup>-</sup> *Pseudomonas fluorescens*. *Microbial Ecology* 18, 1-19.

Koshland Jr, D.E., 1977. Sensory response in bacteria, *Advances in Neurochemistry*. Springer, pp. 277-341.

Kusy, K., Ford, R.M., 2007. Monte Carlo simulations derived from direct observations of individual bacteria inform macroscopic migration models at granular porous media interfaces. *Environmental Science & Technology* 41, 6403-6409.

## *Bibliografía*

Laha, S., Luthy, R.G., 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnology Bioengineering* 40, 1367-1380.

Lahlou, M., Harms, H., Springael, D., Ortega Calvo, J.J., 2000. Influence of soil components on the transport of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria through saturated porous media. *Environmental Science & Technology* 34, 3649-3656.

Law, A.M.J., Aitken, M.D., 2003. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5968-5973.

Liu, D., Johnson, P.R., Elimelech, M., 1995. Colloid deposition dynamics in flow-through porous media: Role of electrolyte concentration. *Environmental Science & Technology* 29, 2963-2973.

Liu, Y.Y., Su, G.X., Zhang, B., Jiang, G.B., Yan, B., 2011. Nanoparticle-based strategies for detection and remediation of environmental pollutants. *Analyst* 136, 872-877.

Lopez-de-Victoria, G., Zimmer-Faust, R.K., Lovell, C.R., 1995. Computer-assisted video motion analysis: A powerful technique for investigating motility and chemotaxis. *Journal of Microbiological Methods* 23, 329-341.

Lopez de Victoria, G., Zimmerfaust, R.K., Lovell, C.R., 1995. Computer-assisted video motion analysis: A powerful technique for investigating motility and chemotaxis. *Journal of Microbiological Methods* 23, 329-341.

Macnab, R.M., 1980. Sensing the environment: Bacterial chemotaxis. *Biological Regulation and Development* 2, 377-412.

Martin, R.E., Bouwer, E.J., H., L.M., 1992. Application of clean-bed filtration theory to bacterial deposition in porous media. *Environmental Science & Technology* 26, 1053-1058.

Marx, R.B., Aitken, M.D., 2000. Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environmental Science & Technology* 34, 3379-3383.

Mayer, P., Fernqvist, M.M., Christensen, P.S., Karlson, U.G., Trapp, S., 2007. Enhanced diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and natural aqueous solutions. *Environmental Science & Technology* 41, 6148-6155.

McClaine, J.W., Ford, R.M., 2002. Reversal of flagellar rotation is important in initial attachment of *Escherichia coli* to glass in a dynamic system with high- and low-ionic-strength buffers. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1280-1289.

Menzel, R., Stützenbaum, S., Bärenwaldt, A., Kulas, J., Steinberg, C.E.W., 2005. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental science & technology* 39, 8324-8332.

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346.

Niqui-Arroyo, J., L., Ortega-Calvo, J., J., 2010. Effect of electrokinetics on the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in polluted soils. *Journal of Environmental Quality* 39, 1993-1998.

Norde, W., Lyklema, J., 1989. Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: a colloid-chemical approach. *Colloids and Surfaces* 38, 1-13.

Olson, M., 2004. Quantification of bacterial motility and chemotaxis in porous media using magnetic resonance imaging. Tesis Doctoral.

Oosawa, K., Imae, Y., 1983. Glycerol and ethylene glycol: members of a new class of repellents of *Escherichia coli* chemotaxis. *Journal of Bacteriology* 154, 104-112.

Ortega-Calvo, J.J., Alexander, M., 1994. Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2643-2646.

Ortega-Calvo, J.J., Tejeda-Agredano, M.C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J.L., 2013. Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation? *Journal of hazardous materials en prensa*, (doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.03.042).

## Bibliografía

Ortega Calvo, J.-J., Molina, R., Jimenez Sanchez, C., Dobson, P., Thompson, I., 2011. Bacterial tactic response to silver nanoparticles. *Environmental Microbiology Reports* 3, 526-534.

Ortega Calvo, J.J., Marchenko, A.I., Vorobyov, A.V., Borovick, R.V., 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 373-381.

Ortega Calvo, J.J., Sáiz-Jiménez, C., 1998. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Applied Environmental Microbiology* 64, 3123-3126.

Parales, R.E., Ditty, J.L., Harwood, C.S., 2000. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4098-4104.

Parales, R.E., Haddock, J.D., 2004. Biocatalytic degradation of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 374-379.

Park, S., Kim, S., 2009. Adhesion of *Escherichia coli* to iron-coated sand in the presence of humic acid: a column experiment. *Water Environment Research* 81, 125-130.

Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P., 2007. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. CRC press.

Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., Di Bonaventura, G., 2008. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiology Letters* 287, 41-47.

Posada, R., 2007. Bioaccesibilidad en suelos de hidrocarburos aromáticos policíclicos depositados desde la atmósfera. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.

Priestley, J., Coleman, N., Duxbury, T., 2006. Growth rate and nutrient limitation affect the transport of *Rhodococcus* sp. strain DN22 through sand. *Biodegradation* 17, 571-576.

Rashid, M.H., Kornberg, A., 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4885-4890.

Rijnaarts, H.H.M., 1994. Tesis Doctoral Agricultural University, Wageningen, the Netherlands.

Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., 1993a. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3255-3265.

Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., 1993b. Bacterial Adhesion under Static and Dynamic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3255-3265.

Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., 1996a. Bacterial deposition in porous media related to the clean bed collision efficiency and to substratum blocking by attached cells. *Environmental Science & Technology* 30, 2869-2876.

Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., 1996b. Bacterial deposition in porous media: Effects of cell coating, substratum hydrophobicity and electrolyte concentration *Environmental Science & Technology* 30, 2877-2883.

Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4, 191-197.

Rosenberg, M., Gutnick, D., E., R., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell - surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29-33.

Rutter, P.R., Vincent, B., 1980. The adhesion of microorganisms to surfaces: physico-chemical aspects. . In *Microbial adhesion to surfaces*; Berkeley, R. C. W. Lynch, R. M., Melling, J. Rutter, P. R., Vincent, B., Eds; E. Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom 79-93.

Sager, B.M., Sekelsky, J.J., Matsumura, P., Adler, J., 1988. Use of a computer to assay motility in bacteria. *Analytical Biochemistry* 173, 271-277.

Sambrook, J., F., E.F., M., T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

## Bibliografía

Schafer, A., Harms, H., Zehnder, A.J.B., 1998. Bacterial accumulation at the air-water interface. *Environmental Science & Technology* 32, 3704-3712.

Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C.A., 1985. Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates in vitro and in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 31, 570-574.

Schnitzer, M., 1982. Organic matter characterization. In A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney (eds), *Methods of Soil Analysis. Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Madison, WI, 581-594.

Scholl, M.A., Harvey, R.W., 1992. Laboratory investigations on the role of sediment surface and groundwater chemistry in transport of bacteria through a contaminated sandy aquifer. *Environmental Science & Technology* 26, 1410-1417.

Shan, G., Xing, J., Zhang, H., Liu, H.L., 2005. Biodesulfurization of dibenzothiophene by microbial cells coated with magnetite nanoparticles. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4497-4502.

Singh, R., Olson, M., 2011. Transverse mixing enhancement due to bacterial random motility in porous microfluidic devices. *Environmental Science & Technology* 45, 8780-8787.

Singh, T., Arora, D.K., 2001. Motility and chemotactic response of *Pseudomonas fluorescens* toward chemoattractants present in the exudate of *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research* 156, 343-351.

Smith, K.E.C., Rein, A., Trapp, S., Mayer, P., Karlson, U.G., 2012. Dynamic passive dosing for studying the biotransformation of hydrophobic organic chemicals: microbial degradation as an example. *Environmental Science & Technology* 46, 4852-4860.

Spudich, J.L., Koshland, D.E., 1975. Quantitation of the sensory response in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 710-713.

Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G., 2001. *Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications*. Springer Verlag.

- Strobel, K.L., McGowan, S., Bauer, R.D., Griebler, C., Liu, J., Ford, R.M., 2011. Chemotaxis increases vertical migration and apparent transverse dispersion of bacteria in a bench-scale microcosm. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 2070-2077.
- Sumesh, E., Bootharaju, M.S., Pradeep, T., 2011. A practical silver nanoparticle-based adsorbent for the removal of Hg<sup>2+</sup> from water. *Journal of Hazardous Materials* 189, 450-457.
- Szurmant, H., Ordal, G.W., 2004. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 301-319.
- Tejeda-Agredano, M.C., Gallego, S., Vila, J., Grifoll, M., Ortega-Calvo, J.J., Cantos, M., 2013. Influence of the sunflower rhizosphere on the biodegradation of PAHs in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 830-840.
- Tejeda Agredano, M.C., Gallego, S., Niqui-Arroyo, J.L., Vila, J., Grifoll, M., Niqui-Arroyo, J.L., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Effect of interface fertilization on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons present in nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology* 45, 1074-1081.
- Thomas, J.D., 1997. The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 38, 1-36.
- Tso, W., Adler, J., 1974. Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 118, 560-576.
- Tungitiplakorn, W., Cohen, C., Lion, L., 2005. Engineered polymeric nanoparticles for bioremediation of hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology* 39, 1354-1358.
- Van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J., 1987a. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1898-1901.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J.B., 1987. The Role of Bacterial Cell Wall Hydrophobicity in Adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1893-1897.

## Bibliografía

- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial Ecology* 17, 1-15.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., 1990. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Sciences* 52, 103-114.
- Van Oss, C.J., 1994. *Interfacial forces in aqueous media*. Marcel Dekker, Inc.: New York, pp. 207.
- Van Oss, C.J., Good, R.J., Chaudhury, M.K., 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 111, 378-390.
- Velasco-Casal, P., 2007. *Papel de la quimiotaxis en el transporte bacteriano y la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Velasco-Casal, P., Wick, L.Y., Ortega-Calvo, J.J., 2008. Chemoeffectors decrease the deposition of chemotactic bacteria during transport in porous media. *Environmental Science & Technology* 42, 1131-1137.
- Walker, S.L., Redman, J.A., Elimelech, M., 2005. Influence of growth phase on bacterial deposition: Interaction mechanisms in packed-bed column and radial stagnation point flow systems. *Environmental Science & Technology* 39, 6405-6411.
- Wang, M., Ford, R.M., 2009. Transverse bacterial migration induced by chemotaxis in a packed column with structured physical heterogeneity. *Environmental Science & Technology* 43, 5921-5927.
- Wei, Y., Wang, X., Liu, J., Nememan, I., Singh, A., Weiss, H., Levin, B., 2011. The population dynamics of bacteria in physically structured habitats and the adaptive virtue of random motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4047-4052.
- Weiss, T.H., Mills, A.L., Hornberger, G.M., Herman, J.S., 1995. Effect of bacterial cell shape on transport of bacteria in porous media. *Environmental Science & Technology* 29, 1737-1740.

Witt, M.E., Dybas, M.J., Worden, R.M., Criddle, C.S., 1999. Motility-enhanced bioremediation of carbon tetrachloride-contaminated aquifer sediments. *Environmental Science & Technology* 33, 2958-2964.

Wolfe, A.J., Berg, H.C., 1989. Migration of bacteria in semisolid agar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6973-6977.

Wolk, C.P., Cai, Y.P., Panoff, J.M., 1991. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5355-5359.

Xiu, Z., Zhang, Q., Puppala, H.L., Colvin, V.L., Alvarez, P.J.J., 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano letters* 12, 4271-4275.

Yen, K., Serdar, C.M., Gunsalus, I.C., 1988. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonads*. *Critical Reviews in Microbiology* 15, 247-268.

Yen, K.M., Gunsalus, I.C., 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 79, 874-878.

Yu, H.S., Alam, M., 1997. An agarose-in-plug bridge method to study chemotaxis in the Archaeon *Halobacterium salinarum*. *FEMS microbiology letters* 156, 265-269.

Zaval'skii, L.Y., Voloshin, A.G., 2003. Bacterial motion in porous media. *Microbiology* 72, 369-372.