



**PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO Y
LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS EN SUELOS**

Memoria que presenta

Patricia Velasco Casal
para optar al título de Doctor en Química

Sevilla, Diciembre de 2006

Fotos contraportada: *Pseudomonas putida* G7

Detalle ensayos de transporte en columna

Experimento de transporte a través de columnas de suelo

Ensayo capilar cualitativo

Matraz biométrico para ensayos de mineralización

**PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO Y
LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS EN SUELOS**

Visado en Sevilla, a 3 de Diciembre de 2006

EL DIRECTOR

Dr. D. José Julio Ortega Calvo
Científico Titular del C.S.I.C

EL TUTOR

Dr. D. Nicolás Bellinfante Crocci
Profesor Titular de la Universidad de Sevilla

Memoria que presenta

*Dña. Patricia Velasco Casal
para optar al grado de Doctor en Química*

Dr. D. Luis Clemente Salas, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada *"Papel de la quimiotaxis en el transporte bacteriano y la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos"*, presentada por Dña. Patricia Velasco Casal para optar al grado de Doctor en Química, ha sido realizada en el Departamento de Biogeoquímica y Dinámica de Contaminantes, bajo la dirección del Dr. D. José Julio Ortega Calvo, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a 3 de Diciembre de 2006

Fdo: D. Luis Clemente Salas

El presente trabajo se ha realizado en el marco de los proyectos del Ministerio de Medioambiente (057/2004/3, 1.2-270/2005/3-B y 392/2006/3-1.2), Ministerio de Educación y Ciencia (VEM2004-08556), y Unión Europea (QLRT-1999-00326 y EVK1-CT-2001-00101).

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a toda la gente que de alguna u otra manera han ayudado a que hoy esto se haga realidad:

En primer lugar un especial agradecimiento al Dr. D. José Julio Ortega Calvo, director de esta Tesis Doctoral, por poner su confianza en mí. Gracias por esta oportunidad, por tus consejos, por tu acertada labor de dirección, ayuda y asesoramiento en la elaboración de este trabajo.

Al prof. Dr. D. Nicolás Bellinfante Crocci por haber aceptado la Tutoría de esta tesis.

Al proyecto europeo BIOSTIMUL “use of bioavailability-promoting micro-organisms to decontaminate PAH-polluted soils. Preparation towards large-scale field exploitations” que junto con la empresa EMGRISA de Madrid y el Ministerio de Ciencia y Tecnología han hecho que pueda disfrutar de una beca I3P.

Al Dr. Lukas Wick, por su ayuda, sus consejos y sus aportaciones a esta Tesis Doctoral. Vielen Dank!

A mis compañeros de laboratorio: José Luis muchas gracias por esos ratos de risas y charlas en el ordenador a través de nuestra ventanita; Alfonso por ser mi compañero y también mi amigo y por ofrecerme tu ayuda en cada momento; Marisa gracias por tu acogida, amistad, por esos ratos en el autoclave, sabes que eres una parte muy importante de esta tesis; Marisa2...¡qué hubiera hecho yo sin ti!, esto va por tí; y por último a mi Rosi, has sido mi amiga, mi consejera, me has escuchado siempre y comprendido, me has respetado y apoyado, gracias...Os quiero mucho a todos y no quiero que lo olvideis nunca.

Al resto de la gente del instituto, porque me lo habeis hecho todo más llevadero, pero en especial a Agüi, desde la planta baja, desde Almería, o donde quiera que hayas estado he sentido tu amistad.

A mis amigas gallegas porque aún en la lejanía sé que os tengo ahí para toda la vida: (son mis amigos, en la calle pasábamos las horas, son mis amigos por encima de todas las cosas, son mis amigos...). Noela, gracias por tu apoyo y amistad incondicional, por poder contar contigo en cada momento; Bea this is the end, beautiful friend, this is the end, my only friend, the end of our elaborate plans, the end of everything that stands, the end, lo hemos conseguido, Vane se fue a vivir a Barcelona y hoy ha venido a mi memoria...os llevo siempre conmigo; Noelia y Lucila gracias por estar ahí; María, por tu comprensión, por tu amistad, por ser como eres; Oli, mi doctora, al final yo también lo he conseguido; Tengo a mucha gente en mi mente: Cris, familia Vilas, familia Martínez-Torres....”Moitas gracias por estar ahí sempre e facerme sentir como a miña propia familia”

A mis amigos de Almendralejo, Ana y Fernando, no sabeis lo feliz que me ha hecho conocerlos y tenerlos ahí. Gracias a los dos.

A mi segunda familia en Almendralejo y Alcalá, gracias por vuestros consejos, apoyo, ayuda en todo momento, siempre habeis sabido como animarme y tratarme. Gracias de corazón.

A mis padres, os tengo tanto que agradecer que no sé por donde empezar, muchas gracias por ser como sois, por ponernos a Isa y a mí delante de vosotros para todo, por todo de lo que os tuvisteis que privar para llegar donde estoy sin pedir nada a cambio, por confiar en mí y apoyarme para venir a Sevilla, porque estáis ahí para que nunca me falte de nada, nunca os lo he agradecido lo suficiente y este es el momento, os quiero muchísimo...vosotros sois los que habeis hecho que hoy llegue hasta aquí.

A Sapoconcho, qué te voy a decir que no sepas, mi hermana, mi mejor amiga, mi apoyo, mi paño de lágrimas...lo eres todo para mí. Te quiero.

A Manuel, mi mejor amigo, la persona que me comprende, que me apoya en todo lo que hago, la que me hace reír cuando lo necesito y cuando no lo necesito, la que se ha sacrificado por mí miles de veces y me entiende tal y como soy. Tú has vivido todo este camino conmigo y nos queda un largo camino por vivir. Muchísimas gracias....esto también es tuyo. ILD

Gracias a todos otra vez.

ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN	VII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUELOS: EL PROBLEMA DE LA BIODISPONIBILIDAD	4
I.1.1 Biorremediación y biodisponibilidad	4
I.1.2 Biodegradación de HAPs en NAPLs	7
I.1.3 Influencia de los tensioactivos sobre la biodisponibilidad	9
I.2 INTERACCIONES BACTERIANAS CON SUPERFICIES SÓLIDAS	11
I.2.1 Mecanismos de deposición bacteriana	11
I.2.2 Teoría de la filtración de coloides.....	15
I.3 QUIMIOTAXIS BACTERIANA.....	16
I.3.1 Características del comportamiento móvil bacteriano	17
I.3.2 Bases moleculares de la quimiotaxis	20
I.3.3 Quimiotaxis frente a HAPs: conexión con las rutas degradativas.....	23
I.3.4 Papel ecológico de la quimiotaxis: biorremediación	29
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	33
II.1 OBJETIVOS	35
CAPÍTULO III: MATERIALES Y METODOLOGÍA	37
III.1 REACTIVOS.....	39
III.2 MATERIALES POROSOS	39
III.3 LÍQUIDOS EN FASE NO ACUOSA (NAPLs)	42
III.4 BACTERIAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	42
III.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	45

III.6 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y MOVILIDAD DE LAS ESTIRPES	46
III.6.1 <i>Pseudomonas putida</i> G7	46
III.6.2 <i>Pseudomonas putida</i> G7.C1 (pHG100)	46
III.6.3 <i>Sphingomonas</i> sp. LB126	46
III.6.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19SJ	47
III.7 CÁLCULO DE LA CMC DE LOS TENSIOACTIVOS	47
III.8 EXPERIMENTOS DE QUIMIOTAXIS	47
III.8.1 Ensayo capilar	47
III.8.1.1 Ensayo cualitativo	48
III.8.1.2 Ensayo cuantitativo	48
III.8.2 Ensayo quimiotáctico en matraces biométricos	50
III.9 ANÁLISIS DE HAPs POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	51
III.10 ENSAYOS DE TRANSPORTE EN COLUMNAS	53
III.11 ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN	56
III.11.1 Comparación de la mineralización de naftaleno por <i>Pseudomonas putida</i> G7 y <i>Pseudomonas putida</i> G7.C1 (pHG100)	56
III.11.2 Mineralización de naftaleno en lechos de arena y con distintos quimioefectores	56
III.11.3 Mineralización de naftaleno disuelto en NAPLs, en lechos de arena, y en presencia de distintos ácidos orgánicos	57
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	59
IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTIRPES UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO	61
IV.1.1 <i>Pseudomonas putida</i> G7	61
IV.1.2 <i>Pseudomonas putida</i> G7.C1 (pHG100)	64
IV.1.3 <i>Sphingomonas</i> sp. LB126	65
IV.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19SJ	67

IV.2 RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA DE LAS ESTIRPES UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO.....	68
IV.2.1 Ensayos capilares	68
IV.2.1.1 Ensayos cualitativos.....	68
IV.2.1.1.1 Quimiotaxis frente a sustancias hidrofílicas.....	68
IV.2.1.1.2 Quimiotaxis frente a HAPs.....	69
IV.2.1.2 Ensayos cuantitativos.....	72
IV.2.1.2.1 Quimiotaxis frente a sustancias hidrofílicas.....	72
IV.2.1.2.2 Quimiotaxis frente a HAPs.....	74
IV.2.2 Quimiotaxis y adhesión a NAPLs.....	77
IV.2.2.1 Ensayos de adhesión mediante microscopía óptica.....	78
IV.2.2.2 Ensayos cuantitativos.....	84
IV.3 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS.....	85
IV.3.1 Ensayos con trazador (tiourea).....	85
IV.3.2 Influencia de HAPs.....	87
IV.3.2.1 Naftaleno.....	87
IV.3.2.2 Fluoreno.....	93
IV.3.2.3 Fenantreno.....	95
IV.3.3 Influencia de ácidos orgánicos.....	95
IV.3.3.1 Acetato.....	97
IV.3.3.2 Fumarato.....	98
IV.3.3.3 Salicilato.....	99
IV.3.3.4 Succinato.....	100
IV.3.4 Influencia de la fuerza iónica.....	101
IV.3.5 Influencia de tensioactivos: Brij 35.....	103
IV.3.5.1 Determinación de la concentración crítica micelar.....	103
IV.3.5.2 Transporte en presencia de Brij 35.....	104
IV.3.6 Influencia del sustrato.....	106
IV.4 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN LA BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO EN MEDIOS POROSOS SATURADOS.....	109

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	117
V.1 QUIMIOTAXIS FRENTE A HAPs Y ÁCIDOS ORGÁNICOS	119
V.1.1 Caracterización de la respuesta quimiotáctica	119
V.1.2 Quimiotaxis y adhesión a NAPLs.....	122
V.2 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS.....	123
V.2.1 Efecto de HAPs sobre el transporte bacteriano.....	123
V.2.2 Efecto de ácidos orgánicos en el transporte bacteriano.....	126
V.2.3 Efecto de tensioactivos en el transporte bacteriano	129
V.2.4 Efecto de la adsorción del quimioefector sobre el transporte.....	129
V.3 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN LA BIODEGRADACIÓN.....	131
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	135
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	139

ABREVIATURAS

BTEX	benceno, tolueno, etilbenceno, y xileno
CFT	Teoría de filtración de coloides
CFU	Unidades formadoras de colonias
CHM	4-carboxi-2-ácido hidroximucónico
CHMS	4-carboxi-2-hidroximuconato-6-semialdehido
CMC	Concentración crítica micelar
C.O.	Carbono orgánico
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxi acético
DNAPL	Líquido en fase no acuosa denso
DVLO	Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HLB	Balance Hidrofílico – Lipofílico
HMN	2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano
COHs	Compuestos orgánicos hidrofóbicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IQ	Índice quimiotáctico
IT	Tensión interfacial
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MM	Medio de mineralización
M.O.	Materia orgánica
NAPL	Líquido en fase no acuosa
PCA	Ácido protocatéquico
PCB	Bifenilo policlorado
PDC	2-pirona-4,6-ácido dicarboxílico
POE	Polioxietileno
PVA	Alcohol polivinílico
SCS	Estabilidad coloidal estérica

SW	Medio Suiza
TF	Tampón fosfatos
TSA	Agar triptona y soja
UV	Radiación ultravioleta
VP	Volumen de poro

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se ha investigado el papel de la quimiotaxis bacteriana en la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos. Se realizó una selección de estirpes quimiotácticas, atendiendo a su movilidad, a su capacidad degradadora de HAPs y a su capacidad quimiotáctica frente a éstos. El conjunto de bacterias utilizadas inicialmente (*Pseudomonas putida* G7, *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100), *Sphingomonas* sp. LB126 y *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ) permitió realizar un estudio detallado de quimiotaxis, mediante ensayos capilares, frente a los HAPs naftaleno, fluoreno y fenantreno. Se estudió además la respuesta quimiotáctica frente a los ácidos aromáticos acetato, fumarato, salicilato y succinato, todos ellos intermediarios de las rutas degradativas de esos HAPs, y de gran importancia ecológica en el suelo. De estos estudios se seleccionó, para el resto del trabajo, la estirpe degradadora de naftaleno *P. putida* G7 y la mutante *P. putida* G7.C1 (pHG100), también capaz de degradar naftaleno pero inhabilitada para la quimiotaxis frente al mismo.

Mediante ensayos de transporte en columna se determinó que la quimiotaxis favorece, en general, el transporte bacteriano, disminuyendo significativamente la eficiencia de adhesión (α_t) a los materiales ensayados (arena, suelo forestal y agregados arcillosos). El naftaleno y los ácidos orgánicos, a excepción de succinato, promovieron significativamente el transporte de *P. putida* G7 a través de columnas de arena. En algunos casos el porcentaje de células no retenidas en las columnas llegó hasta el 90%, cuando en ausencia de estos quimioefectores su transporte fue del 50%. El succinato, por el contrario, provocó una disminución del transporte. Este efecto es atribuible a la inhibición a corto plazo de la movilidad de esta estirpe. El aumento de transporte en presencia de naftaleno no se observó con la estirpe mutante *P. putida* G7.C1 (pHG100). Se determinó además que el efecto promotor de los quimioefectores (en este caso salicilato) sobre el transporte puede desaparecer, e incluso revertirse, por adsorción de los mismos al sustrato. Por último, se estudió el efecto del tensioactivo biodegradable Brij 35 sobre el transporte, resultando ser también un claro promotor del mismo.

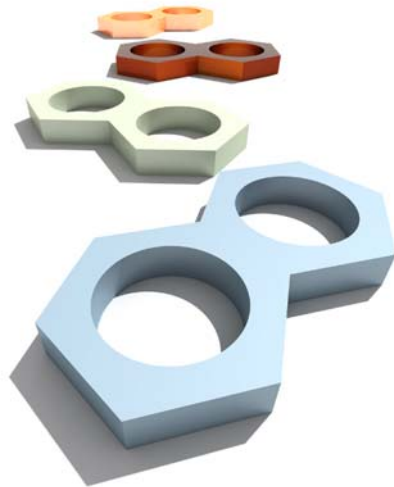
Los ensayos de mineralización con ^{14}C -naftaleno realizados en condiciones análogas con *P. putida* G7 y *P. putida* G7.C1 (pHG100) mostraron que la quimiotaxis aumenta la biodisponibilidad y, por tanto, la biodegradación de naftaleno en lechos de arena y agregados arcillosos. Sin embargo, la presencia de otros quimioefectores que provocaban un aumento del transporte, como el salicilato o acetato, no ejercieron ninguna influencia positiva en la biodegradación de naftaleno por la estirpe quimiotáctica. Esto es posiblemente debido a la acción de estos quimioefectores sobre otros procesos microbianos, tales como la regulación de las rutas degradativas, causando probablemente una inhibición inducida por sustrato.

La principal contribución del trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral es la demostración de que, mediante el empleo de quimioefectores, es posible modular la dispersión de las bacterias degradadoras, favoreciéndola o inhibiéndola según la localización de la contaminación (por ejemplo en el tratamiento de vertidos

superficiales, frente a la contaminación presente en acuíferos). Por tanto, la adecuada elección de quimioefectores así como de las especies bacterianas quimiotácticas capaces de degradar los HAPs presentes en el suelo son, *a priori*, los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de aplicar esta innovación tecnológica en la biorrecuperación de suelos contaminados con HAPs.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



El rápido desarrollo tecnológico e industrial del mundo en el que vivimos no sólo ha conducido a la aparición de una gran variedad de productos y actividades, sino también a una corriente de desechos muy compleja. Cuando estos productos de desecho se exponen libremente al medio ambiente pueden representar una seria amenaza para la salud humana y para muchas otras formas de vida. Especialmente durante el siglo XIX y la primera mitad del XX, los desechos contaminados con productos nocivos tales como bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y metales pesados fueron liberados al medio ambiente sin ningún tipo de cuidado. Hoy en día, a pesar de la amplia concienciación medioambiental que se ha ido forjando y a la creación de leyes más estrictas, la introducción de compuestos peligrosos en el medio ambiente continúa. Probablemente la cantidad emitida por fuente sea menos voluminosa, pero las fuentes son increíblemente numerosas. Ambos tipos de contaminación, la actual y la heredada, constituidas por productos dañinos y recalcitrantes necesitan remediación.

Los HAPs son contaminantes orgánicos ubicuos en el medio ambiente constituyentes de productos tales como diesel, gasolinas de aviones, aceites lubricantes, etc. Estos compuestos se forman siempre cuando hay combustión de materia orgánica pero, como contaminantes medioambientales, proceden principalmente del procesado, desecho y quema de combustibles fósiles. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos están clasificados como uno de los contaminantes prioritarios tanto por la agencia de protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) como por la Comunidad Europea, debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Cerniglia, 1992) y por ello se hace cada vez más necesario su estudio, así como el desarrollo de nuevas técnicas que permitan limitar su presencia en el medio ambiente.

Dentro del ecosistema el suelo constituye el principal destino para los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Los suelos contaminados con HAPs se encuentran a menudo en antiguas plantas de fabricación de gas, industrias de conservación de la madera (como ejemplo, la creosota y el aceite de antraceno, que son usados ampliamente como conservadores de la madera, contienen hasta un 85% de HAPs por peso) e industrias petroquímicas, pero también los sedimentos dragados plantean serios problemas.

Los HAPs consisten en anillos bencénicos fusionados dispuestos de forma lineal, angular o en clusters conteniendo solamente carbono e hidrógeno. Las características químicas de estas moléculas, tales como la ausencia de grupos polares, hacen que estos compuestos posean una baja solubilidad en agua y tiendan a adsorberse a las partículas orgánicas, o a estar en la fase líquida no acuosa de las zonas contaminadas (Cerniglia, 1992; Harms y Zehnder, 1995). La hidrofobicidad de los HAPs también se traduce en valores altos de sus coeficientes de reparto octanol-agua (Kow). Con el aumento del peso molecular, la hidrofobicidad aumenta, provocando una disminución en la concentración en el agua de los HAPs de gran peso molecular. Estas características son los factores más importantes que influyen en la persistencia de los HAPs en el medio ambiente.

La volatilización, la adsorción a la materia orgánica, la oxidación química, la fotooxidación, la bioacumulación, el lavado y la biodegradación son los mecanismos principales que controlan el destino de los HAPs en el medio ambiente (Cerniglia, 1992; Cerniglia y Heitkamp, 1989). Las bacterias, los hongos y las algas pueden metabolizar los HAPs, llevando a cabo su mineralización, especialmente los HAPs de bajo peso molecular, o su transformación parcial mediante cometabolismo, particularmente los HAPs de gran peso molecular (Cerniglia y Heitkamp, 1989; Gibson y Subramanian, 1984; Wilson y Jones, 1993).

Es bien conocido que la exposición a HAPs constituye un riesgo para la gente que vive en zonas industrializadas. Las vías de exposición humana a los HAPs son la aspiración (la respiración del aire contaminado), la ingestión (bebidas y comida contaminada) y la absorción por la piel. En la actualidad está demostrada su bioacumulación en las plantas (Wild et al., 1992) y en algunos animales (DeLeon et al., 1988; Jackson et al., 1994), evidenciando su transferencia a la cadena alimentaria.

Debido a su naturaleza hidrófoba, los HAPs pueden migrar atravesando las membranas lipídicas de la célula y pueden concentrarse en los tejidos grasos. Los efectos carcinogénicos de los HAPs sobre las células de los mamíferos son consecuencia de la activación metabólica de los epóxidos diol, que son moléculas altamente reactivas que se enlazan covalentemente con el ADN. Esta activación ocurre principalmente en los microsomas del retículo endoplasmático y es catalizada por enzimas monooxigenasas asociadas al citocromo P-450. La mayoría de los HAPs no sustituidos con dos o tres anillos bencénicos (naftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno y pireno) no son carcinogénicos en animales experimentales. Sin embargo, los tests de genotoxicidad basados en la integridad del ADN de los mamíferos (mutación, anormalidades cromosómicas) son positivos para la mayoría de los HAPs, los cuales también afectan al sistema inmune de los mamíferos.

I.1 BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUELOS: EL PROBLEMA DE LA BIODISPONIBILIDAD

I.1.1 BIORREMEDIACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD

El objetivo de la biorremediación es la biodegradación de los contaminantes por parte de microorganismos, plantas y animales, los cuales mediante su actividad metabólica asimilan o modifican todo tipo de sustancias presentes en el medio ambiente. 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, tales como la incineración, la extracción con disolventes, la extracción en fase sólida y la oxidación química a través del uso de oxidantes fuertes.

La biodegradación es considerada como la principal vía de eliminación de HAPs de los ambientes contaminados, y se aplica en la remediación de zonas contaminadas con estos compuestos. Se pueden considerar tres tipos de biorremediación: bioestimulación, bioaumentación y bioatenuación natural (Alexander, 1999). La bioestimulación consiste en promover un ambiente favorable para las comunidades microbianas autóctonas en el cual son capaces 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. La bioaumentación consiste en la adición al medio ambiente contaminado de estirpes competentes específicas o consorcios microbianos, capaces de degradar los contaminantes (El Fantroussi y Agathos, 2005). Aunque ha sido usada en el tratamiento de aguas residuales durante muchos años, la bioaumentación no se usa generalmente en suelos contaminados con HAPs ya que las bacterias inoculadas generalmente no pueden competir con las comunidades microbianas autóctonas perfectamente adaptadas (El Fantroussi y Agathos, 2005; Kaplan y Kitts, 2004). En la bioatenuación natural, se hace un seguimiento de la degradación de contaminantes por las poblaciones microbianas autóctonas en las zonas contaminadas; es, económicamente, muy atractiva puesto que es una estrategia de biorremediación pasiva *in situ*, pero requiere un largo periodo de tiempo para poder alcanzar el nivel de contaminantes deseado.

El principal agente que causa las transformaciones biológicas en suelos, sedimentos, aguas residuales, aguas subterráneas y de superficie, son los microorganismos que habitan estos ambientes. Además, los microorganismos son los únicos agentes que transforman los compuestos químicos sintéticos en productos inorgánicos, proceso que es conocido como mineralización. Para que la biodegradación pueda tener lugar en un ambiente deben cumplirse varias condiciones (Alexander, 1973):

1. Debe estar presente un organismo con las enzimas necesarias para realizar la biodegradación.
2. El compuesto químico debe ser accesible al organismo que tiene las enzimas necesarias. La inaccesibilidad puede ocurrir si el substrato se encuentra en un microambiente distinto al del organismo, en un solvente no miscible con agua, o adsorbido a superficies sólidas.
3. Si la enzima inicial que provoca la degradación es extracelular, los enlaces químicos sobre los que actúa la enzima deben estar expuestos para que la catálisis tenga lugar. Pero esto no siempre ocurre debido a la adsorción de muchas moléculas orgánicas.
4. Si las enzimas que catalizan la degradación inicial son intracelulares, la molécula debe penetrar la superficie de la célula hasta la zona interna donde la enzima actúa. Alternativamente, los productos de reacciones extracelulares deben penetrar en la célula para que la transformación prosiga.
5. Si la población de bacterias o de hongos que actúan sobre los compuestos sintéticos es inicialmente pequeña, las condiciones ambientales deben permitir la proliferación de los microorganismos potencialmente activos.

Un factor limitante para la biodegradación es la biodisponibilidad de los contaminantes. Para las ciencias ambientales, la biodisponibilidad representa la accesibilidad de un compuesto para su asimilación biológica y posible toxicidad. Este concepto se ha convertido en un tema central en el estudio del destino de xenobióticos orgánicos en suelos, dado que a menudo su asociación a los sólidos presentes (Lahlou et al., 2000; Ortega-Calvo et al., 1999; Ortega-Calvo y Saiz-Jimenez, 1998) o su presencia en líquidos en fase no acuosa (o NAPLs) (García-Junco et al., 2001; Ortega-Calvo et al., 1995) da lugar a una reducción significativa de su biodisponibilidad. Esto conlleva a su persistencia, tanto en suelos sobre los que no hay ningún tipo de actuación, como incluso en los sometidos a técnicas de biorremediación. En este último caso, la baja biodisponibilidad hace a veces difícil alcanzar, en tiempos y costes razonables, los niveles de calidad del suelo establecidos por los organismos reguladores.

Básicamente los HAPs están disponibles para los microorganismos sólo cuando están disueltos en la fase acuosa (Bouchez et al., 1995; Harms y Bosma, 1997; Harms y Zehnder, 1995; Ogram et al., 1985). En un gran número de estudios se tuvieron en cuenta los diferentes estados físicos en los que puede encontrarse un sustrato a la hora de su biodegradación. Por ejemplo, algunos autores estudiaron la degradación del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético en los suelos, y encontraron que las bacterias adheridas y suspendidas son capaces de degradar solamente los compuestos en solución, estando el compuesto adsorbido protegido de la biodegradación (Ogram et al., 1985). Otros estudios (Guerin y Boyd, 1992; Guerin y Boyd, 1997) demostraron que el naftaleno puede ser mineralizado a través de distintos mecanismos, que implican diferentes modos de adquisición del compuesto adsorbido. En un trabajo se propuso, basándose en resultados de la biodegradación de 3-clorodibenzofurano adsorbido, que las bacterias adheridas son capaces de realizar la degradación más eficazmente que las bacterias suspendidas, mediante la creación de gradientes de concentración más acentuados dentro de las partículas, que favorecen la difusión hacia el exterior de los sorbentes (Harms y Zehnder, 1995). La importancia de la adhesión microbiana a la fuente de compuesto químico que se degrada se ha demostrado no solamente para compuestos adsorbidos, sino también para compuestos químicos sólidos (Thomas y Alexander, 1987) y líquidos (Nakahara et al., 1977), así como disueltos en líquidos en fase no acuosa (NAPLs) (Ortega-Calvo y Alexander, 1994).

Por tanto, los microorganismos degradadores son capaces, potencialmente, de superar esta limitación, a través de mecanismos específicos ya establecidos, tales como adhesión y la producción de tensioactivos biológicos.

La quimiotaxis constituye también un mecanismo potencial para superar la baja biodisponibilidad en suelos. La creación de gradientes en un sistema tan inmóvil como es el suelo origina que, a menudo, la desaparición de los contaminantes mediante la acción microbiana siga una cinética de primer orden típica de situaciones de bajas concentraciones de sustratos, incluso en situaciones de contaminación masiva. La capacidad de localizar gradientes químicos y situarse en ellos mediante quimiotaxis puede suponer, *a priori*, una forma de superar esta baja biodisponibilidad. Aunque existen algunos estudios sobre quimiotaxis en relación a la biodegradación

de xenobióticos (Parales et al., 2000; Witt et al., 1999), su papel en la biodisponibilidad de contaminantes en suelos es un tema relativamente poco explorado.

I.1.2 BIODERADACIÓN DE HAPs EN NAPLs

Muchos contaminantes no se encuentran en los puntos de contaminación en fase acuosa o adsorbidos a sólidos sino en líquidos que son inmiscibles con agua. Estos líquidos en fases no acuosas (NAPLs) que contienen contaminantes medioambientales están presentes en acuíferos, subsuelos, sedimentos, suelos, etc. Los líquidos en fase no acuosa son muy conocidos debido a los derrames o escapes de petroleros, y estos NAPLs de petróleo han contaminado aguas superficiales, sedimentos marinos, y playas. La mayoría del petróleo que es vertido inconscientemente en aguas marinas, finalmente, se deposita en el fondo del mar y persiste en los sedimentos. Vertidos comparables de petróleo o productos del mismo han ocurrido en tierra como resultado de derrames de depósitos de coches o de oleoductos. La gasolina, productos del petróleo, o solventes industriales han contaminado acuíferos y aguas subterráneas en un número incontable de sitios debido a los tanques de almacenaje subterráneos que, después de muchos años enterrados, se corroen y empiezan a liberar su contenido. Además, los emplazamientos de residuos peligrosos contienen solventes industriales, y no muy comúnmente, estos solventes orgánicos se desplazan de sitio y penetran en las aguas subterráneas adyacentes, frecuentemente convirtiendo en no potable lo que era anteriormente un suministro de agua seguro. Si el derrame de material en el subsuelo es denso, se desplazará hacia abajo y descansará y permanecerá como una piscina en el fondo del acuífero. Éstos son conocidos como NAPLs densos (DNAPLs).

Los NAPLs generalmente contienen una mezcla de moléculas orgánicas, aunque un derrame de solvente de una fuente industrial o de un tanque de almacenamiento subterráneo puede contener una única sustancia química. Típicamente, los NAPLs están compuestos por moléculas que tienen bajas solubilidades en agua y altas solubilidades en solventes orgánicos, y la concentración en fase acuosa es, por tanto, bastante baja. Sin embargo, el NAPL representa una fuente a largo plazo de contaminación de aguas debido a que los contaminantes continuarán entrando en la fase acuosa para reemplazar aquello que es transportado, biodegradado o eliminado por alguna técnica de biorremediación.

La observación de los emplazamientos contaminados muestran que los NAPLs son, a menudo, extremadamente persistentes; los compuestos que están presentes dentro de los NAPLs son obviamente también persistentes.

Existe un número de factores que influyen en la biodegradación de los constituyentes individuales de los NAPLs:

1. La capacidad intrínseca de la microflora en ese punto para transformar los constituyentes.

2. La tasa de reparto de los constituyentes desde el NAPL a la fase acuosa. Éstas varían dependiendo de la identidad del NAPL (Carroquino y Alexander, 1998).
3. Viscosidad. Es posible que la viscosidad afecte a la tasa de biodegradación porque cuanto más viscoso sea el NAPL menor será el reparto del contaminante desde éste a la fase acuosa (Chen et al., 1994).
4. Toxicidad. Éste es el factor más importante que afecta a la biodegradación de los compuestos presentes en NAPLs.
5. La superficie de interfase entre el NAPL y la fase acuosa.
6. La presencia de otros constituyentes que sean degradados más rápidamente que el compuesto específico de interés.
7. Una concentración umbral de equilibrio en la fase acuosa demasiado baja para permitir el crecimiento de las especies responsables. Además, si el componente químico de interés es transformado solo por cometabolismo, este componente puede ser transformado más rápidamente si el NAPL tiene los constituyentes que permitan el crecimiento de las especies cometabolizantes.

Existen tres mecanismos que parecen explicar cómo los microorganismos utilizan los compuestos presentes en NAPLs (Alexander, 1999). Éstos se centran en cómo los compuestos químicos se transfieren desde el medio ambiente que rodea al organismo a la superficie celular, desde la cual es transportado a través de la membrana y hacia los sitios intracelulares de actividad enzimática. Los mecanismos son los siguientes:

1. Solamente se utilizan los compuestos químicos que se encuentran en la fase acuosa. Una vez que son asimilados por la célula, el organismo únicamente puede usar moléculas que entren en la fase acuosa por reparto espontáneo, y por lo tanto, una degradación posterior dependerá de la tasa de reparto espontáneo a la fase acuosa.
2. Los microorganismos excretan productos que convierten el substrato en gotas con tamaños inferiores a 1 μm , y éstas son después asimiladas por el organismo. Debido al pequeño tamaño de las gotas o partículas, este proceso recibe, a veces, el nombre de pseudosolubilización. El proceso comúnmente implica la excreción por los microorganismos de agentes tensioactivos que facilitan la pseudosolubilización.
3. Las células entran en contacto directo con el NAPL, en las superficies en las que la población se desarrolla, y el compuesto químico cerca o en el punto de contacto con los organismos atraviesa la superficie celular y entra en el citoplasma.

Los microorganismos utilizan los NAPLs y los constituyentes de los mismos siguiendo cada uno de estos tres mecanismos.

I.1.3 INFLUENCIA DE LOS TENSOACTIVOS SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD

Los tensioactivos son moléculas orgánicas constituidas por una parte hidrofóbica y otra hidrofílica (figura I.1). La parte hidrofílica de la molécula tiene afinidad por el agua y por otras sustancias polares, mientras que la parte hidrofóbica hace que los tensioactivos tengan tendencia a concentrarse en las interfases, reduciendo la energía libre del sistema con el cual interaccionan. Como resultado de su naturaleza anfótera, una molécula de tensioactivo puede disolverse en agua como monómero, adsorberse en una interfase o puede incorporarse junto con otras moléculas de tensioactivo como parte de una micela.

La presencia de moléculas de tensioactivo en las interfases aire-agua provoca una reducción en la tensión superficial de la solución (disminuyen la atracción de las moléculas de agua entre sí en la superficie) (Liu et al., 1995).

Otra característica de los tensioactivos es la formación de micelas, pequeños agregados de moléculas del tensioactivo. A bajas concentraciones y en solución acuosa, lo que está presente son moléculas individuales del tensioactivo (unidades monoméricas). Por encima de una cierta concentración, llamada concentración crítica micelar ("Critical Micelle Concentration", CMC), las moléculas de tensioactivo se encuentran formando agregados que oscilan entre 20 y 200 moléculas. El número de moléculas de tensioactivo que constituyen una micela se denomina número de agregación. La CMC depende de la temperatura y es diferente para cada tensioactivo. En términos simples, las micelas son pequeñas gotas con un núcleo hidrofóbico y una envoltura hidrofílica. La presencia de dichas estructuras micelares permite aumentar la solubilidad aparente de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs), como por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos, debido a que éstos pueden ser alojados en el interior del núcleo hidrofóbico de las micelas. Esto es interpretado como un fenómeno de pseudo-solubilización.

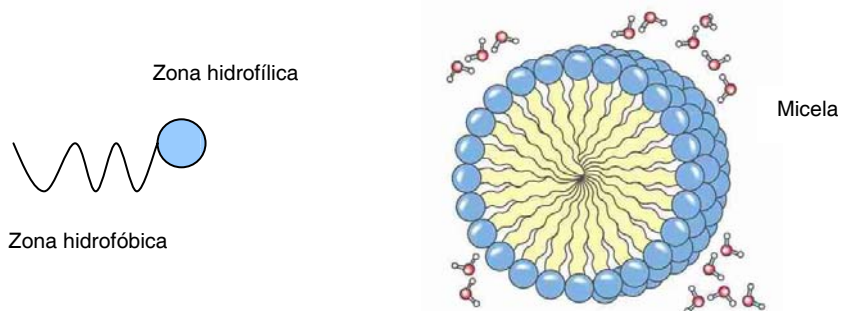
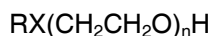


Figura I.1 Estructura de los tensioactivos en solución acuosa

Los tensioactivos pueden ser clasificados como catiónicos, aniónicos, anfotéricos y no iónicos dependiendo de la presencia o no de carga en sus moléculas. Los tensioactivos no iónicos son, generalmente, los más empleados en estudios de

biodegradación, debido a que la ausencia de carga en sus moléculas minimiza las interacciones entre las moléculas del tensioactivo y las enzimas localizadas en las membranas bacterianas necesarias para la degradación del contaminante (Volkering et al., 1995). Además presentan valores de CMC menores que el resto de los tensioactivos.

Entre los tensioactivos no iónicos, los conocidos como polioxietilenos (POE) son los más abundantes y técnicamente los más importantes. Estos tensioactivos presentan una fórmula general del tipo:



Donde R es un poliéter, X es oxígeno u otro grupo funcional capaz de dotar a la cadena de hidrofobicidad y n es el número de unidades de oxietilenos presentes y debe ser mayor de 5 ó 6 para que el tensioactivo no iónico sea soluble en agua. Los tensioactivos no iónicos más importantes son alcoholes etoxilatos, alquil fenol etoxilatos, ésteres de polioxietileno y derivados de polioxietileno-polioxipropileno.

Cuando se añade un tensioactivo al suelo, éste puede condicionar el transporte bacteriano a través del mismo, debido a su influencia en las interacciones de las bacterias con las interfases. Estos efectos pueden ser debidos a diferentes causas:

- El tensioactivo puede causar una disminución de la adsorción reversible de la bacteria debido a un cambio en la superficie de la membrana celular.
- El tensioactivo puede aumentar la floculación y con ello incrementar el transporte de la bacteria.
- El tensioactivo puede provocar la disolución de los polímeros extracelulares responsables de la adsorción irreversible de la bacteria.

Otro de los efectos provocados al añadir agentes tensioactivos al suelo es que pueden resultar tóxicos para los microorganismos responsables de la degradación del contaminante, sobre todo cuando estos se encuentran presentes en concentraciones superiores a sus CMC (Laha y Luthy, 1991). De forma indirecta porque los tensioactivos pueden aumentar la concentración de contaminante en la fase acuosa, o bien de forma directa debido a reacciones de las moléculas de tensioactivo con proteínas esenciales para el funcionamiento de la célula. No obstante, los tensioactivos no iónicos, en general, resultan menos tóxicos para las bacterias que los tensioactivos iónicos.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral el tensioactivo no iónico seleccionado ha sido un alquiletoxilato (Brij 35). Numerosos estudios han demostrado que Brij 35 aumenta la desorción de los HAPs en suelos debido principalmente al tipo de interacción tensioactivo-suelo (Bueno-Montes, 2005; Chu y Chan, 2003; Edwards et al., 1994; Kibbey y Hayes, 1997), incrementa la disolución (Edwards et al., 1991; Prak y Pritchard, 2002) y biodegradación de dichos compuestos tanto en sistemas acuosos como en suelos (Guha et al., 1998; Laha y Luthy, 1992; Piskonen y Itävaara, 2004; Tiehm, 1994), es en mayor o menor medida biodegradable (Kim et al., 2001) y

aumenta el transporte bacteriano a través de medios porosos saturados (Brown y Jaffé, 2001).

Sin embargo, la presencia de micelas en la fase acuosa, en cuyo núcleo hidrofóbico se encuentran pseudosolubilizados los contaminantes, puede suponer un inconveniente a la hora de aplicar técnicas de biorrecuperación ya que los compuestos orgánicos hidrofóbicos en esta situación no se encuentran disponibles para ser biodegradados. Un estudio demostró que, ninguno de los contaminantes que se encontraba en el interior de las micelas del tensioactivo no iónico Brij 35, formadas cuando el tensioactivo se encuentra a una concentración superior a su concentración micelar crítica (CMC), estaba directamente biodisponible (Guha y Jaffé, 1996). La causa es que este tensioactivo tiene una cadena hidrofílica muy larga y podría obstaculizar la interacción entre las micelas y las bacterias con superficies celulares hidrofóbicas. Por tanto, la transferencia directa del HAP estudiado desde la micela a la bacteria podría no ser posible. Otros autores (Volkering et al., 1995; Zhang et al., 1997) obtuvieron resultados semejantes a estos, donde estudiaban que la presencia de micelas disminuía la biodisponibilidad de HAPs.

I.2 INTERACCIONES BACTERIANAS CON SUPERFICIES SÓLIDAS

I.2.1 MECANISMOS DE DEPOSICIÓN BACTERIANA

La deposición bacteriana sobre superficies sólidas incluye dos pasos: transporte y adhesión. El transporte se determina hidrodinámicamente mientras que el paso de la adhesión está controlado por las interacciones célula-substrato. Tras la deposición, las células adheridas pueden excretar polímeros y empezar a multiplicarse: esto conduce a la formación de microcolonias adheridas a la superficie o incluso a biofilms gruesos y continuos.

En los sistemas estáticos, la difusión controla el transporte de partículas desde el medio líquido al substrato (figura I.2 A). La difusión es el movimiento de moléculas gaseosas o aerosoles dentro de líquidos, causados por un gradiente de concentración. Ésta provoca desplazamientos aleatorios, lo que es conocido con el nombre de movimiento Browniano. Bajo condiciones dinámicas, la transferencia de células tiene lugar por convección y difusión, siendo la convección, la propagación del calor en fluidos o líquidos por el movimiento de sus partículas producido por la diferencia de densidad. La movilidad propia de las bacterias, así como el fenómeno de la sedimentación contribuyen al transporte en los dos casos.

Como ya se citó anteriormente, las interacciones célula-substrato gobiernan el paso de la adhesión durante la deposición. En general, estas interacciones se expresan en términos de energía de Gibbs, que es función de la separación h entre la célula y la superficie (Van Loosdrecht et al., 1989) (figura I.2 B). Existen tres modelos matemáticos que describen las interacciones entre las superficies sólidas y las bacterias.

1. La teoría DVLO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) de estabilidad coloidal (Rutter y Vincent, 1984; Van Loosdrecht et al., 1987a; Van Loosdrecht et al., 1990; Van Loosdrecht et al., 1989) explica las interacciones de largo alcance electrostáticas y de Van der Waals como función de la separación h célula-sólido. Para las bacterias este modelo no se aplica a interacciones de muy corto alcance.
2. El método de la tensión interfacial (IT) (Absolom et al., 1983; Busscher et al., 1984; Van Oss, 1991) está basado en el concepto de la formación y destrucción de interfases, es decir, solo considera las situaciones de antes ($h=\infty$) y después de la adhesión. El modelo sólo explica las interacciones de corto alcance, puesto que asume que la adhesión ocurre a $h=0$.
3. La teoría de estabilidad coloidal estérica (SCS) se compone de las interacciones resultantes de las macromoléculas en las interfases bacteria-agua y agua-sólido (Fleer y Scheutjens, 1993). Las interacciones estéricas son función de h .

La teoría DVLO incluye las interacciones electrostáticas que también afectan a la adhesión bacteriana. Por tanto esta teoría se podrá utilizar para evaluar, al menos parcialmente, la adhesión microbiana. Las interacciones no incluidas en la teoría DVLO, relacionadas con la hidrofobicidad de las células y sólidos, pueden ser explicadas por el modelo SCS, que aporta una interpretación cinética de la deposición de partículas (bacteriana), al contrario que el modelo IT. Por tanto, las teorías SCS y DVLO son complementarias y juntas cubren las interacciones para todo el rango h (figura 1.2 C).

Las interacciones coloidales incluyen las interacciones de van der Waals, electrostáticas (Rutter y Vincent, 1980), y ácido-base (Van Oss, 1994) y se pueden calcular siguiendo el modelo extendido DVLO, descrito por Van Loosdrecht et al. (1989) y Van Oss (1994).

Las interacciones coloidales de largo alcance dependen de las características superficiales de las partículas implicadas, y de la distancia de separación h entre sus superficies. El modelo extendido de DVLO permite el cálculo de la entalpía de interacción ($G^{DLVO-AB}$). Esto incluye las interacciones de van der Waals (G^{vdW}), electrostáticas (G^{el}) y ácido-base (G^{AB}) (Van Oss et al., 1986; Van Oss, 1994):

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

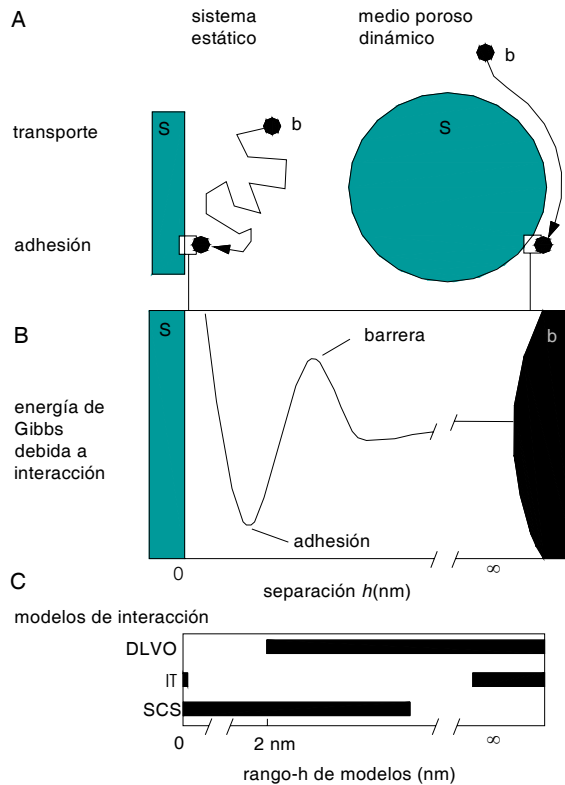


Figura I.2 A, Deposition en sistemas estáticos (transporte fundamentalmente por difusión) y en medios porosos dinámicos (transporte fundamentalmente por convección): S significa Substrato, b bacteria. **B**, La energía de Gibbs debida a la interacción como función de la separación h célula-sólido. **C**, Modelos de interacción para evaluar la energía de Gibbs en los rangos de interacción y separación en los que se aplica

El modelo DLVO deriva de las interacciones entre coloides y superficies sólidas. Por tanto, su aplicación a bacterias implica asumir que las bacterias se comportan como coloides. Una bacteria que se aproxima a una superficie sólida es atraída por las fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas pueden ser calculadas en función de la distancia de separación h (Rutter y Vincent, 1980). La fuerza depende de la polarización de las superficies implicadas y se expresa mediante la constante de Hamaker (H), calculada para la interacción de la bacteria (H_b) y la superficie (H_s) a través del agua (H_a):

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

Las interacciones electrostáticas son repulsivas, si las cargas de ambas superficies son del mismo signo, y atractivas, si son de signos contrarios. Estas interacciones resultan de la superposición de las dobles capas eléctricas que existen en las

superficies de las bacterias y en las superficies sólidas. La doble capa eléctrica está formada por iones en el medio, que protegen los grupos funcionales que están en las superficies. El grosor de la doble capa depende de la concentración de iones (o fuerza iónica I) en el medio y determina las diferencias entre las interacciones electrostáticas. El aumento de la fuerza iónica no solo reduce el grosor de la doble capa, si no también la carga superficial aparente. Puesto que la carga superficial no se puede medir directamente, se puede utilizar el potencial zeta ζ para el cálculo de las interacciones electrostáticas (Rutter y Vincent, 1980).

Las aproximaciones numéricas para el cálculo de las interacciones electrostáticas y de van der Waals de acuerdo al modelo clásico de DVLO, como se explicó anteriormente, es aplicable para distancias de separación de más de 2 nm. Por debajo de esos 2 nm las fuerzas dominantes son las fuerzas de interacción química, tales como las ácido-base. Estas interacciones proceden de la interacción de Lewis ácido-base (aceptor de electrones/dador de electrones) de los grupos presentes en las dos superficies. La fuerza de las interacciones ácido-base puede calcularse a partir del ángulo de contacto (Van Oss, 1994; Van Oss, 1995). Las interacciones ácido-base son repulsivas entre bacterias hidrofílicas ($\theta_w < 75^\circ$) y superficies hidrofílicas y atractivas si al menos una de las superficies es hidrofóbica.

De acuerdo con el modelo extendido de DVLO, la adhesión de una bacteria a una superficie sólida solo es posible en un mínimo de energía atractivo primario o secundario de $G^{DLVO-AB}(h)$ (figura 1.3). Ese mínimo necesita una cierta profundidad. Si no, el movimiento Browniano o la carga hidrodinámica arrastrarían a las bacterias. La profundidad mínima de ese mínimo para que se mantenga la adhesión está situado entre $-5 kT$ y $-3 kT$ ($1 kT = 4.0 \times 10^{-21}$ J) (Rijnaarts et al., 1993; Rutter y Vincent, 1980; Van Loosdrecht et al., 1989). La adhesión en un mínimo primario es irreversible, mientras que la adhesión en un mínimo secundario es reversible incluso bajando la fuerza iónica, debido a las fuertes interacciones electrostáticas que empujan a la célula lejos de la superficie.

Existen, sin embargo, muy a menudo discrepancias en la adhesión bacteriana con respecto a los cálculos que se obtendrían de acuerdo al modelo extendido de DVLO. Estas discrepancias son atribuibles a las interacciones entre los polímeros de las superficies celulares y la superficie del sólido, que este modelo no tiene en cuenta. Las interacciones poliméricas pueden ser atractivas o repulsivas. Estas interacciones pueden provocar adhesión bacteriana aún cuando, según el modelo extendido de DVLO la atracción no fuese suficiente para que se produjese dicha adhesión.

Por último, existe otra clase de interacciones entre las bacterias y las superficies sólidas. Estas interacciones son fuertes, de corto alcance (0,1- 0,2 nm) y surgen del contacto directo de las moléculas de la superficie celular y las superficies sólidas. Se trata de enlaces químicos como enlaces covalente o puentes de hidrógeno.

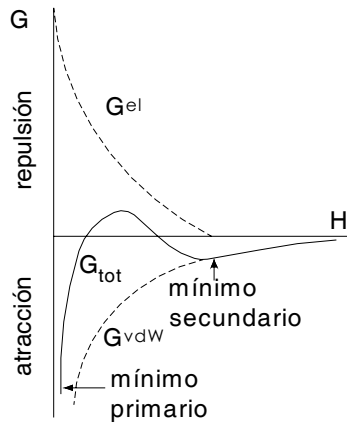


Figura I.3 Energía de Gibbs resultante de la interacción entre una bacteria y una superficie, de acuerdo con la teoría de la estabilidad coloidal, en el caso de una fuerza iónica intermedia. G_{tot} es la resultante de una fuerza electrostática, normalmente repulsiva (G^{el}) y de una interacción de van der Waals atractiva (G^{vdW})

I.2.2 TEORÍA DE LA FILTRACIÓN DE COLOIDES

La teoría de la filtración de coloides (CFT) (Rijnaarts et al., 1996) se utiliza para cuantificar los procesos descritos anteriormente, teniendo en cuenta la transferencia de partículas desde el medio acuoso a la superficie (colector) y la adhesión, en cuanto a la eficiencia de transferencia de masa del colector, η (la probabilidad de que una partícula que se acerque al colector alcance la superficie) y a la eficiencia de colisión o adhesión, α (la probabilidad de que una partícula se adhiera una vez alcanzada la superficie). El factor η incluye los efectos de la gravedad, el papel de la difusión y las fuerzas atractivas de van der Waals:

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

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, η es la eficiencia del colector y α es la eficiencia de colisión. Esta ecuación se simplifica a menudo, definiendo un coeficiente de filtración λ . La eficiencia de colisión α corresponde a la fracción de colisiones que finalmente dan lugar a la adhesión de la partícula, y es esperable que dependa de la energía de interacción $\Delta G^{DLVO-AB}(h)$ y otros factores. En ausencia de fuerzas repulsivas, α se aproxima a 1.

La aplicación directa de la CFT implica que el sistema está operando bajo condiciones de "lecho limpio". Esta asunción implica que los coloides que se

aproximan interaccionan solamente con la superficie del colector, resultando en una deposición exponencial.

Sin embargo, se ha encontrado que a veces durante el transporte bacteriano ocurre una deposición no exponencial, contrariamente a lo que predice la CFT. Uno de los procesos que hace que tenga lugar ese comportamiento no-exponencial es el desprendimiento celular. Otro proceso que provoca este comportamiento es el bloqueo de las bacterias depositadas que evitan que las bacterias que se están acercando alcancen la superficie del colector. Un término Lagmuiriano se aplica a menudo al coeficiente de filtración de la CFT para explicar esta interacción de "lecho no limpio":

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

donde λ_0 es el coeficiente de filtro, β es el parámetro de bloqueo, y σ es el depósito específico de coloides en el medio poroso.

El nivel de α está controlado por las interacciones célula-sólido y por la cantidad de bacteria adherida previamente. Una partícula (bacteria) adherida puede reducir la deposición bloqueando parte de la superficie del colector. Existe una expresión para la influencia de las interacciones célula-sólido y célula-célula (bloqueo) en α :

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

donde α_0 es la eficiencia de colisión de lecho vacío ($\Theta=0$), B el factor de bloqueo que se define como la relación entre el área bloqueada por una célula adherida y el área geométrica de esa célula, y Θ es la fracción de superficie cubierta por células, es decir, $\Theta=(\text{el número de células depositadas}) \times \pi a_b^2/A_{\text{col}}$, 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. El valor de α_0 viene determinado, fundamentalmente, por las interacciones célula-sólido mientras que B depende de las interacciones célula-célula. Además, tanto α_0 como B dependen de las condiciones hidrodinámicas del sistema.

I.3 QUIMIOTAXIS BACTERIANA

Las poblaciones bacterianas pueden encontrarse con un gran espectro de ambientes diferentes a lo largo de sus ciclos de vida. Debido a su pequeño tamaño y a su relativa simplicidad, su capacidad para adaptar el medio ambiente a sus necesidades es muy limitada. Sin embargo, pueden adoptar estrategias de movimiento desde un medio ambiente a otro. La quimiotaxis, al igual que otros tipos de taxis (p.e. termotaxis y fototaxis) permite a la bacteria acercarse a (y permanecer en) ambientes beneficiosos y escapar de los hostiles. La quimiotaxis también sirve como medio de comunicación intercelular y de reclutamiento celular bajo condiciones de stress. Por tanto, no es sorprendente que un gran número de especies bacterianas sean móviles y quimiotácticas. De hecho, la mayoría de las bacterias con forma de bastoncillo son móviles, independientemente de su clasificación (p.e. Gram-positivas o Gram-negativas, aerobias o anaerobias, formadoras de esporas o no, etc.). Por el contrario la mayoría de las especies redondas, o cocos, son inmóviles (Eisenbach, 2001).

El fenómeno de la quimiotaxis bacteriana fue descubierto por W. Engelmann (1881) y W. Pfeffer (1884). En 1960 se comenzó una cuidadosa investigación sobre este tema con estudios cuantitativos, genéticos y bioquímicos llevados a cabo por J. Adler. Fue a lo largo de estos años en los que se aportó una amplia e importante evidencia bioquímica y genética de que la quimiotaxis en *Escherichia Coli* era independiente del metabolismo de estímulos químicos (Adler, 1969).

La quimiotaxis es el movimiento activo y dirigido de la bacteria a través de un gradiente químico hacia concentraciones más altas (quimiotaxis positiva) o concentraciones más bajas (quimiotaxis negativa) de efectores químicos. Representa un camino altamente coordinado de las bacterias hasta situarse en lugares de condiciones químicas óptimas. Los quimioatrayentes son típicamente compuestos que actúan como fuente de energía o análogos estructurales, nutrientes o aceptores de electrones adecuados, mientras que los tóxicos a menudo actúan como quimiorrepelentes. En sistemas acuosos abiertos, se ha estudiado que las bacterias se mueven quimiotácticamente entre $20\text{-}40\ \mu\text{m s}^{-1}$ o $1,7\text{-}3,5\ \text{m día}^{-1}$ (Duffy et al., 1995; Frymier et al., 1995; Harwood et al., 1989). Aunque el movimiento bacteriano efectivo puede ser algo más lento, parece ser potencialmente suficiente para salvar distancias importantes y así facilitar el acceso a contaminantes medioambientales en muchos casos, siempre y cuando haya vías de agua continuas.

La mayoría de las investigaciones se han centrado en el estudio de la quimiotaxis en *Escherichia coli* y sólo durante la última década ha recibido más atención el papel de la quimiotaxis en biodegradación y su posible explotación para la biotecnología medioambiental. La primera evidencia de quimiotaxis en bacterias del suelo frente a compuestos de semejanza estructural con contaminantes medioambientales fue hace más de 20 años, cuando se encontró que una serie de ácidos aromáticos atraían a la estirpe *Pseudomonas putida* G7 (Harwood et al., 1984). Desde entonces, se ha estudiado la quimiotaxis a varios benzoatos sustituidos, fenoles y catecolos, compuestos BTEX y otros bencenos sustituidos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos, compuestos alifáticos clorados, alcanos, los herbicidas 2,4-D y atrazina y algunos explosivos como la nitramina (Parales y Harwood, 2002).

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DEL COMPORTAMIENTO MÓVIL BACTERIANO

Las bacterias han adquirido un gran número de estrategias de movilidad: *swimming* (movimiento dirigido por la rotación de los flagelos), *swarming* (movilidad superficial organizada de células en una colonia), *gliding* (movimiento de un organismo en una superficie sólida sin órganos externos visibles para el movimiento y sin cambios de forma), *twitching* (movimiento intermitente y accidentado de una única célula bacteriana o de un grupo de bacterias en una colonia), etc. (Eisenbach, 2001).

La estrategia de movilidad más común entre las bacterias es el movimiento dirigido por la rotación flagelar. Existen diversos tipos de movilidad por flagelos, que dependen de la localización y número de flagelos. En algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Chromatium* y *Halobacterium*, las células se mueven hacia delante y hacia atrás, y la reorientación parece ser debida al

movimiento browniano. En otras especies (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, y *Agrobacterium tumefaciens*), las células se mueven en línea recta y, ocasionalmente, se reorientan activamente. Cabe destacar que algunas estirpes combinan diversos tipos de movilidad.

La especie *Pseudomonas putida* posee un grupo de flagelos polares. El grupo, dependiendo de su dirección de rotación, empuja o tira de la célula, y como consecuencia, la célula va hacia atrás o hacia adelante. En ausencia de quimioatrayente el movimiento es unidireccional con cambios puntuales muy bruscos en la dirección (figura I.4 A). Algunas veces, las células, en lugar de cambiar bruscamente la dirección recta que seguían, se desplazan hacia atrás una cierta distancia antes de continuar con el movimiento continuo en línea recta. En presencia de quimioatrayente, las células cambian de dirección mucho menos frecuentemente y se mueven en una misma dirección y sentido durante periodos prolongados de tiempo (figura I.4 B) (Harwood et al., 1989).

La especie *Pseudomonas aeruginosa* posee un único flagelo en uno de sus extremos. El flagelo, dependiendo de su dirección de rotación, empuja o tira de la célula. Como consecuencia, la célula va hacia atrás o hacia adelante. Diversos autores han encontrado estirpes de la especie *Pseudomonas aeruginosa* con pelos polares (Fuerst y Hayward, 1969). Los pelos, de 6 nm de ancho, actúan como receptores de fagos y son retráctiles. Sin embargo, no se observó la presencia de los mismos en ninguna estirpe de la especie *Pseudomonas putida* (Garrity et al., 2005).

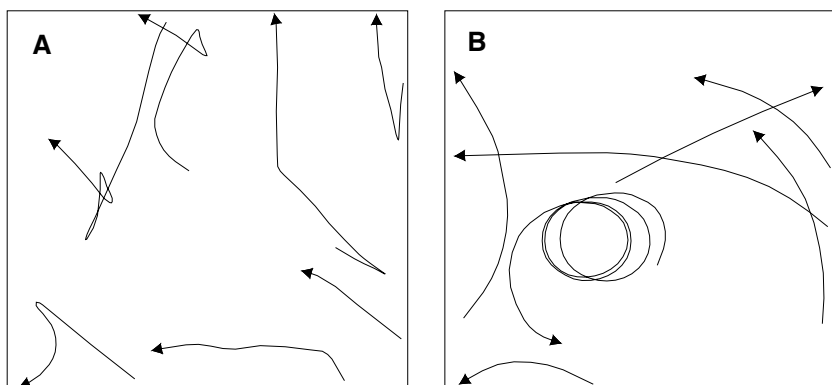


Figura I.4 Ejemplos de los movimientos generados por ordenador sobre la base de observaciones al microscopio óptico de células de *Pseudomonas putida*. **A**, En ausencia de quimioatrayente. **B**, En presencia de quimioatrayente (Harwood et al., 1989)

Las bacterias responden a una gran variedad de estímulos, incluyendo estímulos químicos. El origen de los estímulos químicos puede ser el medio ambiente en sí o las células vecinas. Algunas veces, un cierto estímulo puede actuar como atrayente para algunas especies bacterianas y como repelente para otras. La tabla I.1 recoge un número de estímulos conocidos y los correspondientes comportamientos de las bacterias (cabe destacar que en especies que crecen, en lugar de moverse, en una cierta dirección en respuesta a un estímulo, el sufijo es “tropismo” en lugar de “taxis”: quimiotropismo, termotropismo, etc.). No todas las especies responden a todos los estímulos. De este modo, mientras la quimiotaxis y la termotaxis son probablemente comunes en todas las especies bacterianas capaces de moverse, la magnetotaxis está restringida a aquellas especies que poseen magnetosomas (estructuras intracelulares que consisten en un cristal de un mineral magnético, generalmente Fe_3O_4 o Fe_3S_4 , rodeado por una membrana). Algunas respuestas (por ejemplo quimiotaxis, termotaxis, fototaxis y osmotaxis) aparentemente comparten, al menos parcialmente, un mecanismo molecular común.

La generación continua de energía es una de las condiciones más importantes para la supervivencia de microorganismos en el medio ambiente. Por tanto, no es sorprendente encontrar microorganismos que hayan desarrollado mecanismos que les permita no solo controlar el microambiente que rodea a la célula, si no también su propio estado energético intracelular. La capacidad de los microorganismos para responder a cambios en sus procesos de generación de energía y, como resultado, desplazarse hacia nichos que posean los niveles de energía máximos, se llama taxis energética (Alexandre y Zhulin I.B., 2001; Taylor et al., 1999; Taylor y Zhulin, 1998). La taxis energética describe el mecanismo sensorial, no un tipo de gradiente, y se refiere al movimiento activo de células a través de diversos tipos de gradientes provocado por el análisis de un parámetro asociado a los niveles de energía intracelulares (Alexandre et al., 2004).

Se ha estudiado ampliamente la capacidad de las bacterias móviles para detectar y responder tácticamente a parámetros físicos que están implicados en la generación de energía, tales como luz, oxígeno, y sustratos oxidables (Clayton, 1958).

La taxis energética engloba a la aerotaxis, fototaxis, taxis redox, taxis a aceptores de electrones alternativos, y a la quimiotaxis a sustratos oxidables (Armitage, 1997; Taylor et al., 1999; Taylor y Zhulin, 1998). A través de la taxis energética, las bacterias buscan el ambiente más favorable que posea niveles de energía celular óptimos. En *Escherichia coli*, la quimiotaxis a la mayoría de los estímulos químicos no requiere de su metabolismo (Adler, 1969). Diversos autores han estudiado también que la estirpe *P. putida* G7 es atraída al hidrocarburo aromático bifenilo, un compuesto que no es utilizado por la bacteria como fuente de carbono y energía (Grimm y Harwood, 1997).

Se han observado una gran variedad de respuestas a estímulos entre las diferentes especies bacterianas, incluso cuando las bacterias comparadas muestran el mismo tipo de movilidad, por ejemplo, movilidad flagelar. Dependiendo de la diversidad de movimientos flagelares, algunas especies bacterianas reaccionan frente a cambios en la concentración de estímulos químicos cambiando la dirección de rotación flagelar,

otras cambiando la velocidad de movimiento (quimiocinesis), o parando la rotación. Generalmente, cuando una célula bacteriana siente un estímulo positivo (un aumento en el gradiente de quimioatractivo o una disminución en el gradiente de quimiorrepelente), continúa moviéndose en la misma dirección. Cuando siente un estímulo negativo (una disminución en el gradiente de quimioatractivo o un aumento del gradiente de quimiorrepelente) cesa de moverse en la dirección original y se reorienta.

Tabla I.1 Estímulos conocidos y respuestas funcionales en las bacterias

Estímulos	Respuesta Funcional
Químico	Quimiotaxis
Campo eléctrico	Galvanotaxis
Gravedad	Geotaxis o Gravitaxis
Luz	Fototaxis
Campo magnético	Magnetotaxis
Fluido en movimiento	Reotaxis
Osmolaridad	Osmotaxis
Temperatura	Termotaxis
Tacto	Tigmotaxis
Oxígeno	Aerotaxis

I.3.2 BASES MOLECULARES DE LA QUIMIOTAXIS

Podría decirse que la quimiotaxis es el sistema mejor entendido de transducción de señales que controlan el movimiento. Mientras que el sistema de movilidad difiere de unos organismos a otros, el mecanismo de control general se conserva a través de todas las bacterias. La pieza central de este mecanismo de control es el sistema de “dos componentes” en el cual la fosforilación de un regulador de respuesta refleja la fosforilación de una histidinaautoquinasa que detecta los parámetros medioambientales (figura I.5). Este el tipo de sistema de transducción de señales en bacterias y controla diversos procesos tales como la expresión genética, esporulación, y quimiotaxis (Szurmant y Ordal, 2004).

En quimiotaxis, lo que ocurre en los receptores es lo que controla la autofosforilación de la histidinaquinasa CheA, y la fosfohistidina es el sustrato para el regulador de respuesta CheY, que cataliza la transferencia del grupo fosforil. La resultante CheY-P puede interactuar con el mecanismo de cambio del motor flagelar.

Junto con estas dos proteínas principales, muchas otras proteínas contribuyen a hacer que el proceso funcione. Las proteínas de la quimiotaxis se pueden ordenar en

cuatro grupos: un grupo de reconocimiento de la señal y transducción, un grupo de excitación, un grupo de adaptación, y un grupo de supresión de la señal (cuya función es defosforilar CheY-P). Las proteínas envueltas en el control de la quimiotaxis y su función están recogidas en la tabla I.2.

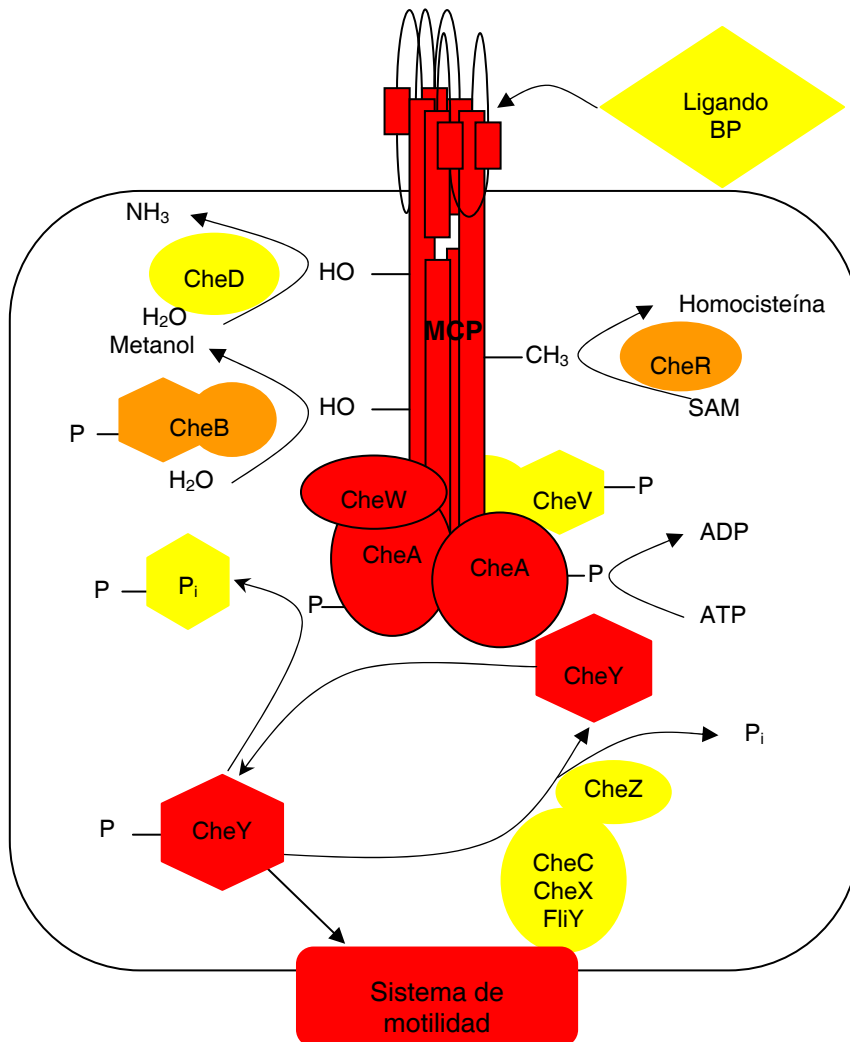


Figura I.5 Modelo general de quimiotaxis. Se muestra un esquema de los procesos bioquímicos de la ruta quimiotáctica de dos componentes. Los hexágonos representan dominios reguladores de respuesta. Los componentes universales están en rojo; los componentes casi universales están en naranja; los componentes opcionales están en amarillo (Szurmant y Ordal, 2004)

Tabla I.2 Lista y descripción de proteínas envueltas en la quimiotaxis (Szurmant y Ordal, 2004)

Proteínas por categorías	Actividad o papel	Comentario	Dónde se encuentran
Reconocimiento de la señal y transducción			
Proteínas de quimiotaxisceptoras de metilos (MCPs)	Receptores	Enlaza quimioefectores y transduce la señal a CheA. Está metilada y desmetilada en residuos de glutamato	Universal entre todas las bacterias quimiotácticas
CheD	Glutamina deamidasa	Papel en la maduración del receptor por deamidación de residuos de glutamato particulares	Bacterias Gram-positivas, <i>Thermatoga</i> , y algunas proteobacterias
Proteínas enlazadas a ligandos	Reconocimiento de ligandos	Une quimioefectores y transduce la señal a los receptores	<i>E. coli</i> , todavía no conocido para otros organismos
Excitación			
CheA	Histidinkinasa	Autofosforilados en residuos de histidina; substrato para CheY y otros reguladores de respuesta	Universal entre todas las bacterias quimiotácticas
CheW	Proteína de acoplamiento	Acopla CheA a los receptores	Universal entre todas las bacterias quimiotácticas
CheY	Regulador de respuesta	Regulador de respuesta primario. Interactúa con el aparato de movilidad induciendo cambios en el comportamiento del movimiento cuando esta fosforilada	Universal entre todas las bacterias quimiotácticas
Adaptación			
CheR	Metiltransferasa	Metila residuos de glutamato en MCPs; papel en la adaptación	Casi universal entre todas las bacterias quimiotácticas
CheB	Metilesterasa	Hidroliza residuos de glutamato en MCPs; papel en la adaptación. Generalmente tiene un dominio regulador de respuesta	Casi universal entre todas las bacterias quimiotácticas
CheV	Proteína de acoplamiento y adaptación	Acopla CheA a los receptores; Los dominios reguladores de respuesta pueden ser fosforilados; papel en la adaptación	Muchas bacterias pero no en <i>E. coli</i>
Supresión señal			
CheC	Fosfatasa y proteína de adaptación	Hidroliza CheY-P; también tiene probablemente un papel en la adaptación	Bacterias Gram-positivas, <i>Thermatoga</i> , y algunas proteobacterias
CheX	Probable fosfatasa	Homóloga a CheC, probablemente tenga la misma función	Algunas bacterias Gram-positivas, <i>Thermatoga</i> , y algunas proteobacterias
CheZ	Fosfatasa	Hidroliza CheY-P	Las β - y γ -proteobacterias
FliY	Fosfatasa en el intercambio flagelar	El término N es homólogo a CheC; hidroliza Che-Y-P; parte integral del cambio flagelar	Bacterias Gram-positivas, y <i>Thermatoga</i>
CheY*	Sumidero de fosfato	CheY alternativo que disminuye los niveles primarios de CheY-P actuando como un sumidero de fosfato	Las α -proteobacterias, posiblemente otras

I.3.3 QUIMIOTAXIS FRENTE A HAPs: CONEXIÓN CON LAS RUTAS DEGRADATIVAS

El naftaleno, que es el HAP con el que se ha trabajado fundamentalmente en esta Tesis Doctoral, es un contaminante prioritario comúnmente encontrado en efluentes industriales y es un constituyente del alquitrán (U.S. EPA, 1987) (tabla I.3). A menudo se usa como un componente modelo para estudios de biodegradación *in situ* de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) porque es fácilmente degradado por las bacterias (Yen y Serdar, 1988). La relativa alta solubilidad del naftaleno (tabla I.4) comparada a las del resto de HAPs (Pearlman et al., 1984) y el hecho de que los genes de la degradación de naftaleno sean codificados por plásmidos (Dunn y Gunsalus, 1973; Eaton, 1994; Ghosal et al., 1987; Platt et al., 1995; Serdar, 1985; Simon et al., 1993; Yen y Serdar, 1988; You et al., 1988; You et al., 1991) ha contribuido a facilitar la investigación sobre la degradación de este compuesto.

Tabla I.3 Fórmula HAPs objeto de estudio y materiales donde es posible encontrarlos


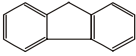
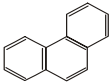
HAP	Fórmula	PM	Muestras en los que puede estar presente
Naftaleno (Naf)		128	Refinados del petróleo, destilados del carbón y alquitrán, agua, aire, alimentos, humo de tabaco y leche materna.
Fluoreno (Flu)		166	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, carne ahumada y asada, pescado, agua y suelos.
Fenantreno (Fen)		178	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, lodos, carne ahumada y asada, pescado, agua y suelos.

Tabla I.4 Propiedades físico-químicas de los HAPs objeto de estudio

	Fórmula	Pto. Fusión (°C)	Pto Ebullición (°C)	Presión de vapor (a 25°C)	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	log K _{ow}
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	80,2	217	-	31,7	3,37
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	115-116	295	9 x 10 ⁻²	1,8	4,18
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	100,5	340	2 x 10 ⁻²	1,29	4,46

Una gran diversidad de microorganismos es capaz de metabolizar parcialmente los HAPs. Los hongos utilizan monooxigenasas asociadas al citocromo P-450 para formar óxidos de areno que posteriormente se transformarán en trans-dihidrodiolés, y también pueden sufrir reorganizaciones no enzimáticas formando derivados fenólicos que son carcinogénicos. La detoxificación ocurre mediante la conjugación de los fenoles con sulfatos o derivados de los azúcares. Los hongos de la podredumbre blanca son organismos ligninolíticos que producen peroxidasas extracelulares sin ninguna o muy poca especificidad por el sustrato que pueden convertir los HAPs en derivados de las quinonas (Bezalel et al., 1996; Cerniglia, 1992; Cerniglia, 1984) (figura I.6).

Al contrario que los hongos y las células de los mamíferos, las bacterias producen dioxigenasas que incorporan dos átomos de oxígeno en el sustrato para formar dioxetanos que son oxidados a *cis*-dihidrodiolés y productos dihidroxilados (Cerniglia, 1992; Cerniglia, 1984); sin embargo, ocasionalmente, se ha descrito una monooxigenación o dioxigenación angular, por ejemplo, en el metabolismo bacteriano de fluoreno y dibenzofurano. El catecol, ácido 2,5-dihidroxibenzoico y el ácido protocatéquico son los intermediarios centrales más comunes en las rutas de degradación de los HAPs. Estos compuestos se metabolizan a succinato, piruvato, fumarato, acetato y acetaldehído, siguiendo diferentes rutas hacia la producción energética, conduciendo a la liberación de CO₂ y agua. El compuesto intermediario obtenido depende de la posición de los grupos hidroxilo (*orto* o *para*) en los compuestos difenólicos iniciales. Todavía no se ha logrado determinar las etapas oxidativas de algunos HAPs de alto peso molecular, como el criseno y el benzo(a)pireno. También hay que recordar que algunos de los HAPs de alto peso molecular no se pueden utilizar como fuente de carbono y de energía, sino que se transforman mediante cometabolismo (Gibson et al., 1975; Heitkamp y Cerniglia, 1988). La biodegradación anaerobia de HAPs también es posible (Coates et al., 1997; Mihelcic y Luthy, 1988).

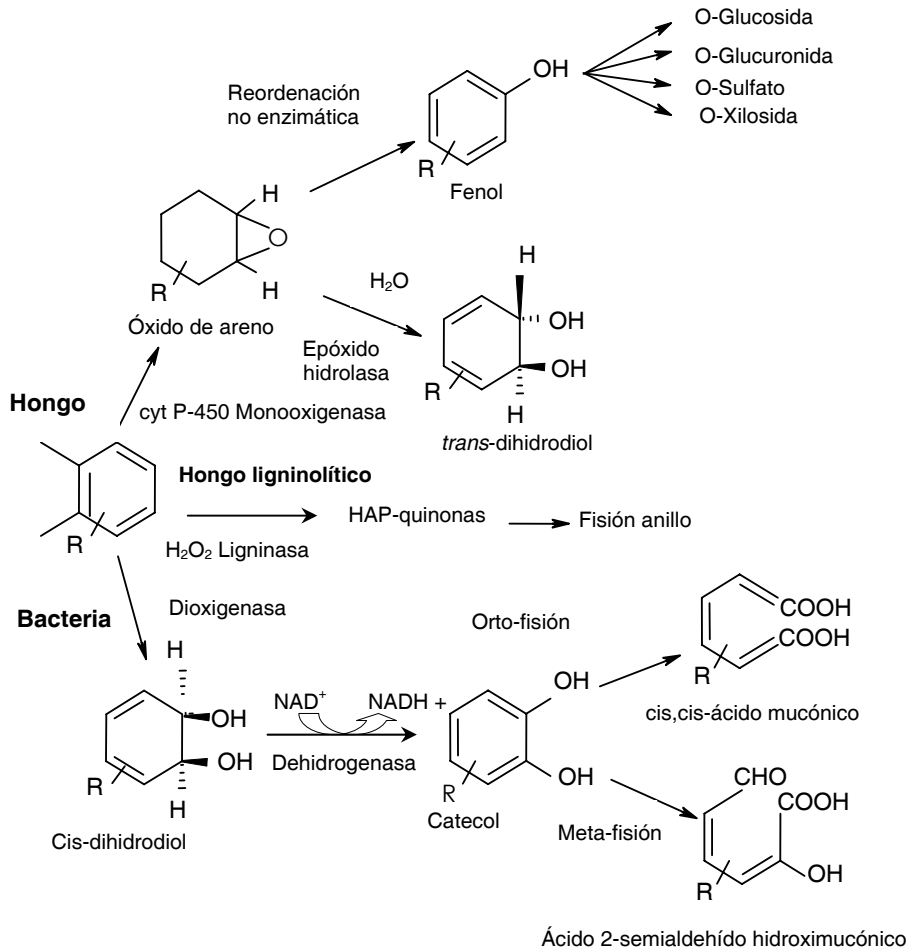


Figura I.6 Vías metabólicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cerniglia, 1992)

NAFTALENO

El mecanismo de oxidación para el naftaleno fue elucidado por primera vez en Pseudomonadaceas del suelo (Davis y Evans, 1964).

La ruta de degradación de naftaleno (figura I.7) lleva en sus primeros pasos a la formación de salicilato. En la mayoría de los casos este salicilato es decarboxilado oxidativamente a catecol, el cual es metabolizado posteriormente mediante ruta *meta* u *orto*. En la ruta *meta*, el catecol se rompe por la posición *meta* por la catecol 2,3-oxigenasa y el intermediario formado se degrada a 2-oxo-4-pentenoato. Éste es metabolizado por la hidratasa 2-oxo-4-pentenoato y por una aldolasa, obteniéndose finalmente piruvato y acetaldehído. Mediante la ruta *orto*, el catecol es transformado por la catecol 1,2-oxigenasa, la enzima lactonizante *cis,cis*-muconato, la isomerasa

muconolactona y la hidrolasa enol lactona β -ceto adipato a ácido β -ceto adipico. La activación de este intermediario conduce a la ruptura por una tiolasa y a la formación de succinato y acetato activados, dos metabolitos del ciclo del ácido cítrico.

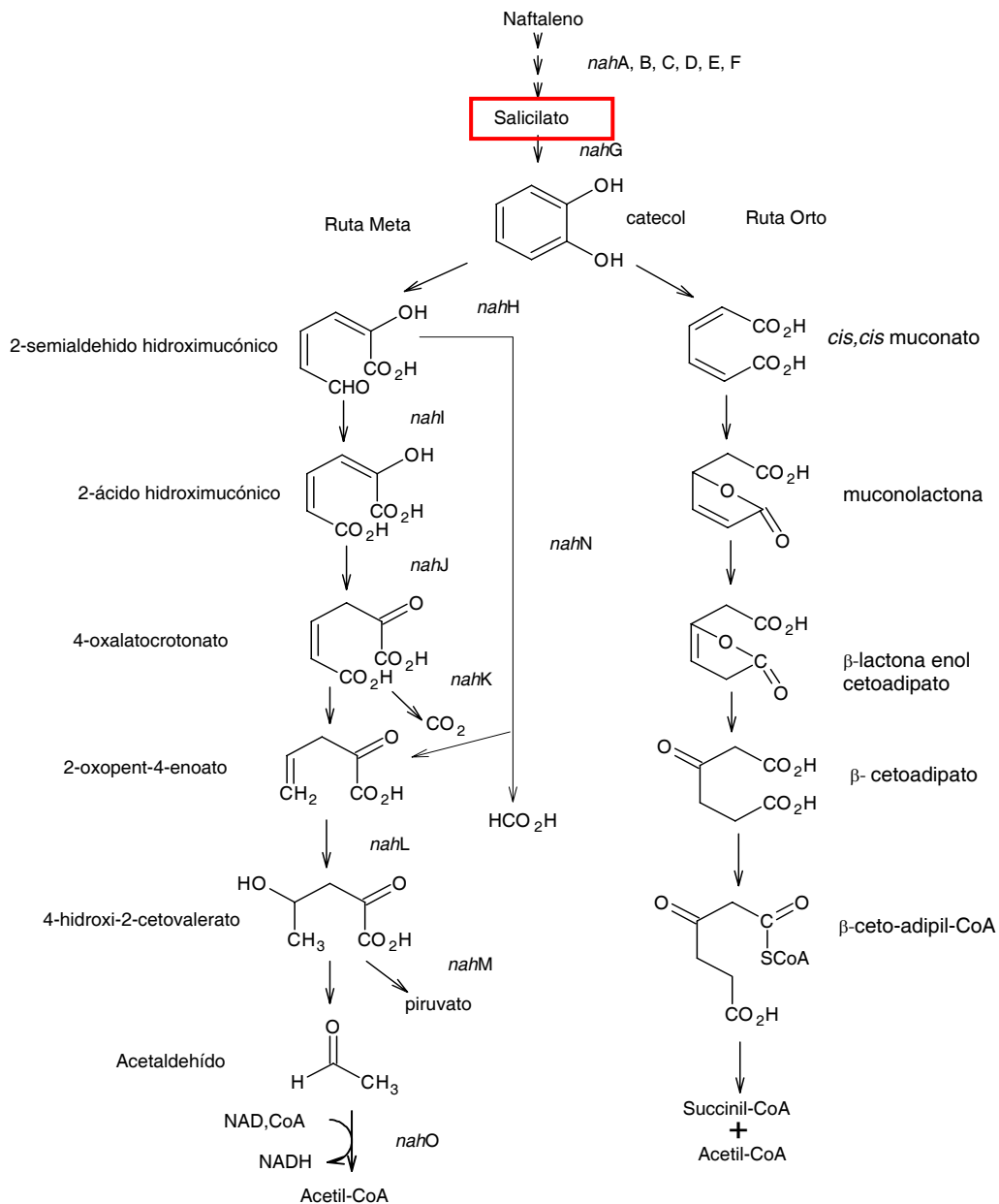


Figura I.7 Ruta de degradación de naftaleno (Grimm y Harwood, 1997)

La quimiotaxis frente a naftaleno ha sido estudiada ampliamente. Diversos autores estudiaron que *P. putida* G7, *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 y *P. putida* RKJ1 son quimiotácticamente atraídas a naftaleno (Grimm y Harwood, 1997; Samanta y Jain, 2000). Un estudio reveló que la respuesta quimiotáctica de *P. putida* G7 y *Pseudomonas* sp. estirpe NCIB 9816-4 está codificada por los plásmidos catabólicos NAH7 y DTG1 en las estirpes G7 y NCIB 9816-4, respectivamente, y que la quimiotaxis de estas bacterias están inducidas durante su crecimiento con naftaleno (y en el caso de *P. putida* G7, con salicilato) (Grimm y Harwood, 1997). El quimiorreceptor de naftaleno, NahY, que es una MCP (proteína aceptora de metilos), ha sido caracterizada en *P. putida* G7 (Grimm y Harwood, 1999). NahY está codificado aguas abajo de los genes catabólicos de naftaleno en el plásmido NAH7 y es cotranscrito junto con los genes de degradación, como se mostró en los análisis de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de transcripción inversa (Grimm y Harwood, 1999). Para restaurar la quimiotaxis de *P. putida* G7.C1, un derivado curado-NAH7 de la estirpe G7 (Grimm y Harwood, 1999), es necesaria la presencia del receptor NahY junto con los genes de degradación. Aunque existe alguna información sobre el papel de los genes catabólicos y el receptor asociado, los mecanismos moleculares precisos que explican la respuesta quimiotáctica tienen que ser todavía aclarados.

Otros autores evaluaron el papel de la quimiotaxis en la degradación de naftaleno por *P. putida* G7 en un sistema acuoso heterogéneo (Marx y Aitken, 2000b). La degradación de naftaleno por la estirpe salvaje se comparó con la de una estirpe no móvil y una estirpe mutante deficiente en quimiotaxis frente a naftaleno. Las tasas de degradación de naftaleno de estas tres estirpes fueron similares en un sistema homogéneo. Diversos estudios llevados a cabo en un sistema acuoso con gradientes de concentración de naftaleno mostraron que la estirpe salvaje *P. putida* G7 es capaz de degradar naftaleno a mucha más velocidad comparado con las otras dos mutantes, indicando que la quimiotaxis puede aumentar la biodegradación. Han sido desarrollados también diferentes modelos matemáticos para cuantificar quimiotaxis frente a naftaleno (Marx y Aitken, 2000a; Marx y Aitken, 1999; Zaval'skii et al., 2003a) y su influencia en la degradación de naftaleno (Marx y Aitken, 1999; Pedit et al., 2002). Estos modelos predicen con exactitud la concentración de sustrato y bacteria en diversos puntos de un gradiente y puede ser utilizado como prototipo para modelos más sofisticados que se necesitarían para predecir el comportamiento bacteriano en el campo. Se estudió que para alcanzar tasas de degradación de naftaleno similares la concentración celular de una estirpe no quimiotáctica debería de ser varios órdenes de magnitud mayor que para una estirpe quimiotáctica (Pedit et al., 2002).

FLUORENO

Se han aislado algunas bacterias capaces de utilizar fluoreno como única fuente de carbono y se han descrito tres rutas degradativas importantes. Mientras que algunas estirpes inician la metabolización de fluoreno con una dioxigenación que conduce a la formación de salicilato, la estirpe *Sphingomonas* sp. LB126 inicia la ruptura de la molécula mediante una monooxigenación en el carbono número 9. Esta ruta sólo es

productiva si ocurre una dioxigenación angular del carbono posteriormente (figura I.8) formándose el ácido ftálico, que es metabolizado a ácido protocatéquico (PCA). Finalmente, la degradación del ácido protocatéquico tiene lugar mediante una dioxigenación en las posiciones 4 y 5.

Hasta el día de hoy no se tiene conocimiento sobre estudios previos de quimiotaxis frente al hidrocarburo aromático policíclico fluoreno.

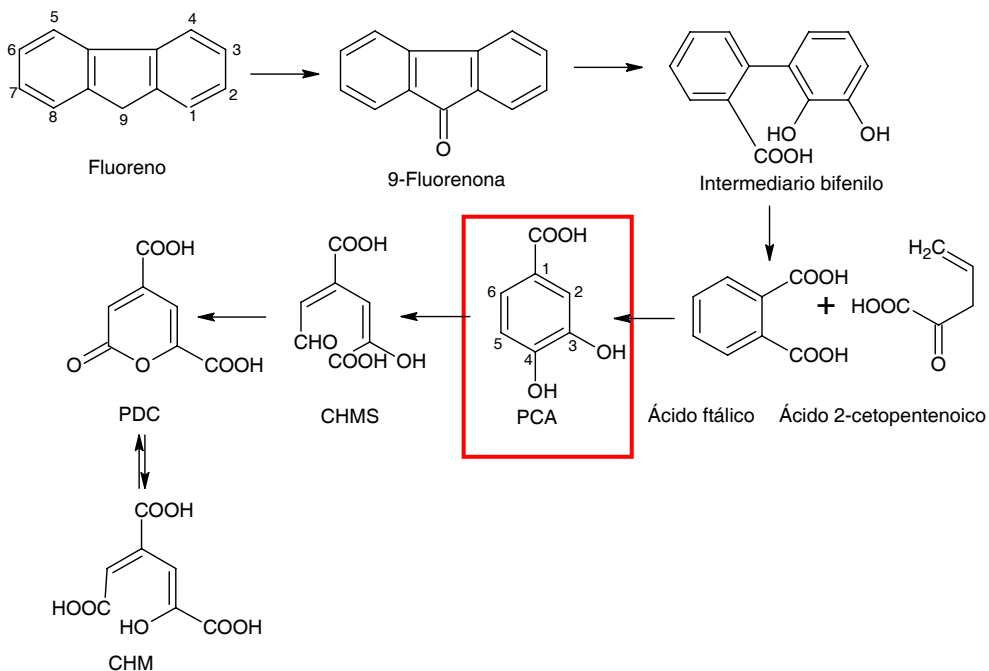


Figura I.8 Ruta de degradación de fluoreno utilizada por *Sphingomonas* sp. LB126. PDC: 2-pirona-4,6-ácido dicarboxílico, CHMS: 4-carboxi-2-hidroxi-6-semialdehído, CHM: 4-carboxi-2-ácido hidroximucónico (Wattiau et al., 2001)

FENANTRENO

El fenantreno es metabolizado mediante una doble hidroxilación del anillo por una enzima dioxigenasa a *cis*-3,4-dihidroxi-3,4-dihidrofenantreno, éste sufre una dehidrogenación enzimática formándose 3,4-dihidroxfenantreno (figura I.9). El diol se rompe y a continuación es metabolizado a ácido 1-hidroxi-2-naftoico, tras una decarboxilación oxidativa se forma 1,2-dihidroxi-naftaleno, que será posteriormente mineralizado siguiendo la misma ruta de degradación que naftaleno.

Se ha encontrado un único trabajo de quimiotaxis a fenantreno hasta la fecha. En este estudio, se observó quimiotaxis de la estirpe *P. putida* 10D a fenantreno, mediante dos técnicas distintas, ensayo densitométrico y capilar (Ortega-Calvo et al., 2003).

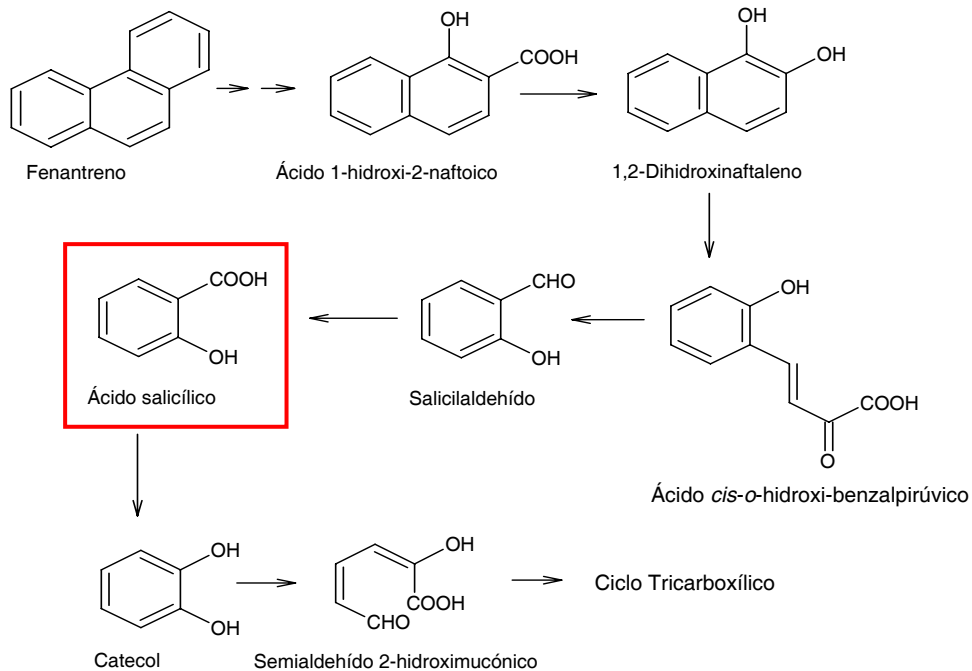


Figura I.9 Ruta de degradación de fenantreno (Prabhu y Phale, 2003)

I.3.4 PAPEL ECOLÓGICO DE LA QUIMIOTAXIS: BIORREMEDIACIÓN

Los posibles efectos beneficiosos de la quimiotaxis en la remediación de suelos o aguas subterráneas radican *a priori* en la mayor eficiencia que causa este proceso sobre el movimiento bacteriano a través de medios porosos, usualmente restringido por poros de diámetro pequeños, finales muertos, aumento de las longitudes de los caminos (tortuosidad), superficies para la adhesión bacteriana, etc. Varios investigadores han estudiado el movimiento bacteriano en medios porosos experimentalmente y mediante modelización matemática (Barton y Ford, 1995; Barton y Ford, 1997; Dillon et al., 1995; Duffy et al., 1997; Sen et al., 2005). El transporte bacteriano en columnas de arena hacia quimioatrayentes fue modelizado con éxito (Duffy et al., 1997), calculando los tiempos de residencia de las bacterias en las proximidades de los quimioatrayentes. Recientemente, la observación directa de la quimiotaxis en medios porosos a alta resolución confirmó su existencia y, además, reveló el aumento de la quimiotaxis provocado por el consumo del quimioatrayente que da lugar a un aumento acusado del gradiente de la sustancia química (Olson et

al., 2004). Se ha comprobado que los coeficientes de sensibilidad quimiotácticos, parámetro de migración celular que caracteriza las respuestas de movimiento quimiosensoriales intrínsecas de las bacterias, son útiles como medida de la eficiencias relativas de la quimiotaxis en agua y redes porosas (Marx y Aitken, 1999; Pedit et al., 2002).

Las matrices porosas, además de restringir el movimiento bacteriano, también pueden interferir en la formación del gradiente de quimioatrayente, lo cual evita que la estirpe quimiotáctica localice su substrato. Existen unos límites a la quimiodetección de gradientes basados en la solubilidad (Bialek y Setayeshgar, 2005) y, diversos autores atribuyeron la ausencia de quimiotaxis detectable a una concentración de gradiente insuficiente en columnas rellenas de arena (Barton y Ford, 1997). Un estudio sugirió que la baja solubilidad de fluoreno y antraceno pudo haber evitado que distintas estirpes de *Pseudomonas* respondiesen quimiotácticamente a estos compuestos (Grimm y Harwood, 1997). En cambio, otros autores mostraron quimiotaxis positiva a fenantreno y quimiotaxis negativa frente a antraceno y pireno, HAPs con una limitada solubilidad (Ortega-Calvo et al., 2003).

Por último, algunos autores simularon matemáticamente la influencia de la quimiotaxis en la biodegradación en columnas de suelo (Bosma et al., 1988). Otros estudios propusieron que en biorremediación la movilidad era necesaria para una distribución adecuada de organismos activos catabólicamente en relación con contaminantes medioambientales (Miller y Poindexter, 1993).

La fitorremediación o el uso de plantas y/o la rizosfera asociada para descontaminar zonas contaminadas, es considerada hoy en día una alternativa realista y de bajo coste para tratar zonas extensas de contaminación por compuestos orgánicos. Esta tecnología está basada en el potencial catabólico de los microorganismos asociados a las raíces, que son mantenidos por las sustancias orgánicas de las excreciones de las raíces y por un micro-ambiente favorable en la rizosfera.

Diversos autores estudiaron que la quimiotaxis puede tener un papel ecológico importante en las bacterias asociadas a las plantas aumentando su eficiencia de colonización de raíces (Caetano-anollés et al., 1988). El movimiento quimiotáctico de rhizobia como respuesta a sustancias en exhudados huésped de las raíces podía jugar un papel importante en dirigir la bacteria desde la matriz del suelo a la región apropiada del desarrollo de la planta (Caetano-anollés et al., 1988). Estudios previos (Soby y Bergman, 1985) mostraron que la movilidad bacteriana y la quimiotaxis juegan un papel muy importante en la capacidad de *R. Meliloti* para moverse dentro de la matriz del suelo a niveles de humedad por debajo de la saturación. Se sabe que las raíces segregan nutrientes y quimioatrayentes para rhizobia (Currier y Strobel, 1981; Currier y Strobel, 1977; Currier y Strobel, 1976; Gaworzewska y Carlile, 1982; Gitte et al., 1978; Kush y Dadarwal, 1981).

Es bien conocido que los exhudados de las raíces de las plantas contienen un gran número de compuestos orgánicos, incluyendo todos los aminoácidos, sacáridos y ácidos orgánicos. La rizodeposición, que incluye la exhudación de productos solubles de las plantas y la renovación de las raíces debido a la renovación de las paredes y a

la muerte celular, supone el 7-27% de la masa total anual de las plantas (Shimp et al., 1993). La cantidad de carbono orgánico total liberado varía según las plantas, pero está estimado que generalmente suele ser entre 10 y 100 mg de C (g de material de las raíces)⁻¹ (Whipps y Lynch, 1985) e incluye muchas moléculas orgánicas que estimulan el crecimiento microbiano:

- Carbohidratos: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa, xilosa, oligosacáridos (Shimp et al., 1993; Whipps y Lynch, 1985).
- Aminoácidos: glicina, ácido glutámico, asparagina, serina, alanina, lisina, arginina, treonina, homoserina (Shimp et al., 1993; Whipps y Lynch, 1985).
- Aromáticos: fenoles, *l*-carvona, *p*-cimeno, limoneno, isopreno, salicilato, flavonas, xantonas, naftaquinonas (Heitkamp y Cerniglia, 1988; Meharg, 1994).
- Ácidos orgánicos: ácido propiónico, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido málico, ácido láctico, acetato, succinato, fumarato (Robinson y Bauer, 1993; Whipps y Lynch, 1985).
- Compuestos volátiles: etanol, metanol, formaldehído, acetona, acetaldehído, propionaldehído, metil sulfuro, propil sulfuro, alil sulfuro (Whipps y Lynch, 1985).
- Vitaminas: tiamina, biotina, niacina, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico (Whipps y Lynch, 1985).
- Enzimas: fosfatasa, dehidrogenasa, peroxidasa, dehalogenasa, nitroreductasa, lacasa, nitrilasa (Curl, 1986; Gilbert y Crowley, 1997; Whipps y Lynch, 1985).

Varios de estos ácidos aromáticos que se encuentran en los exudados de las raíces de las plantas son productos de ruptura de la lignina, un polímero estructural importante de las plantas.

Durante la fitorremediación de suelos contaminados con HAPs, la quimiotaxis positiva hacia HAPs y los exudados de las raíces de las plantas pueden jugar un papel estimulador en la biodegradación debido a la existencia de un nicho favorable para los microorganismos alrededor de las raíces de las plantas. De hecho, éstas pueden inducir la movilización de los HAPs en suelo, haciendo que se acumulen (de forma más biodisponible) en zonas próximas a las raíces, posiblemente por el efecto combinado del flujo de agua hacia las plantas y la pseudosolubilización de HAPs por compuestos orgánicos derivados de las plantas (Liste y Alexander, 2000). El transporte quimiotáctico inducido por exudados de raíces o los propios HAPs pueden aumentar las velocidades de disipación de contaminante por las poblaciones microbianas del suelo. Es imaginable, por tanto, que un posible camino para optimizar la fitorremediación de HAPs es el uso de determinadas plantas e inóculos microbianos con actividades quimiotácticas específicas (Ortega-Calvo et al., 2003).

Actualmente, se han encontrado otros usos de la quimiotaxis además de su papel ecológico. Un estudio reciente propuso el uso de la quimiotaxis para favorecer y

controlar el mezclado de una molécula trazadora de alto peso molecular. En ese trabajo se demostró que la fuerza y la dirección del mezclado podía ser ajustada externamente controlando el tipo y concentración de quimioefector (Kim y Breuer, 2007).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS



II.1 OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se centra en el efecto de la quimiotaxis bacteriana sobre el transporte bacteriano y sobre la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos. El principal objetivo de este trabajo de investigación es contribuir al conocimiento de la actividad quimiotáctica de diversas estirpes degradadoras de HAPs y determinar si esta actividad representa una ventaja durante la biorremediación en condiciones de baja biodisponibilidad.

Los objetivos específicos planteados en esta tesis han sido:

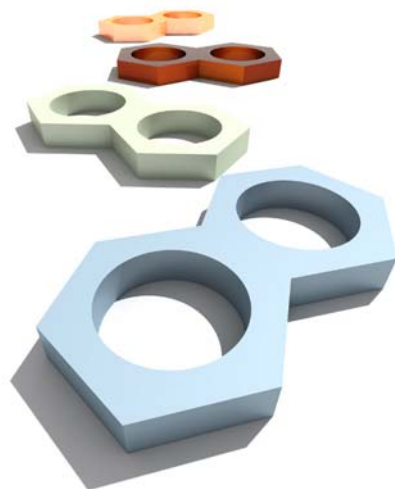
1. **Construcción de una colección de estirpes quimiotácticas frente a HAPs.** A través del trabajo bibliográfico se ha obtenido información para seleccionar distintas bacterias móviles y con capacidad degradadora, candidatas para evaluar su posible actividad quimiotáctica.
2. **Puesta a punto del método de ensayo de quimiotaxis.** La determinación de la actividad quimiotáctica es especialmente difícil como técnica experimental. Por ello se trató de desarrollar y optimizar la técnica consistente en el **ensayo capilar** de Adler. Esta optimización incluyó estudiar qué densidades ópticas eran las más adecuadas para que se apreciase mejor la quimiotaxis, tanto mediante conteo de viables a partir del volumen del capilar como en la visualización a través del microscopio. Una vez conseguido esto, se pasó a estudiar el manejo del capilar, qué tamaño de capilar era el más adecuado, y cual era la mejor forma de llevar a cabo el ensayo.
3. **Determinación de la respuesta quimiotáctica frente a contaminantes y ácidos orgánicos.** Se determinó en ensayos de quimiotaxis el índice quimiotáctico de cultivos de estirpes seleccionadas frente a diferentes HAPs. Los ensayos se realizaron mediante microscopía óptica con cámara CCD así como mediante conteo de viables. Se estudiaron como posibles quimioefectores tanto los HAP utilizados como fuente de carbono y energía, así como ácidos orgánicos. Se valoró además el efecto de la fuente de carbono de pre-cultivo y de tensioactivos sintéticos no tóxicos que aumentasen la biodisponibilidad.

4. **Transporte en sistemas en columna.** Mediante columnas empaquetadas con distintos constituyentes del suelo: arena, agregados de arcilla y suelo, conteniendo o no los contaminantes en forma adsorbida o disueltos en NAPLs (líquidos en fase no acuosa), se estudió cómo la movilidad y quimiotaxis afectaban al transporte bacteriano. De esta forma se pudo estudiar el efecto de los diferentes constituyentes del suelo de forma independiente en el transporte de nuestra estirpe estudiando también la influencia de ácidos orgánicos en la fisiología de la bacteria *Pseudomonas putida* G7, y consecuentemente el efecto de estos ácidos sobre el transporte a través de las diferentes matrices, relacionando los resultados con las características de las estirpes bacterianas, incluyendo, además de la respuesta quimiotáctica, la forma celular, carga, e hidrofobicidad.

5. **Evaluar el papel de la quimiotaxis en la biodegradación de naftaleno.** Se valoró la capacidad quimiotáctica de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 para acelerar el proceso de mineralización de naftaleno marcado con ^{14}C . Para originar situaciones de diferente biodisponibilidad se utilizó el naftaleno totalmente disuelto, en forma de cristales de tamaño definido, o en líquidos en fase no acuosa (NAPLs). Se utilizó y comparó esta estirpe silvestre con su mutante sin actividad quimiotáctica pero degradadora también de naftaleno. Se valoró además el efecto de los ácidos orgánicos sobre la cinética de biodegradación.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOLOGÍA



III.1 REACTIVOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos no marcados utilizados en este estudio han sido los siguientes: fenantreno (> 96%, HPLC), fluoreno (98%) y naftaleno (99+%), todos ellos de pureza analítica y obtenidos de la casa comercial Sigma Chemical Co.

El compuesto marcado con ^{14}C empleado en los ensayos de mineralización fue Naftaleno-UL- ^{14}C (actividad específica, 31.3 mC/mmol), de pureza radioquímica mayor del 98%, suministrado por Sigma Chemical Co (St Louis, MO).

Se utilizaron para este estudio también como fuentes solubles de carbono y quimioatrayentes: acetato sódico, ácido protocatéuico, cloruro sódico, fumarato sódico, glucosa, salicilato sódico, succinato sódico y triptona de Panreac Química SA.

Para los ensayos de transporte en columna se utilizó un tensioactivo no iónico del tipo polioxietileno (POE): Brij 35 ($\text{C}_{2}\text{E}_{10}$) suministrado por Sigma Chemical Co.

Los disolventes empleados en todos los análisis llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, acetona, hexano, acetonitrilo y diclorometano, fueron de calidad HPLC, suministrados por la casa comercial Teknokroma.

III.2 MATERIALES POROSOS

ARENA

Se utilizó arena de mar (lavada, grano fino ~0,25-0,30 mm) de Panreac Química SA, que se preparó mediante lavado por gravedad con agua destilada, para eliminar impurezas.

SUELO

Se utilizó un suelo forestal procedente del emplazamiento denominado "Hierro Viejo" situado en el "Monte de La Teja", Los Barrios (Monte Alcornocal del Campo de Gibraltar).

El suelo utilizado en este estudio fue clasificado por el grupo de evaluación de suelos dirigido por el Dr. Diego de la Rosa, perteneciente al Departamento de Sostenibilidad del sistema suelo-planta-atmósfera del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS, CSIC). La descripción del perfil del suelo se recoge en la tabla III.1.

Los suelos tierra parda forestal están caracterizados por su textura arenosa por disgregación de la roca madre areniscosa, lo que les confiere un carácter ácido y cierta soltura y permeabilidad. Este suelo se seleccionó por su textura arenosa y relativamente alto contenido en materia orgánica (tabla III.1).

La muestra se tomó en la capa superficial (0-25 cm, capa arable). Las muestras se recogieron en botes de vidrio. El suelo húmedo se homogeneizó y se tamizó (2 mm

de luz de malla). Tras este tratamiento, el suelo se conservó a -80°C en botes de vidrio sellados. Para su posterior utilización se secó en estufa a 70°C .

Los parámetros físico-químicos: pH, carbono orgánico, así como el análisis granulométrico del suelo se realizaron mediante métodos oficiales (Gee y Bauder, 1986; M.A.P.A., 1986). El análisis granulométrico se llevó a cabo en el servicio de análisis del IRNAS.

El pH del suelo se determinó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- pH (KCl): a 10 g de suelo seco y tamizado se le añaden 25 mL de una disolución 1 M de KCl en un tubo de centrifuga de 50 mL.
- pH (H_2O destilada): a 10 g de suelo seco y tamizado se le añaden 25 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga de 50 mL.

Se pusieron a agitar los tubos de centrifuga durante una hora, al cabo de ese tiempo se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 5000 rpm y en el sobrenadante se midió el pH. Esta determinación se hizo por duplicado tanto para las mediciones del pH del suelo en KCl como en agua.

El contenido en carbono orgánico se determinó mediante el método de Walkley Black, basado en la oxidación del carbono orgánico con una cantidad conocida de oxidante.

Tabla III.1 Perfil y propiedades del suelo estudiado

Clasificación FAO 90	Humic Nitisol
Clasificación USDA 87	Lithic Xerochrept
Clasificación local del suelo (serie)	Tierra Parda
Uso del terreno	Forestal
Topografía	Ondulada
Geomorfología	Montaña
Material Original	Arenisca
Drenaje	Moderadamente bueno
Inundación	Nula
Distribución tamaño de partícula (%)	
Arena grano grueso	61,9
Arena grano fino	21,4
Limo	11,2
Arcilla	5,5

Tabla III.1 Perfil y propiedades del suelo estudiado (continuación)

Humedad (%)	10,22
pH	3,8 (KCl)
	4,2 (H ₂ O)
Materia orgánica (%)	6,1
Carbono orgánico (%)	3,5
Capacidad de campo (mL/g)	0,60

AGREGADOS DE ARCILLA Y PVA SOBRE VIDRIO

- Preparación de la arcilla

En este trabajo se ha utilizado la montmorillonita sódica de Crook County, SWy-2 (Source Clay Minerals Repository, University of Missouri-Columbia, MO, EE.UU.). Para purificar la arcilla se siguieron los siguientes pasos:

1. Se resuspendió una cantidad determinada de arcilla en agua destilada, se homogeneizó y se dejó precipitar durante 14 horas. Transcurrido ese tiempo se recogió el sobrenadante.
2. Se añadió CaCl₂ al sobrenadante recuperado (0,1M). La arcilla precipitó, eliminándose el CaCl₂.
3. Se centrifugó el precipitado 10 minutos a 8000 rpm y se resuspendió en tampón (136 g CH₃COONa·3H₂O por 1L de H₂O). Se ajustó el pH a 5 con ácido acético y se dejó una noche.
4. Se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm y se resuspendió en CaCl₂ 1M.
5. Se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm y se resuspendió en un mínimo de agua destilada.
6. Se calentó en la placa calefactora, cuando se alcanzaron 60-70°C, se añadieron 5 mL de H₂O₂ al 30%. Se siguió añadiendo H₂O₂ hasta que dejaron de salir burbujas al añadirlo.
7. Se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm.
8. Se resuspendió en CaCl₂ 1M, y se dejó agitar durante 1 hora. Se repitió la operación 3 veces y la 4ª vez se resuspendió en agua destilada.
9. La arcilla tratada se introdujo en tripas de diálisis dentro de un vaso de precipitados con agua milliQ. Se cambió el agua cada día, hasta que no se detectaron cloruros en solución mediante determinación de turbidez con AgNO₃.

- Fabricación de los agregados

La arcilla se inmovilizó sobre bolas de vidrio usando PVA (alcohol polivinílico) como agente agregante. Para ello, las bolas de vidrio (diámetro 212-300 μm , Sigma Chemical Co.) se limpiaron con mezcla crómica, se lavaron con KCl 100 mM, a continuación con agua destilada y se dejaron secar en estufa. Los agregados se prepararon de la siguiente forma: Se añadieron 100 g de bolas de vidrio a una suspensión de 0,5 g de PVA en 200 mL de agua destilada. La mezcla se agitó y se mantuvo a 40°C durante aproximadamente 15 minutos. A continuación se añadió una suspensión de 10 g de montmorillonita en 50 mL de agua destilada, se dejó agitando unos 5 minutos más, y la mayoría del agua de la mezcla se eliminó mediante rotavapor. La mezcla se transfirió a un vaso de precipitados y se calentó en la placa calefactora hasta la eliminación completa del agua bajo agitación continua. Se secó en estufa a 60°C y se tamizó a través de un tamiz de 500 μm . El exceso de arcilla y PVA se eliminó con sucesivos lavados suaves con agua destilada. Finalmente, se secaron las muestras en una estufa a 60°C (Ortega-Calvo et al., 1999).

III.3 LÍQUIDOS EN FASE NO ACUOSA (NAPLs)

En este trabajo de investigación se utilizaron dos líquidos en fase no acuosa:

- 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano (HMN), que se obtuvo de Sigma Chemical Co.
- Fuel pesado, RMG 35 (ISO 8217), obtenido de la Oficina técnica de Vertidos Marinos Accidentales, Universidad de Vigo. Tiene una densidad a 15°C de 0,9810 kg/l. Fue analizado por el grupo dirigido por la Doctora Magdalena Grifoll (Universidad de Barcelona) mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas en modalidad de ión único (CG-EM SIM). Su composición en $\mu\text{g/g}$ fue la siguiente: naftaleno, 35,6; acenaftileno, 6,7; acenafteno, 38,0; fluoreno, 37,6; fenantreno, 196,0; antraceno, 25,6; fluoranteno, 8,1; pireno, 31,2; B(a)antraceno, 15,8; Criseno, 34,9; B(b)fluoranteno, 4,3; B(k)fluoranteno, 0,4; B(e)pireno, 10,8; B(a)pireno, 6,9; Perileno, 2,3; Indeno(1,2,3)c,d pireno, 2,5; Dib(a,h)antraceno, 4,4 y B(g,h,i)perileno, 6,2.

III.4 BACTERIAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las bacterias utilizadas en este estudio proceden de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), y son capaces de crecer con dichos compuestos individuales como única fuente de carbono y energía. Estas bacterias pertenecen al género *Pseudomonas* (*Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100)), ambas bacterias cedidas por Caroline S. Harwood de la Universidad de Iowa (EE.UU.), capaces de degradar naftaleno y *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ degradadora de naftaleno y fenantreno) y *Sphingomonas*

(*Sphingomonas* sp. LB126 degradadora de fluoreno), disponibles, éstas dos últimas, en nuestro laboratorio.

La bacteria *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100), estirpe mutante en quimiotaxis de *Pseudomonas putida* G7 (Stanier et al., 1966), se obtuvo mediante eliminación del plásmido catabólico NAH7 de *P. putida* G7 subclonando, a continuación, un fragmento EcoRI de 25-kb desde el plásmido NAH7 de 83-kb al vector pLAFR1, generando pHG100. Se llevó a cabo una transferencia conjugativa de pHG100 a *P. putida* G7.C1 resultando en la generación de una estirpe móvil, no quimiotáctica y que crecía con naftaleno como única fuente de carbono y energía, probablemente usando cromosómicamente genes que codifican la ruta *orto* de degradación de catecol, generado como un intermediario en la degradación de naftaleno (Grimm y Harwood, 1997).

Se utilizaron tres diferentes medios para cultivar las estirpes (tabla III.2):

1. Medio de mineralización (MM), utilizado para las estirpes *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100).
2. Medio Suiza (SW), utilizado para la estirpe *Sphingomonas* sp. LB126.
3. Medio SWF, utilizado para la estirpe *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ.

Las bacterias se mantuvieron en el medio de sales minerales correspondiente, en continua agitación (150 rpm) a 30°C y conteniendo 0.2 % del HAP en el caso de la estirpe *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ, 5 mM de salicilato sódico en el caso de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) y 400 mg/L de ácido protocatéquico en el caso de la estirpe *Sphingomonas* sp. LB126 como únicas fuentes de carbono. El HAP se esterilizó mediante lavado con diclorometano mientras que las fuentes de carbono solubles se esterilizaron en autoclave junto con el medio de cultivo.

Para la preparación de los inóculos de las bacterias se utilizaron procedimientos ligeramente diferentes:

Pseudomonas aeruginosa 19SJ: El cultivo, en fase de crecimiento exponencial, se pasó a través de un filtro de placa porosa de 40 µm de tamaño de poro, para eliminar los cristales de HAP. El cultivo se lavó tres veces con un medio tamponado, tampón fosfato (tabla III.2), centrifugando durante 10 minutos a 8000 rpm. Tras el lavado, el pellet se resuspendió en un volumen conocido del tampón fosfato fresco y estéril. Las células viables se cuantificaron en cada experimento como unidades formadoras de colonias (CFU) después de sucesivas diluciones del pellet con el tampón fosfato y siembra en placas de TSA (Tryptone Soy Agar, Cultimed, Panreac Quimica SA). Esta estirpe forma en medio TSA colonias ligeramente amarillentas y estrelladas.

Pseudomonas putida G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100): El cultivo, en fases iniciales del crecimiento estacionario, se centrifugó una vez durante 10 minutos a 2570 rpm (1000 g). Esta baja velocidad de centrifugación se eligió para evitar la rotura de los flagelos (y por tanto, la pérdida de movilidad) durante el proceso (Zaval'skii y Voloshin, 2003b). El pellet se resuspendió en un volumen conocido de medio de

mineralización. Las células viables se cuantificaron en cada experimento como CFU. Esta estirpe forma en medio TSA colonias blanquecinas de aspecto mucoso y de forma esférica.

Sphingomonas sp. LB126: El cultivo, en su fase inicial de crecimiento estacionario se lavó dos veces con tampón fosfato centrifugando durante 10 minutos a 8000 rpm. Tras el lavado, el pellet se resuspendió en un volumen conocido de tampón fosfato. Las células viables se cuantificaron en cada experimento como CFU. Esta estirpe forma en medio TSA colonias pequeñas amarillas y esféricas.

Tabla III.2 Composición por litro de los medios de cultivo líquidos y tampón usados en esta Tesis Doctoral. Los reactivos señalados en verde deben de autoclavarse separados de los señalados en rojo, y mezclarse una vez enfriados. Los reactivos señalados en azul se filtran a través de filtro Millipore de diámetro de poro 0.2 μm

	Medio Suiza	Medio de Mineralización	Medio SWF	Medio MSB	Tampón Fosfato
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,52 g	-	2,27 g	670 mg	-
KH ₂ PO ₄	0,2 g	900 mg	700 mg	340 mg	0,2 g
K ₂ HPO ₄	-	100 mg	-	-	0,8 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 g	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,05 g	-	-	-	-
CaCl ₂	-	80 mg	75 mg	14 mg	-
NH ₄ Cl	-	-	-	500 mg	-
NH ₄ NO ₃	-	100 mg	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	100 mg	400 mg	112 mg	-
NaNO ₃	-	-	2 g	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	1 mg	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 μg	-	-	5 mg	-
ZnCl ₂	5 μg	-	-	-	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30 μg	-	-	-	-
H ₃ BO ₃	5,5 μg	-	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	19,5 μg	-	-	-	-
NiCl ₂ ·6H ₂ O	2,3 μg	-	-	-	-
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	-	2 μg	-	-	-
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1,7 μg	-	-	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	2 μg	-	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	2 μg	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10 μg	1,4 μg	-	2,5 mg	-
ZnSO ₄ ·H ₂ O	-	2 μg	-	-	-
CuSO ₄	2,5 μg	-	-	-	-
Na ₂ EDTA	2 mg	-	-	-	-
FeCl ₂	0,75 mg	-	-	-	-
LiCl	1,25 μg	-	-	-	-
SnCl ₂	1,25 μg	-	-	-	-
KBr	5 μg	-	-	-	-
KI	5 μg	-	-	-	-
BaCl ₂	1,25 μg	-	-	-	-
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	-	10 mg	-	0,22 mg	-
pH	7	5,7	7	7	7,29

III.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS

Para determinar la hidrofobicidad de la superficie celular, las células bacterianas se recogieron sobre filtros Micropore de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Los filtros se montaron sobre un dispositivo de vidrio y se secaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

La hidrofobicidad de la superficie celular se cuantificó en el laboratorio del Dr. Lukas Wick en el Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Leipzig, Alemania, mediante la medida del ángulo de contacto (q_w) entre la capa celular y una gota de agua. Las medidas se llevaron a cabo con un microscopio goniómetro (Krüss GmbH, Hamburg, Germany) (Wick et al., 2002) (figura III.1). Se midieron para cada bacteria los ángulos de contacto de al menos cinco gotas de 1 micro-litro. El potencial zeta, que puede utilizarse como estimación indirecta de la carga de la superficie celular, se calculó a partir de la movilidad electroforética usando un analizador electroforético doppler dispersor de luz (Zetamaster, Malvern Instruments, Malvern, UK) según el método de Helmholtz-Smoluchowski, también en el UFZ (Hiementz, 1986).

Las dimensiones de las estirpes bacterianas se estimaron mediante un microscopio óptico, Axioskop 2, Carl Zeiss, Jena, Germany con objetivos A-plan 10 x ($0.25 \infty/-$) y Plan-Neofluar 40 x ($0.75 \infty/0.17$) y oculares W-PL 10 x/23 Br. foc.; se tomaron imágenes de las bacterias con una cámara Rs Photometrics TV 2/3" 0.63 x a una resolución de 782 x 580 pixels usando un software versión Metamorph 4.2 y sobre estas imágenes, se midieron la longitud y anchura de las bacterias utilizando el software SPOT advanced.

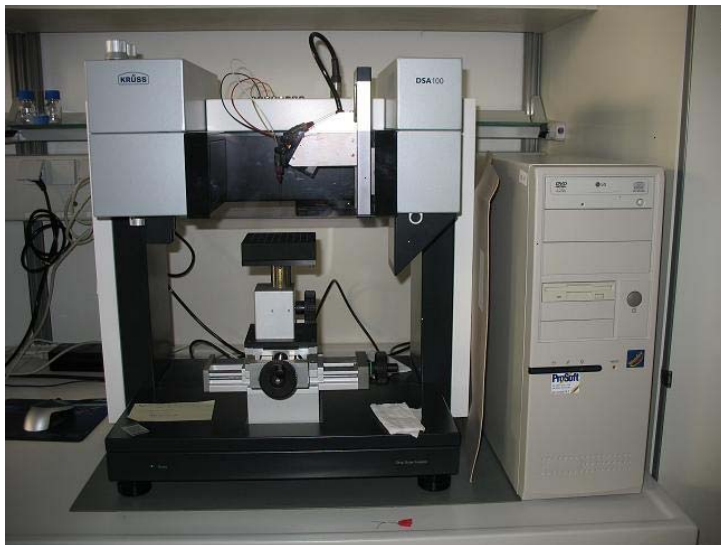


Figura III.1 Microscopio goniómetro

III.6 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y MOVILIDAD DE LAS ESTIRPES

III.6.1 *Pseudomonas putida* G7

Se realizó un estudio del crecimiento de la estirpe *Pseudomonas putida* G7 con distintos sustratos que pueden llegar a ser quimioatrayentes potenciales. Para ello se prepararon cultivos de 100 mL de medio de mineralización con los siguientes sustratos:

- Acetato (5 mM)
- Fumarato (5 mM)
- Salicilato (5 mM)
- Succinato (10 mM)
- Glucosa (10 mM)

A distintos tiempos, se midió la densidad óptica a 600 nm y se comprobó la movilidad mediante observación al microscopio, asignando distintos valores según el porcentaje aproximado de células móviles, de la siguiente forma:

- 0: movilidad nula
- 1: movilidad baja. Muy pocas bacterias móviles (menos del 10%)
- 2: movilidad baja. Muy pocas bacterias móviles, pero con gran movilidad (menos del 10%)
- 3: movilidad media. La mitad de las bacterias móviles y las que lo son, son muy móviles
- 4: muy móvil. Muchas bacterias móviles (más del 50%)
- 5: máxima movilidad tanto en número de bacterias móviles como en la calidad de movimiento

III.6.2 *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100)

Para el estudio de crecimiento y movilidad, esta estirpe se cultivó en medio de mineralización suplementado con salicilato sódico a una concentración de 5 mM.

III.6.3 *Sphingomonas* sp. LB126

Esta estirpe se cultivó en medio suíza suplementado con ácido protocatéquico a una concentración de 400 mg/L. Estos cultivos deben permanecer en oscuridad puesto que el ácido protocatéquico es fotosensible.

III.6.4 *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ se cultivó en medio SWF suplementado con fenantreno a una concentración del 0,2%. A diferencia de las demás estirpes, cada muestra tomada de este cultivo se filtró a través de lana de vidrio para eliminar los cristales de fenantreno, evitando así lecturas erróneas de la densidad óptica.

Se calculó para cada estirpe la tasa de crecimiento, μ . Ésta se define generalmente como la relación entre el logaritmo neperiano de 2, y el tiempo de duplicación del cultivo, t_d (Slater, 1988):

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0,693}{t_d}$$

III.7 CÁLCULO DE LA CMC DE LOS TENSOACTIVOS

El valor de la concentración crítica micelar (CMC) del tensioactivo empleado (Brij 35) se determinó a través de medidas de la tensión superficial de soluciones acuosas utilizando un tensiómetro de anillo de platino (TD1 Lauda, Hucoa-Erlöss) (Laha y Luthy, 1992). Las soluciones de tensioactivo se prepararon en MM por ser éste el medio que posteriormente se empleó en los ensayos de quimiotaxis y de transporte en columna.

Las medidas de tensión superficial se realizaron por duplicado en cubetas de vidrio de 20 mL, en un rango de concentraciones que abarcó desde 0 mg/mL (medida del MM) hasta 0,5 mg/mL. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$). Tras cada medida de tensión superficial, el anillo de platino se limpió llevándolo a la llama hasta ponerlo al rojo, eliminándose así los posibles restos de tensioactivo que pudieran interferir en las siguientes medidas. El valor de CMC se calculó como el punto de inflexión de la curva obtenida al representar la tensión superficial (dyn/cm) de las soluciones acuosas de cada una de las concentraciones ensayadas frente al logaritmo de la concentración de tensioactivo ($\mu\text{g/mL}$) (Edwards et al., 1991).

III.8 EXPERIMENTOS DE QUIMIOTAXIS

III.8.1 ENSAYO CAPILAR

Este método se puso a punto utilizando distintos tamaños de capilar, modificando el método original (Adler, 1973). Se empezó probando con distintos materiales (jeringas de plástico, capilares de distinta capacidad, etc.). Finalmente, se optimizó el método con capilares de 1 μL (Drummond "microcaps"). La suspensión de células móviles se colocó en una pequeña cámara formada por dos capilares de 1 μL colocados en paralelo sobre un portaobjetos (76 x 26 mm). Tras ser cerrado con llama en uno de sus extremos y flameado, otro capilar de 1 μL se llenó con el atrayente o disolución

control y se colocó sobre la suspensión bacteriana. La cámara se cerró con un cubreobjetos (24 x 24 mm) (figura III.2).

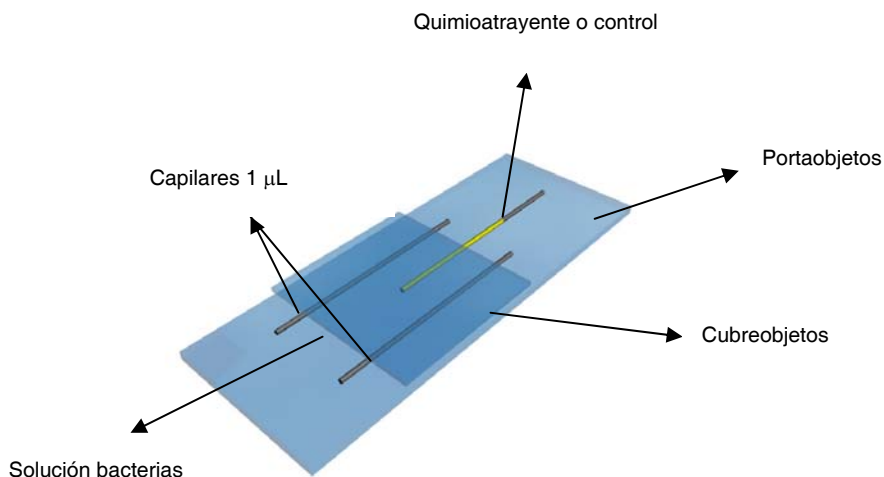


Figura III.2 Cámara de quimiotaxis

III.8.1.1 Ensayo cualitativo

Para realizar los ensayos de microscopía se utilizó un microscopio óptico cuyas características se han descrito previamente. Para poder ver la respuesta quimiotáctica a través del microscopio óptico, la densidad óptica óptima a 600 nm era aproximadamente 0,4. Una vez preparada la cámara de quimiotaxis, la respuesta quimiotáctica se detectó mediante la acumulación inicial de una nube de células móviles alrededor de la boca del capilar.

En este caso, el ensayo de microscopía óptica se llevó a cabo con las estirpes *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ y *Pseudomonas putida* G7. El atrayente en el primer caso fue triptona al 0,1% en tampón fosfato; en los ensayos realizados con *Pseudomonas putida* G7 se utilizó como atrayente naftaleno, en forma de una disolución saturada disolviendo 0.1 g en 10 mL de medio de mineralización. También se utilizaron para los ensayos cristales de naftaleno, así como soluciones en HMN (1 mg/mL), y fuel pesado de origen marino.

III.8.1.2 Ensayo cuantitativo

Tras ensayos preliminares se determinó que la densidad óptica óptima a 600 nm de la suspensión bacteriana para este tipo de ensayo era del orden de 0,02 para todas las estirpes.

Los capilares se cerraron por un extremo con llama y se flamearon, y a continuación se introdujeron dos, tres o cuatro capilares (según se hizo el ensayo por duplicado, triplicado o cuadruplicado) en la disolución de atrayente y otros tantos en la solución

control que carecía de atrayente (medio en el que se resuspendió el pellet). Se dejaron los capilares inmersos en las soluciones 15-20 minutos. A continuación, y lavando previamente con la solución control, los capilares se pasaron a la cámara de quimiotaxis (figura III.2), y se mantuvieron en la cámara dos horas a temperatura ambiente. Se estimó que éste era el tiempo adecuado de incubación en base a observaciones previas al microscopio.

Finalmente se retiraron los capilares, se lavaron y se rompieron sobre un tubo Eppendorf. Tras lavar el contenido del capilar dos veces, se hicieron diluciones y se sembraron en placas de TSA. Después de 24 h de incubación a 30°C, se contaron las colonias y se halló el índice quimiotáctico (IQ).

$$IQ = \frac{\text{Colonias en capilares con quimioatrayente}}{\text{Colonias en capilares con control}}$$

Si este índice quimiotáctico es mayor de uno, se considera que existe una respuesta quimiotáctica positiva. Los resultados se dieron como las medias de los replicados de los capilares. Se utilizó el test *t* de student para analizar estadísticamente las diferencias entre las medias.

Pseudomonas putida G7:

Los ensayos capilares se llevaron a cabo con cultivos crecidos en medio de mineralización suplementado con salicilato sódico a una concentración de 5 mM. La elección de este compuesto se basó en que es un intermediario en la ruta de degradación del naftaleno (figura I.7), y también induce la quimiotaxis bacteriana frente a naftaleno (Grimm y Harwood, 1997). Para resuspender el pellet tras la centrifugación se utilizó medio de mineralización. Como quimioatrayentes se utilizaron dos tipos de soluciones:

- Una disolución saturada de naftaleno preparada de la siguiente forma: se añadió 0,1 g de naftaleno a 10 mL de medio de mineralización, y se mantuvo en un agitador de rotación durante 24 horas. Posteriormente, se filtró a través de una pipeta pasteur rellena de lana de vidrio para eliminar los cristales de naftaleno.
- Disoluciones de los compuestos hidrosolubles acetato, fumarato, salicilato, succinato y NaCl a una concentración de 100 mM.

En una serie de ensayos capilares se utilizó como quimioatrayente una disolución saturada de naftaleno, pero resuspendiendo el pellet, obtenido tras centrifugación, en una disolución de Brij 35 en medio de mineralización. Se utilizó una concentración de Brij 35 tres veces por encima de su concentración crítica micelar (CMC). Para ello se disolvieron 0,25 g de Brij 35 en 100 mL de medio de mineralización.

***Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100):**

El ensayo capilar se llevó a cabo con cultivos crecidos en medio de mineralización suplementado con salicilato sódico 5 mM. Para resuspender el pellet tras la centrifugación se utilizó medio de mineralización. Como quimioatrayente se utilizó una disolución saturada de naftaleno preparada como se explicó anteriormente.

***Sphingomonas* sp. LB126:**

El ensayo capilar se llevó a cabo con cultivos crecidos en medio suiza suplementado con ácido protocatéuico (400 mg/L). Éste es una fuente rica de carbono y su elección se basó en que es un intermediario de la ruta de degradación de fluoreno (figura I.8). Para resuspender el pellet tras la centrifugación se utilizó tampón fosfato. Como quimioatrayente se utilizó una disolución saturada de fluoreno, preparada de forma análoga a la de naftaleno.

***Pseudomonas aeruginosa* 19SJ:**

Los ensayos capilares se llevaron a cabo con cultivos crecidos en medio SWF suplementado con fenantreno a una concentración de 0,2%. Para resuspender el pellet tras la centrifugación se utilizó tampón fosfato. Como quimioatrayentes se utilizaron una disolución de triptona al 0,1%, disolviendo 0,02 g de triptona en 20 mL de tampón fosfato, y una disolución saturada de fenantreno preparada de igual forma que para naftaleno.

III.8.2 ENSAYO QUIMIOTÁCTICO EN MATRACES BIOMÉTRICOS

Estos ensayos quimiotácticos se llevaron a cabo por duplicado siguiendo el método del área interfacial constante de Efrogmson y Alexander (Efrogmson y Alexander, 1994) en matraces biométricos (Bellco glass) de 250 mL, en los cuales se introdujo un cilindro de vidrio (2 cm de diámetro, 10 cm de altura) abierto por ambos extremos que contenía el NAPL, 2,2,4,4,6,8,8 heptametilnonano (HMN). El cilindro tenía en su base cuatro ranuras (6 mm de alto, 2 mm de ancho) para permitir intercambio de solución acuosa entre el interior y el exterior del mismo (figura III.3) (García-Junco et al., 2001). En el matraz se añadieron 100 mL de medio de mineralización, y sobre la superficie de la fase acuosa en el interior del cilindro se añadió 1 mL de NAPL, que contenía disuelto 1 mg de naftaleno. Los matraces se cerraron con tapones envueltos en teflón y se incubaron a 25°C sobre un agitador orbital a 80 rpm. A las 48 horas, una vez que se alcanzó el equilibrio, se retiraron del agitador y se añadió a cada matraz 2 mL de suspensión bacteriana de *Pseudomonas putida* G7 (hasta conseguir en el matraz biométrico una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,022), preparada como se describe en la pag. 43.

Una vez añadido el inóculo, los matraces se mantuvieron en reposo, y cada 15 minutos se tomó una muestra de la fase acuosa en el exterior del cilindro, en la que se midió la densidad óptica a 600 nm y la concentración de naftaleno mediante HPLC.



Figura III.3 *Dispositivo para el estudio de la quimiotaxis frente a NAPLs en matraces biométricos*

III.9 ANÁLISIS DE HAPs POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Los análisis del contenido en naftaleno, fenantreno y fluoreno de los ensayos quimiotácticos en matraces biométricos y los ensayos de transporte en columna, se realizaron bajo distintas condiciones cromatográficas dependiendo del HAP.

Los análisis se llevaron a cabo con un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) (Waters 2690 Separations Module) equipado con detector UV-VIS (Waters 996 Photodiode Array Detector). La columna empleada en el análisis de HAPs era específica para este tipo de compuestos (Waters HAP Columns, C₁₈, 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 x 250 mm). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo de calidad HPLC y agua milli-Q. Ambas fases se filtraron previamente a su uso, utilizando para ello filtros de nylon de 45 micras de poro.

Para la puesta a punto de las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis de los HAP se utilizó un patrón que contenía 16 HAP (8270 Calibration Mix #5, 2000 μ g/ml de cada PAH, en diclorometano, RESTEK Corporation).

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes, dependiendo del HAP.

Naftaleno:

- Fase móvil: 45% Acetonitrilo de calidad HPLC y 55 % agua milli-Q
- Flujo: 1 ml / min
- Temperatura del horno: 30 °C

- Tiempo de análisis: 20 min
- Volumen de inyección: 20 μ l
- Longitud de onda de excitación: 270 nm
- Longitud de onda de emisión: 323 nm

Fluoreno y fenantreno:

- Flujo: 1 ml / min
- Temperatura del horno: 30 °C
- Tiempo de análisis: 50 min
- Volumen de inyección: 20 μ l
- Longitud de onda de excitación _{Fluoreno}: 248 nm
Longitud de onda de excitación _{Fenantreno}: 250 nm
- Longitud de onda de emisión _{Fluoreno}: 374 nm
Longitud de onda de emisión _{Fenantreno}: 385 nm
- Se utilizó un gradiente de fase móvil (Urbiet-Garagorri et al., 1999) (tabla III.3)

La recta de calibrado empleada en el análisis fue del orden de μ g/mL. El límite de detección (LD) para cada uno de los 3 HAPs analizados, definido como la menor cantidad de analito que puede ser detectada y diferenciada de un blanco, pero no necesariamente cuantificada con un nivel aceptable de exactitud y precisión, se calculó como tres veces la desviación estándar relativa de la ordenada en el origen de la recta de calibrado. De la misma forma, el límite de cuantificación (LC), definido como la cantidad o concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión, se calculó tomando diez veces la desviación estándar relativa de la ordenada en el origen de dicha recta. Estos valores se recogen en la tabla III.4.

Tabla III.3 *Gradiente utilizado en el análisis por cromatografía de fluoreno y fenantreno*

GRADIENTE DE LA FASE MOVIL		
TIEMPO (min)	% ACETONITRILO	% AGUA
0	45	55
5	45	55
25	95	5
31	100	0
38	100	0
43	45	55

Tabla III.4 Límites de detección y de cuantificación de los HAPs analizados por HPLC

HAPs	Límite detección ($\mu\text{g/mL}$)	Límite cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)
Naftaleno	0,14	0,47
Fluoreno	0,09	0,31
Fenantreno	0,09	0,29

III.10 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 et al. (Rijnaarts et al., 1993). Los materiales que se utilizaron (suelo, arena o agregados de arcilla inmovilizados sobre bolas de vidrio) se empaquetaron en húmedo en columnas de vidrio de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro interno. El medio de empaquetado fue medio de mineralización para las estirpes *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) y tampón fosfato para *Sphingomonas* sp. LB126 y *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. La cantidad de material empaquetado presente en cada columna fue del orden de 12 g. El HAP se introdujo en el material de empaquetamiento como una solución de acetona y se dejó evaporar bajo corriente de nitrógeno, dando una concentración final de 1,2 mg/12 g (100 mg/Kg) de material seco. Esta concentración es típica de los suelos contaminados por HAPs (Wilson y Jones, 1993). El material contaminado se introdujo en la parte superior de la columna como está reflejado en la figura III.4, por encima del mismo material, libre de HAP. En los ensayos con NAPL, se añadieron 0,25 mL de HMN, con 38 mg de naftaleno/mL o sin naftaleno disuelto.

Las columnas se conectaron a una bomba peristáltica (figura III.4), y las suspensiones bacterianas (Densidad óptica₆₀₀ \cong 0,300, 10^8 CFU/mL) se bombearon a través de las columnas a una velocidad de flujo constante e igual a 0,1 mL/min. Se utilizaron flujos de lecho vacío idénticos, lo que condujo a diferentes flujos hidráulicos en función de la porosidad del medio. Estos últimos fueron 0,37 cm/min para la arena, la cual tenía una porosidad (estimada gravimétricamente) de 0,42, correspondiendo a un volumen de poro (VP) de 2,677 mL, 0,38 cm/min para los agregados de arcilla (porosidad, 0,42; VP, 2,654 mL) y 0,30 cm/min para el suelo (porosidad, 0,52; VP, 3,309 mL). El flujo hidráulico se calculó a partir del volumen de poro, de la longitud de la columna y de la velocidad de flujo de 0,1 mL/min. 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 densidad óptica a 600 nm en el efluente a la salida de la columna (C) dividido por la densidad óptica en el influente en la columna (C_0). Todos los resultados se dan como la media de ensayos realizados por duplicado. Para los experimentos llevados a cabo con tiourea, se utilizó una concentración de tiourea 60 μM y su concentración tanto a la entrada de la columna como a la salida se midió fotométricamente a una longitud de onda de 235

nm. Los ensayos de transporte con los quimioefectores: acetato, fumarato, salicilato, NaCl, succinato y glucosa se llevaron a cabo con suspensiones bacterianas que contenían la concentración de quimioefector deseada. A pesar de la presencia de estos nutrientes a concentraciones suficientemente altas para que existiese crecimiento, se comprobó que no hubo proliferación bacteriana durante los experimentos (el valor de C_0 permaneció constante). Las soluciones de tensioactivo se prepararon inmediatamente antes de los experimentos. Ni el suelo ni los materiales del suelo se trataron con el tensioactivo antes del bombeo de las suspensiones bacterianas a través de las columnas.

En los ensayos con naftaleno, fluoreno y fenantreno se midió la concentración de HAP en el efluente mediante HPLC, antes y después del paso de la suspensión bacteriana a través de la columna, para determinar la existencia de estos quimioefectores en solución. Las medidas del HAP antes de bombear la bacteria se hicieron directamente en el efluente recogido. Las medidas del HAP después de bombear la bacteria se hicieron también en el efluente, con la salvedad de que se añadió a este efluente 10 μ L de formaldehído al 40% que actuó como biocida.

Al finalizar los ensayos se analizó el HAP residual en las columnas. Se transfirió la arena, agregados de arcilla o suelo, contenidos en el interior de las mismas a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca que contenía 100 mL de una mezcla 1:1 acetona/hexano. Posteriormente, se agitó (150 rpm) durante 24 horas para extraer completamente los HAPs de la matriz. La arena se separó de la mezcla acetona - hexano mediante decantación y los agregados de arcilla y el suelo mediante filtrado a través de papel de filtro sin cenizas de 150 mm de diámetro (Filter-Lab). A continuación, se llevó la mezcla a un matraz de corazón y se redujo el volumen en el rotavapor hasta aproximadamente unos 2 mL, cambiando la fase a acetonitrilo en el mismo rotavapor, por ser este solvente la fase móvil utilizada en el análisis de los HAPs por HPLC. El extracto se llevó a un volumen conocido de acetonitrilo y por último, como paso previo a su análisis, el extracto se filtró a través de un filtro de nylon (0,45 μ m y 13 mm de diámetro) para evitar la entrada de partículas de arena, agregados de arcilla o suelo en la columna del cromatógrafo.

La eficiencia de adhesión α_t se define generalmente como la relación entre la tasa de adhesión, η_t , y la tasa del transporte bacteriano hacia las superficies del material empaquetado, η_{trans} :

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

Su cálculo, por tanto, depende del conocimiento de la tasa de transporte. Para las columnas empaquetadas con esferas de tamaño uniforme, se propuso un método del cálculo del η_{trans} que tiene en cuenta la contribución de la convección, difusión, atracción de van der Waals, y la sedimentación (Martin et al., 1992). Para poder comparar los resultados obtenidos con las bacterias individuales y los materiales empaquetados en nuestros experimentos, se utilizó esta ecuación para calcular la eficiencia de adhesión α_t , aunque los materiales utilizados están muy lejos de ser esferas ideales. Para los cálculos se supuso que las esferas eran de tamaño idéntico (135 μ m de radio para arena y 355 μ m de radio para suelo y agregados de arcilla) en

sus empaquetamientos, y que el radio bacteriano efectivo era $R=0,5(wl)^{1/2}$, donde w y l representan el ancho y la longitud de las bacterias, respectivamente. El valor de η_t se calculó a partir de los valores de C/C_0 obtenidos en los experimentos de transporte (Jucker, 1998). Se puede encontrar una explicación detallada del método de cálculo usado en diversos estudios (Martin et al., 1992; Rajagopalan y Tien, 1976). Debido al aumento de las probabilidades de contacto con las superficies irregulares de las partículas empaquetadas utilizadas en este estudio, los valores de α_t pueden exceder de 1 y deben ser considerados como eficiencias de adhesión relativas. En algunos experimentos, los valores de α_t no alcanzaron un valor constante. Por esta razón, y para tener en cuenta la dinámica de bloqueo del filtro, se calcularon dos valores representativos de α_t : un primer valor, calculado en el punto del cambio de la pendiente en las curvas C/C_0 frente al volumen de poro (correspondiendo al final del frente bacteriano) y un segundo valor, correspondiendo al final del periodo experimental.

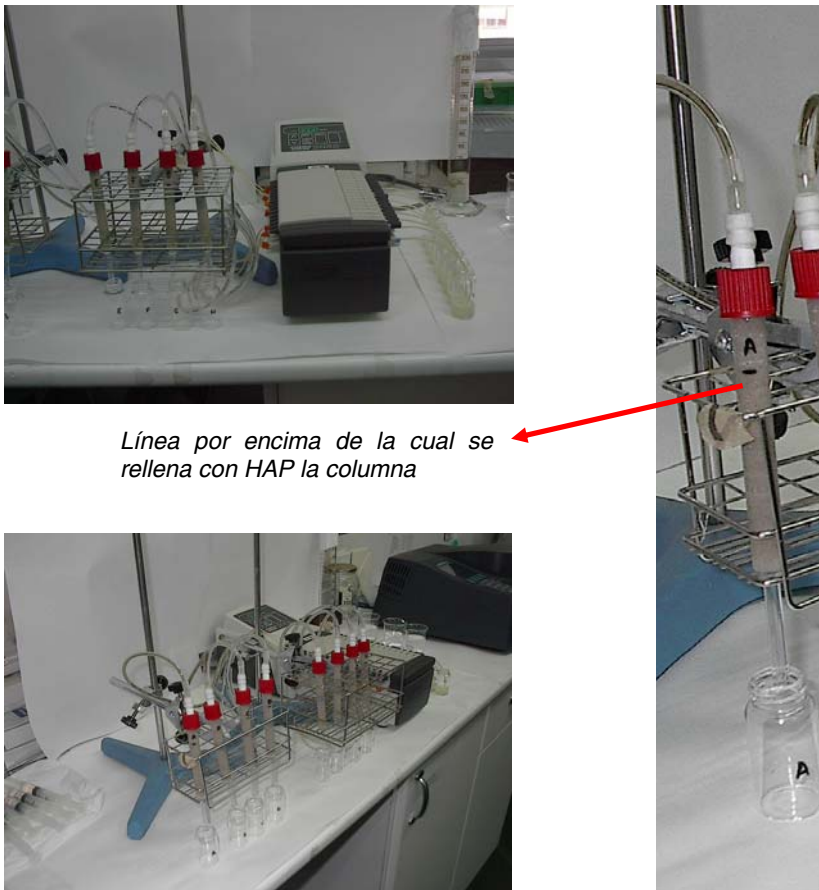


Figura III.4 Dispositivo para el estudio de transporte bacteriano en columnas

III.11 ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN

III.11.1 COMPARACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN DE NAFTALENO POR *Pseudomonas putida* G7 Y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100)

El estudio de la mineralización de naftaleno en arena y agregados de arcilla se realizó mediante ensayos por duplicado, para los diferentes tratamientos y para las dos estirpes, en matraces biométricos de 250 mL (figura III.5) para arena y fase acuosa y en matraces Erlenmeyer de 100 mL para los agregados de arcilla. El sustrato marcado (70000-90000 dpm) se añadió a cada matraz en 0,1 mL de acetona (para los ensayos con naftaleno sólido), de HMN o de fuel pesado. La acetona y el HMN tenían previamente naftaleno no marcado a una concentración de 1 mg/mL. La concentración de naftaleno en el fuel era de 0,04 mg/mL (sección III.3). Los ensayos con arena contenían 40 g del material más 12 mL de la suspensión bacteriana, mientras los que se hicieron con agregados de arcilla contenían 10 g del material y 4 mL de suspensión. Los controles sin material poroso contenían un volumen final de 32 mL (20 mL de MM más 12 mL de suspensión).

Los matraces se inocularon con suspensiones bacterianas de *Pseudomonas putida* G7 o *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) con una densidad óptica de 0,3 a 600 nm (10^8 CFU/mL). El inóculo se preparó siguiendo el protocolo expuesto en el apartado III.4.

El ensayo se realizó a temperatura ambiente manteniendo los matraces de arena y agregados de arcilla en estático y los de fase acuosa en agitación continua a 100 rpm. Se estimó la producción de $^{14}\text{CO}_2$ mediante medidas de la radioactividad presente en las trampas de sosa que contenían 1 mL de NaOH 0,5 M. Periódicamente, la solución alcalina se retiró de la trampa y se reemplazó por sosa nueva. La solución de NaOH se mezcló con 5 mL de líquido de centelleo y la mezcla se mantuvo en oscuridad durante al menos 8 h para la disipación de la quimioluminiscencia. La radioactividad se midió mediante contador de centelleo líquido modelo Beckman LS6500. Los resultados se dan como medias de las medidas de los tratamientos por duplicado.

III.11.2 MINERALIZACIÓN DE NAFTALENO EN LECHOS DE ARENA Y CON DISTINTOS QUIMIOEFECTORES

Para medir la mineralización de naftaleno en arena inoculada se prepararon ensayos por duplicado en matraces biométricos de 250 mL. Se añadieron entre 60000 y 80000 dpm de naftaleno-UL- ^{14}C . El sustrato marcado se añadió en 0,1 mL de solución acuosa (MM) en el centro de cada matraz (1,5 μg naftaleno/mL MM). Se añadieron a cada matraz 40 gramos de arena lavada y 12 mL de suspensión bacteriana (*Pseudomonas putida* G7) en medio de mineralización, suplementado, en su caso, con salicilato o succinato 10 mM. Este volumen se escogió para mantener condiciones de saturación análogas a los experimentos en columna. Los experimentos se realizaron con controles abióticos (sin inoculación) y con ausencia de arena. En este último caso el volumen de medio utilizado fue 20 mL. En los

controles abióticos se observó que, transcurridos 8 días del experimento, la cantidad de naftaleno recogida en la trampa de sosa por volatilización no superó el 1,5% del naftaleno inicial.

La suspensión de *Pseudomonas putida* G7 contenía 10^8 CFU/mL, que corresponde a una densidad óptica de 0,3 a 600 nm. El número de células en el inóculo era suficiente para causar el comienzo inmediato de la degradación sin fase de aclimatación previa. El inóculo se preparó siguiendo el protocolo expuesto en el apartado III.4.

Los matraces biométricos empleados se cerraron con un tapón envuelto en cinta de teflón para impedir la adsorción de naftaleno a la goma y evitar además que las muestras se secan durante el ensayo. Los matraces se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Se midió la producción de $^{14}\text{CO}_2$ como se ha descrito en el apartado III.11.1.

III.11.3 MINERALIZACIÓN DE NAFTALENO DISUELTO EN NAPLs, EN LECHOS DE ARENA, Y EN PRESENCIA DE DISTINTOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

Estos ensayos difieren de los del apartado III.11.2 en que el substrato se añadió disuelto en HMN.

Para medir la mineralización de naftaleno se prepararon ensayos por duplicado en matraces biométricos de 250 mL. Se añadieron entre 160000 y 170000 dpm de naftaleno-UL- ^{14}C disuelto en 0,1 mL de HMN en el centro de cada matraz. El HMN tenía una concentración de naftaleno no marcado de 1 mg/mL. Se añadieron a cada matraz, 40 gramos de arena lavada y 12 mL de suspensión bacteriana en medio de mineralización, suplementado, en su caso, con acetato sódico o succinato sódico (10 mM).

El inóculo de *Pseudomonas putida* G7 contenía 10^8 CFU/mL, y se preparó como se ha descrito en el apartado anterior.

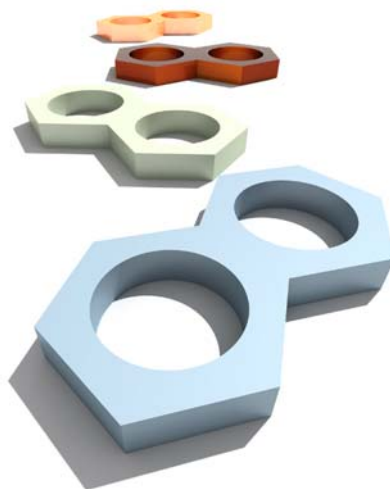
Los matraces biométricos empleados se cerraron con tapones envueltos en cinta de teflón. Se mantuvieron a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). La producción de $^{14}\text{CO}_2$ se midió como se ha descrito anteriormente en el apartado III.11.1.



Figura III.5 *Matraz biométrico para ensayos de mineralización*

CAPÍTULO IV

RESULTADOS



IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTIRPES UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

Se llevó a cabo una caracterización de las estirpes, estudiando como varían su movilidad, hidrofobicidad-hidrofilicidad (θ_w , ángulo de contacto) y carga celular superficial (Potencial Z, ζ) a lo largo de las distintas fases de la curva de crecimiento, así como en distintas condiciones ambientales. El principal objetivo fue determinar las condiciones óptimas para realizar los ensayos de transporte y biodegradación. Asimismo, esta caracterización nos aportó una información básica muy útil para explicar resultados posteriores.

IV.1.1 *Pseudomonas putida* G7

Esta estirpe degradadora de naftaleno es considerada como clásica dentro de los estudios de biodegradación y quimiotaxis centrados en naftaleno (Dunn y Gunsalus, 1973). La bacteria como se explicó anteriormente (sección III.4) se cultivó con salicilato. Sin embargo, pese a ser una estirpe degradadora de naftaleno, cuando se cultivó en medio líquido (MM) con 0,2% naftaleno mostró problemas de crecimiento. No obstante, el mantenimiento de la estirpe se llevó a cabo en medio sólido (MBS + 16 g/L agar) con cristales de naftaleno en la tapa de la caja de Petri.

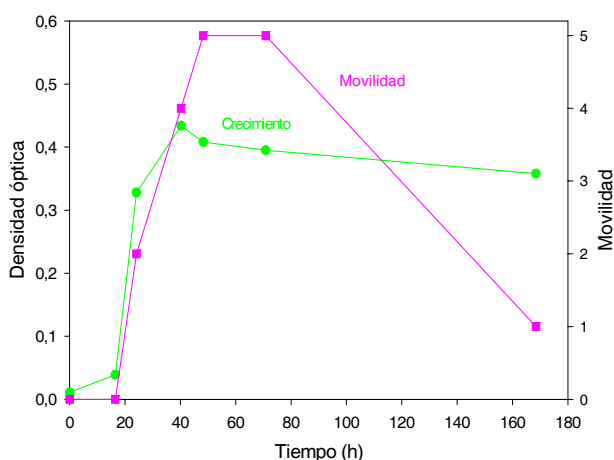
El seguimiento de la movilidad a lo largo de su curva de crecimiento indicó que este organismo, creciendo con salicilato, alcanzaba su máxima movilidad a las 48 h (figura IV.1), correspondiendo a una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,45. Esta máxima movilidad se mantuvo durante aproximadamente 22 horas, para después disminuir a lo largo de la fase estacionaria, muy posiblemente debido al consumo de la fuente de carbono y energía. La tasa de crecimiento con salicilato calculada en la fase de crecimiento exponencial fue de $0,26 \text{ h}^{-1}$.

Las dimensiones medias de sus células, estimadas al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento (48 horas), fueron $1 \mu\text{m}$ de ancho x $3 \mu\text{m}$ de largo.

Tanto el ángulo de contacto como el potencial Z no variaron a lo largo de la curva de crecimiento. Esto se puede observar en la tabla IV.1, en la cual se muestran medidas (por octuplicado) realizadas a las 4, 10, 21 y 48 horas de crecimiento.

Tabla IV.1 Ángulos de contacto y potencial Z para la estirpe *Pseudomonas putida* G7 cultivada en medio de mineralización suplementado con salicilato sódico 5 mM

Tiempo (horas)	Ángulo de contacto (grados)	Potencial Z (mV)
4	40 ± 2	-38 ± 3
10	43 ± 2	-35 ± 1
21	40 ± 5	-35 ± 3
48	46 ± 4	-39 ± 2

**Figura IV.1** Crecimiento y movilidad de *Pseudomonas putida* G7 en presencia de salicilato (5 mM) como única fuente de carbono y energía

Van Loosdrecht et al. (1987b) expusieron que los ángulos de contacto agua-célula varían entre 21° y 70°, sin estar relacionados con el hecho de que la pared celular de la bacteria sea del tipo Gram-positiva o Gram-negativa. Otros autores propusieron una clasificación (Bendinger et al., 1993) mediante la cual se consideran ángulos de contacto entre 16° y 40° de hidrofílicos a moderadamente hidrofóbicos; ángulos de contacto de 55° a 103°, son considerados hidrofóbicos; y ángulos de contacto entre 111° y 117° son considerados altamente hidrofóbicos. Por tanto, podemos concluir que esta estirpe estaría justo en el límite entre lo hidrofílico y lo hidrofóbico. Los valores de potencial Z corresponden a valores intermedios dentro de los normalmente detectados en los degradadores de HAP (Lahlou et al., 2000).

Con esta estirpe también se llevó a cabo un seguimiento de la movilidad a lo largo de su curva de crecimiento en cultivos con distintas fuentes de carbono (acetato, fumarato, succinato y glucosa), que posteriormente serían utilizadas en los ensayos de quimiotaxis, transporte y biodegradación (figura IV.2). Las tasas de crecimiento con estos compuestos en la fase de crecimiento exponencial fueron las siguientes:

0,06 h⁻¹ para el crecimiento con acetato, 0,09 h⁻¹ para fumarato, 0,37 h⁻¹ para succinato y 0,19 h⁻¹ para glucosa.

Creciendo con succinato (figura IV.2 C) como única fuente de carbono y energía, el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm mayor que cuando creció con cualquiera de los otros sustratos. Las células alcanzaron su máxima movilidad a las 24 h, coincidiendo con el final de la fase exponencial de crecimiento. No obstante, la movilidad comenzó a disminuir a partir de ese momento, siendo el periodo de máxima movilidad muy breve.

El crecimiento con fumarato fue ligeramente menor, alcanzando una densidad óptica máxima de 0,328 a 600 nm (figura IV.2 B). La movilidad bacteriana con este sustrato fue alta, manteniéndose durante aproximadamente 8 horas, para después disminuir a lo largo de la fase estacionaria.

A diferencia de los sustratos anteriores, cuando la estirpe *Pseudomonas putida* G7 se cultivó con acetato o glucosa, alcanzó una densidad óptica muy baja en ambos casos (figuras IV.2 A y D). En cuanto a la movilidad, ésta fue nula cuando se cultivó con glucosa, y sólo en acetato alcanzó una movilidad moderada a las 40 horas de crecimiento, disminuyendo paulatinamente a partir de entonces.

Finalmente, se determinó el posible efecto sobre el ángulo de contacto y el potencial Z de la resuspensión en disoluciones de estos quimioefectores, tras cultivo con salicilato durante 48 horas (tabla IV.2). Asimismo se estudió el efecto de la fuerza iónica, utilizando medios con distintas concentraciones de salicilato. Según estos resultados, no se observa alteración significativa en ninguno de estos tratamientos con respecto al ángulo de contacto y potencial Z originales de la bacteria, $46 \pm 4^\circ$ y -39 ± 2 mV, respectivamente.

Tabla IV.2 Influencia del quimioefector presente en el medio de resuspensión sobre ángulos de contacto y potencial Z para la estirpe *Pseudomonas putida* G7 cultivada con salicilato

Quimioefector	Ángulo de contacto (°)	Potencial Z (mV)
Succinato 10 mM	36 ± 3	-31 ± 2
Fumarato 10 mM	34 ± 2	-36 ± 2
Acetato 10 mM	36 ± 3	-37 ± 2
Salicilato 0,1 mM	41 ± 4	-38 ± 2
Salicilato 0,5 mM	37 ± 3	-32 ± 2
Salicilato 1 mM	31 ± 3	-37 ± 2
Salicilato 10 mM	36 ± 2	-36 ± 2

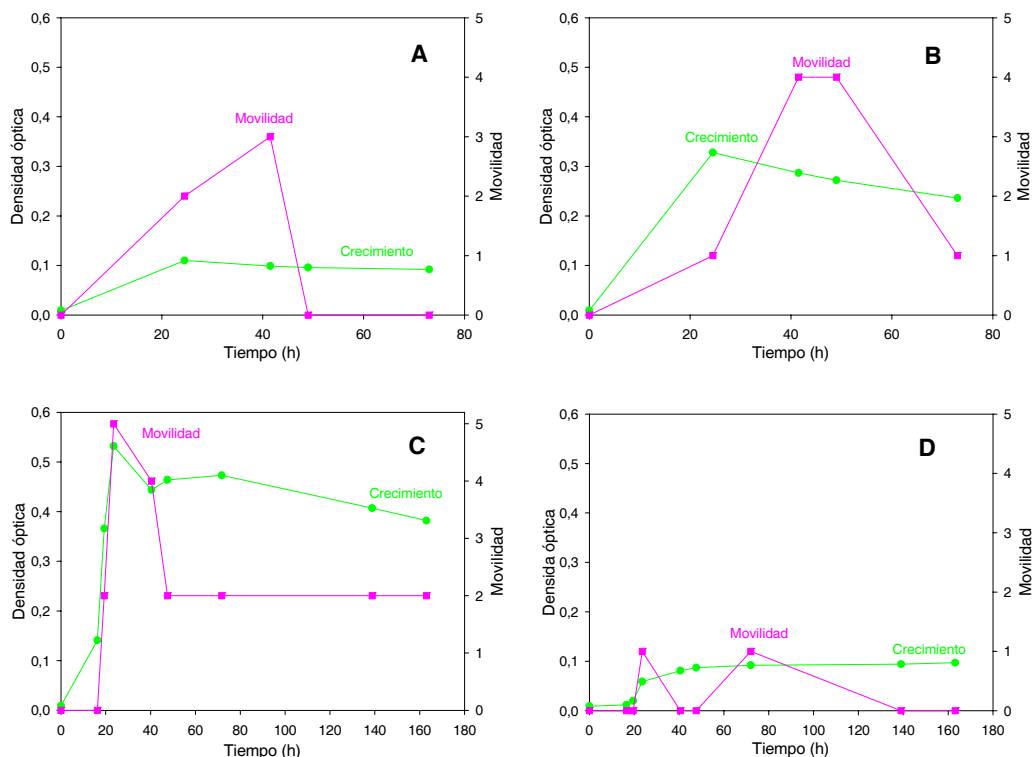


Figura IV.2 Crecimiento y movilidad en presencia de **A**, acetato (5 mM); **B**, fumarato (5 mM); **C**, succinato (10 mM); **D**, glucosa (10 mM), como única fuente de carbono y energía

IV.1.2 *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100)

Esta bacteria es una estirpe mutante en quimiotaxis de la estirpe *P. putida* G7 (Grimm y Harwood, 1997). Es móvil y degradadora de naftaleno, y las dimensiones medias de sus células, tomadas al comienzo de la fase de crecimiento estacionaria (a las 48 horas), son 0,9 μm de ancho x 2 μm de largo. La curva de crecimiento en salicilato (figura IV.3) es muy similar a la de la estirpe salvaje, con la diferencia de que alcanzó su estado estacionario a una densidad óptica más baja. El estadio en el que se observó la movilidad más elevada fue aproximadamente el mismo, aunque se observó una tendencia a disminuir la movilidad desde el inicio de la fase estacionaria. La tasa de crecimiento de esta estirpe con salicilato se calculó en la fase de crecimiento exponencial y fue, 0,21 h^{-1} , muy similar a la obtenida para la estirpe salvaje, *P. putida* G7.

Esta estirpe es ligeramente más hidrofóbica que la estirpe salvaje, con un ángulo de contacto en torno a 60° (tabla IV.3). La carga celular superficial es igual en ambas estirpes. Cuando se resuspendió la estirpe en una disolución 10 mM de succinato

sódico en medio de mineralización, los ángulos de contacto y la carga superficial no variaron ($52 \pm 5^\circ$ y -38 ± 2 mV, respectivamente).

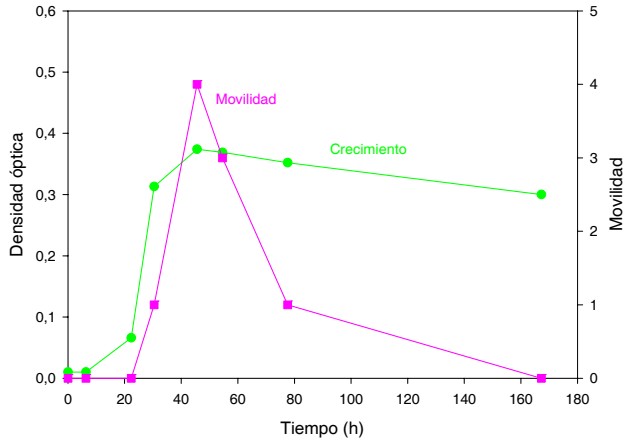


Figura IV.3 Crecimiento y movilidad de *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) en presencia de salicilato (5 mM) como única fuente de carbono y energía

Tabla IV.3 Ángulos de contacto y potencial Z para la estirpe *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) cultivada en presencia de salicilato sódico 5 mM

Tiempo (horas)	Ángulo de contacto ($^\circ$)	Potencial Z (mV)
8	67 ± 1	-31 ± 2
12	63 ± 2	-34 ± 3
24	54 ± 4	-36 ± 2
48	53 ± 3	-38 ± 2

IV.1.3 *Sphingomonas* sp. LB126

Esta bacteria es móvil y degradadora de fluoreno. Sus dimensiones medias, obtenidas a las 48 horas de crecimiento, son $0,9 \mu\text{m}$ de ancho x $1,3 \mu\text{m}$ de largo. Para todos los ensayos llevados a cabo con esta estirpe la bacteria se cultivó en ácido protocatéquico. A lo largo de su crecimiento (figura IV.4) se observó que la máxima movilidad se alcanzó aproximadamente tras 48 horas de crecimiento, manteniéndose esta movilidad a lo largo de la fase estacionaria. La tasa de crecimiento de esta estirpe con ácido protocatéquico en la fase de crecimiento exponencial fue $0,07 \text{ h}^{-1}$.

Esta estirpe es hidrofílica, con un ángulo de contacto en torno a 35° (tabla IV.4). La carga celular superficial es muy baja, muy próxima a cero. Estos valores son muy similares a los obtenidos para la misma estirpe en otro estudio de nuestro laboratorio

(Lahlou et al., 2000), que utilizó fluoreno como fuente de carbono (respectivamente, 23,4^o y -2,6 mV).

Las células de esta estirpe son, por tanto, algo más cortas que la degradadora de naftaleno, *P. putida* G7. También difieren ambas estirpes en su movilidad, siendo *Sphingomonas* sp. LB126 mucho menos móvil que *P. putida* G7, aunque aquélla permaneció móvil a lo largo de gran parte de la fase estacionaria. Su carga celular superficial es unas treinta veces menor que la de *P. putida* G7. Estas diferencias podrían marcar distintos comportamientos en las interacciones con superficies sólidas.

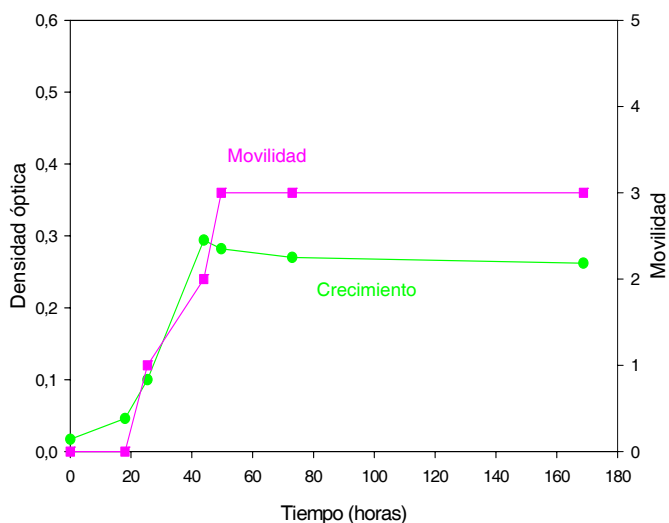


Figura IV.4 Crecimiento y movilidad de *Sphingomonas* sp. LB126 en presencia de ácido protocatéutico (400 mg/L) como única fuente de carbono y energía

Tabla IV.4 Ángulos de contacto y potencial Z para la estirpe *Sphingomonas* sp. LB126 cultivada en medio suiza suplementado con 400mg/L de ácido protocatéutico

Tiempo (horas)	Ángulo de contacto (°)	Potencial Z (mV)
4	33 ± 3	-3,3 ± 0,4
11	38 ± 3	-3,3 ± 0,2
23	37 ± 2	-2,8 ± 0,2
47	39 ± 2	-3,0 ± 0,1

IV.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ

Esta bacteria es móvil, degradadora de fenantreno y naftaleno, y es capaz de producir biosurfactantes durante el crecimiento con estos compuestos (García-Junco et al., 2001). Sus dimensiones medias, obtenidas en la mitad de la fase de crecimiento exponencial, son $0,9 \mu\text{m}$ de ancho x $2,3 \mu\text{m}$ de largo. A lo largo del crecimiento con fenantreno (figura IV.5) se observó que la movilidad más elevada se alcanzó, a diferencia de las otras estirpes, aproximadamente a los 11 días y en mitad de la fase de crecimiento exponencial. La movilidad de esta estirpe se mantuvo durante 4 días, a partir de los cuales empezó a disminuir, hasta no observarse movilidad alguna en el inicio de la fase estacionaria. La tasa de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial para *P. aeruginosa* 19SJ, fue de $0,006 \text{ h}^{-1}$.

Debido al limitado número de experimentos realizados con esta estirpe no se vio necesario desarrollar un método de cultivo más rápido con una fuente de carbono hidrosoluble, como el salicilato.

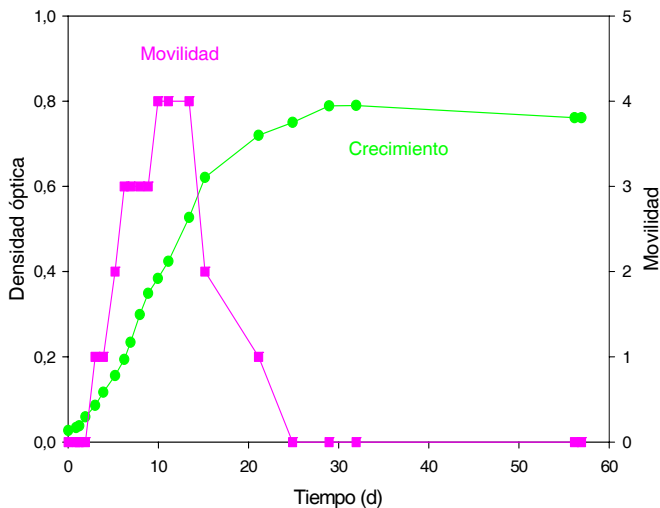


Figura IV.5 Crecimiento y movilidad de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ en presencia de fenantreno como única fuente de carbono y energía

IV.2 RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA DE LAS ESTIRPES UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

IV.2.1 ENSAYOS CAPILARES

IV.2.1.1 Ensayos cualitativos

IV.2.1.1.1 Quimiotaxis frente a sustancias hidrofílicas

A pesar de ser un fenómeno bien conocido, el estudio de la quimiotaxis bacteriana presenta la dificultad de la complicada reproducibilidad del proceso. Por ello se realizaron ensayos quimiotácticos frente a sustancias hidrosolubles, y con conocida capacidad quimiotáctica, como es el caso de la triptona, para después pasar a otras sustancias hidrosolubles, así como compuestos hidrófobos, en concreto HAPs, ambos objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

En la figura IV.6 se representa la respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ frente a triptona (0,1% en tampón fosfato).

Tal como se observa en las figuras, se detectó una activa acumulación de bacterias en torno a la boca del capilar, y su movimiento dentro del mismo. La acumulación dentro del capilar ya era completamente evidente en las fotos tomadas a 30 (figura IV.6 C) y 45 minutos (figura IV.6 D).

En las figuras IV.6 C y IV.6 D se observa un retroceso en el frente de bacterias. Este retroceso puede ser debido a dos causas distintas. En primer lugar, es posible que al ir entrando las bacterias en el capilar y degradando el HAP, el gradiente se invierta lo que da lugar a un retroceso del frente bacteriano. En segundo lugar, la actividad bacteriana puede dar lugar a un consumo de oxígeno que genere un gradiente de concentración capaz de movilizar las bacterias hacia el exterior del capilar por aerotaxis. Estas observaciones indican la complejidad del proceso quimiotáctico, y la importancia de la puesta a punto de métodos adecuados que permitan su estudio bajo condiciones reproducibles.

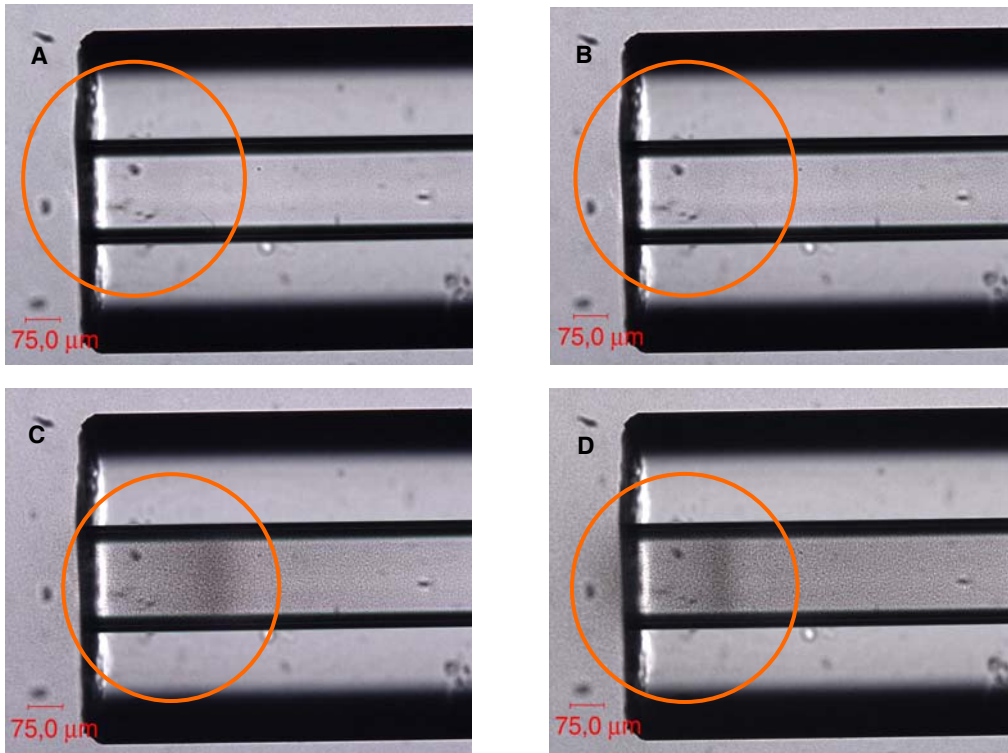


Figura IV.6 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ frente a una disolución de triptona al 1%. **A**, situación inicial. **B**, 15 min. **C**, 30 min. **D**, 45 min.

IV.2.1.1.2 Quimiotaxis frente a HAPs

Se llevaron a cabo ensayos cualitativos de microscopía con la bacteria *Pseudomonas putida* G7. Se realizó un seguimiento de la respuesta quimiotáctica cuando en el interior del capilar había una disolución saturada de naftaleno (figuras IV.7 A y B) o bien cristales de naftaleno (figuras IV.8 A, B y C) (en las figuras IV.8 B y C se incluye un detalle de la boca del capilar a un aumento de x40).

Cuando en el interior del capilar hay una disolución saturada de naftaleno, se observa a los 75 minutos una acumulación bacteriana tanto en la boca del capilar como dentro del mismo, siguiendo el gradiente de concentración de naftaleno (figura IV.7). Si en lugar de una disolución de naftaleno, lo que se introduce en el capilar son cristales de este HAP, a los 40 minutos (figura IV.8 B) se observa una acumulación de bacterias en torno a la boca del capilar. La atracción quimiotáctica prosigue hasta lo 90 minutos, como se pone de manifiesto en la figura IV.8 C.

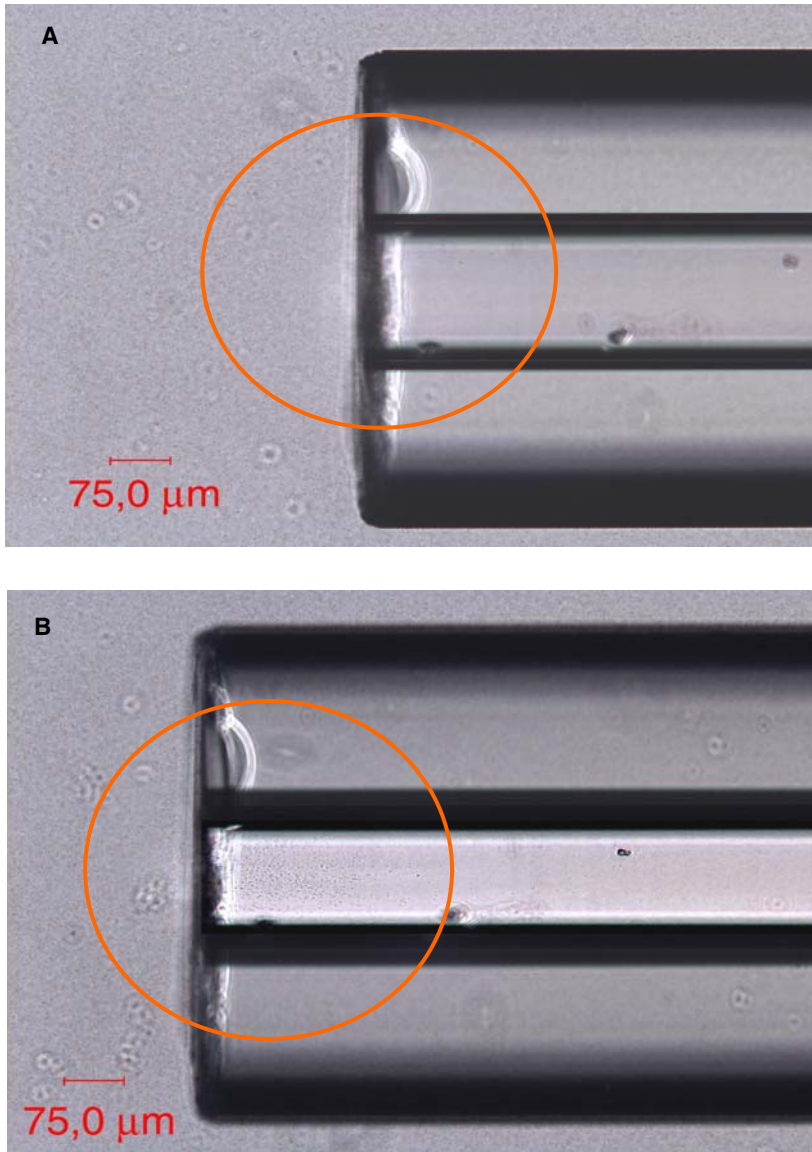


Figura IV.7 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 frente a una disolución saturada de naftaleno. **A**, situación inicial. **B**, 75 min.

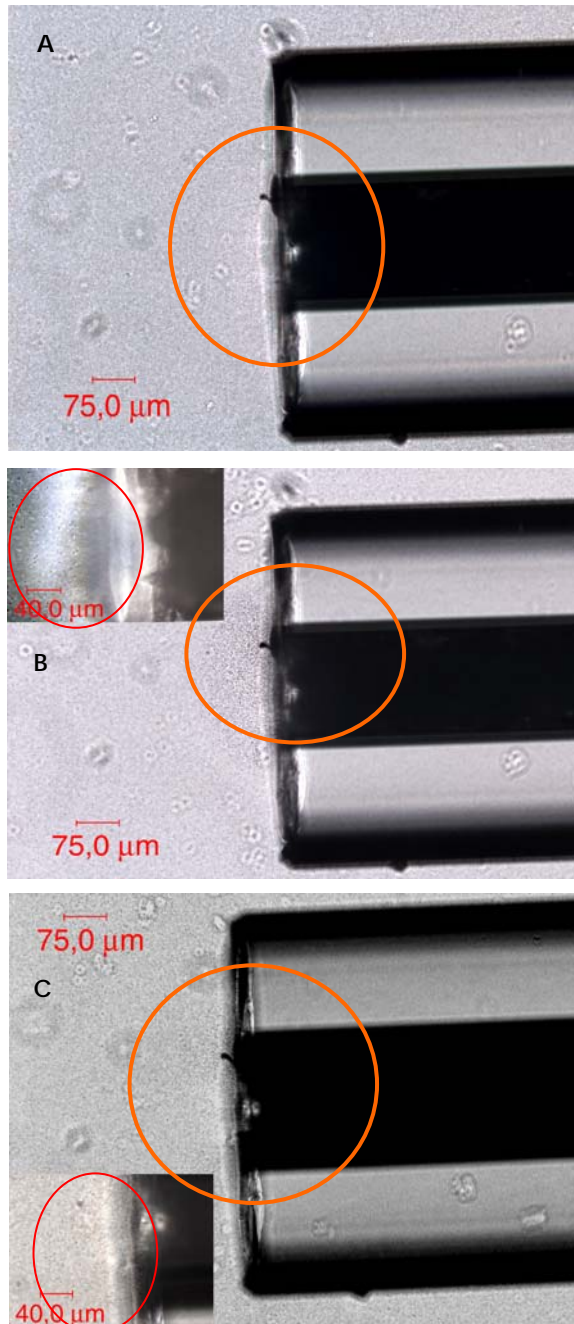


Figura IV.8 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 frente a naftaleno sólido. **A**, situación inicial. **B**, 40 min. **C**, 90 min.

IV.2.1.2 Ensayos cuantitativos

IV.2.1.2.1 Quimiotaxis frente a sustancias hidrofílicas

Se llevaron a cabo ensayos quimiotácticos frente a distintos quimioefectores con dos estirpes, con *P. aeruginosa* 19SJ, y con *P. putida* G7. Con la primera de ellas, se observó atracción quimiotáctica a triptona a una concentración del 1% (figura IV.9). Con la segunda estirpe, *P. putida* G7, los ensayos quimiotácticos que se realizaron fueron con los quimioefectores que más adelante se utilizarían en los ensayos de transporte (figura IV.10). Éstos fueron: acetato, fumarato, salicilato, succinato y NaCl, todos ellos a una concentración igual a 100 mM. Los resultados indican que la estirpe es quimiotáctica frente a los cuatro primeros quimioefectores, pero en distinto grado, en el siguiente orden: succinato > salicilato > acetato > fumarato. Sin embargo, esta estirpe no fue quimiotáctica frente a cloruro sódico. El número de células que entró en los capilares control se mantuvo prácticamente constante en los distintos ensayos, siendo como mínimo cuatro veces menor que el número de células que entró en los capilares con quimioatrayente.

Las diferencias entre las medias de los capilares control y los capilares con los distintos quimioefectores fueron estadísticamente significativas para *P. putida* G7 frente a acetato, fumarato, salicilato y succinato a $P=0,01$ y para *P. aeruginosa* 19SJ frente a triptona a $P=0,05$. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las medias de los capilares control y los capilares con cloruro sódico para *P. putida* G7 a $P=0,05$.

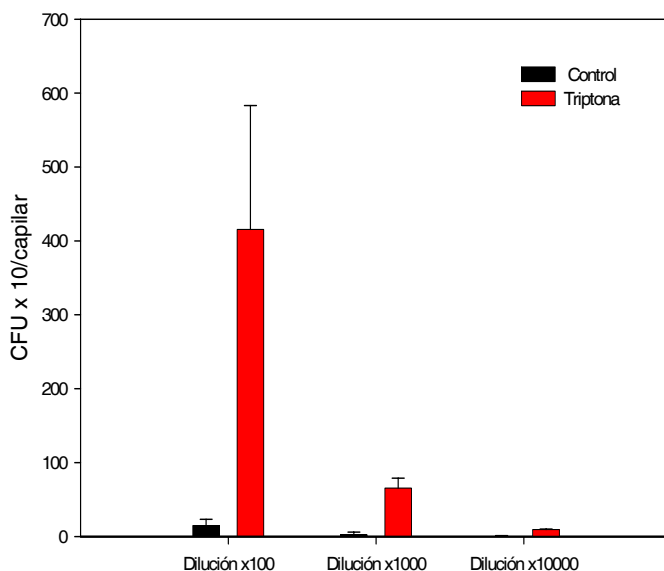


Figura IV.9 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ frente a una disolución de triptona al 1%

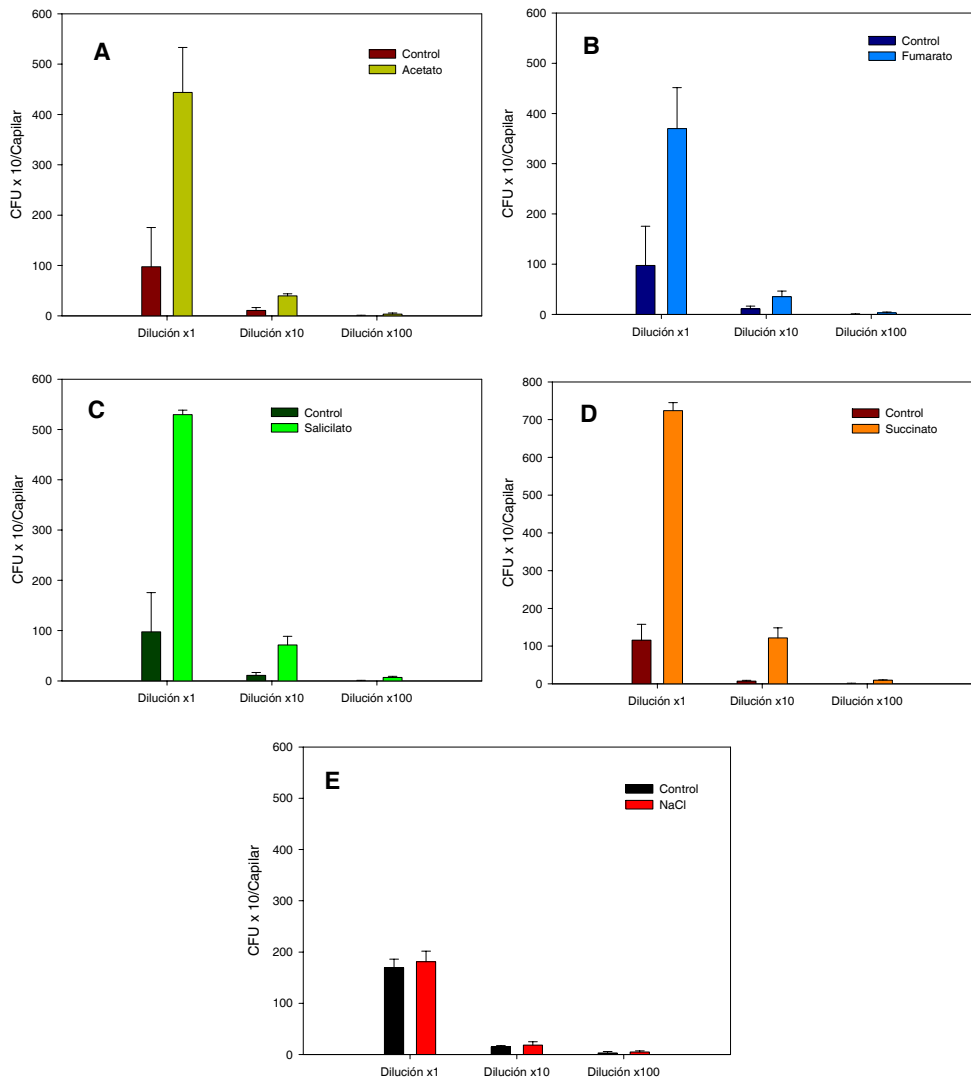


Figura IV.10 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 frente a distintos quimioefectores hidrofílicos. **A**, Acetato (100 mM). **B**, Fumarato (100 mM). **C**, Salicilato (100 mM). **D**, Succinato (100 mM). **E**, NaCl (100 mM)

Se realizó además un estudio mediante microscopía óptica sobre cómo variaba el patrón de movimiento de las células de *P. putida* G7 en presencia y ausencia de estos quimioefectores. Las observaciones se realizaron tras resuspender la bacteria en medio de cultivo (MM), salicilato (5 mM) y succinato (10 mM) tras cultivo con salicilato durante 48 horas. En ausencia de quimioatrayente el movimiento seguía trayectorias unidireccionales, con cambios abruptos de dirección. En presencia de salicilato se observó que el patrón de movimiento cambiaba notablemente. El movimiento bacteriano describía trayectorias curvilíneas mantenidas y abiertas, y en algunas células, cerradas, la mayoría de ellas en este segundo caso en sentido contrario a las agujas del reloj. Este patrón de movimiento en presencia y ausencia de quimioefector es típico del comportamiento móvil de *P. putida* (Harwood et al., 1989). El succinato provocó en las bacterias la paralización casi total, observándose en algunas de ellas, movimientos vibratorios y giratorios en torno a sí mismas, que serán discutidos más adelante. Esta observación se llevó a cabo cada 15 minutos durante 5 horas y la paralización se mantuvo durante todo este tiempo, periodo tras el cual se recuperó el movimiento, con un patrón muy similar al que ocurría con salicilato.

IV.2.1.2.2 Quimiotaxis frente a HAPs

Se estudió la capacidad quimiotáctica de forma cuantitativa mediante conteo de viables para las estirpes *P. putida* G7, *P. putida* G7.C1 (pHG100), *Sphingomonas* sp. LB126 y *P. aeruginosa* 19SJ, frente a naftaleno para las dos primeras estirpes, y frente a fluoreno y fenantreno para la tercera y cuarta estirpe, respectivamente (figura IV.11). Estos ensayos se realizaron en las condiciones y medios de cultivo genéricos descritos en la sección de Materiales y Métodos (pag. 48-49). Se observó que, excepto la estirpe mutante *P. putida* G7.C1 (pHG100), las otras tres estirpes daban resultados positivos, siendo el índice quimiotáctico (IQ) superior a uno en todas ellas.

Las diferencias entre las medias de los capilares control y los capilares con HAP fueron estadísticamente significativas para *P. putida* G7 a $P=0,05$ y para *P. aeruginosa* 19SJ y *Sphingomonas* sp. LB126 a $P=0,01$.

Con la estirpe *P. putida* G7 se llevó a cabo un estudio más detallado (figura IV.12) para elegir las condiciones óptimas de cultivo y resuspensión con el objeto de observar una mayor respuesta quimiotáctica. Se pretendía poder cultivar y resuspender la bacteria en un medio a pH 5,7, que es el pH óptimo para llevar a cabo los ensayos de mineralización con ^{14}C , y de esta manera mantener las mismas condiciones en todos los experimentos llevados a cabo con esta estirpe, tanto los ensayos quimiotácticos como los de transporte y biodegradación. Se concluyó que las condiciones óptimas eran las siguientes: cultivar la bacteria en medio de mineralización suplementada con salicilato sódico 5 mM y resuspenderla en medio de mineralización. En estas condiciones se veía la mejor respuesta quimiotáctica de nuestra estirpe a naftaleno (figura IV.12 C).

Se llevó a cabo también un ensayo para observar el efecto de un tensioactivo sobre la capacidad quimiotáctica de la estirpe *P. putida* G7 frente a naftaleno. El tensioactivo elegido fue Brij 35 (véase Introducción, pag. 10). Se resuspendió la bacteria en una disolución de Brij 35 en medio de mineralización a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$,

que era tres veces la concentración crítica micelar (CMC) de este tensioactivo. El Brij 35 hizo que el naftaleno, en lugar de actuar como quimioatrayente, actuara como quimiorrepelente (figura IV.13). Las diferencias entre las medias de los capilares control y los capilares con naftaleno fueron estadísticamente significativas para $P=0,01$.

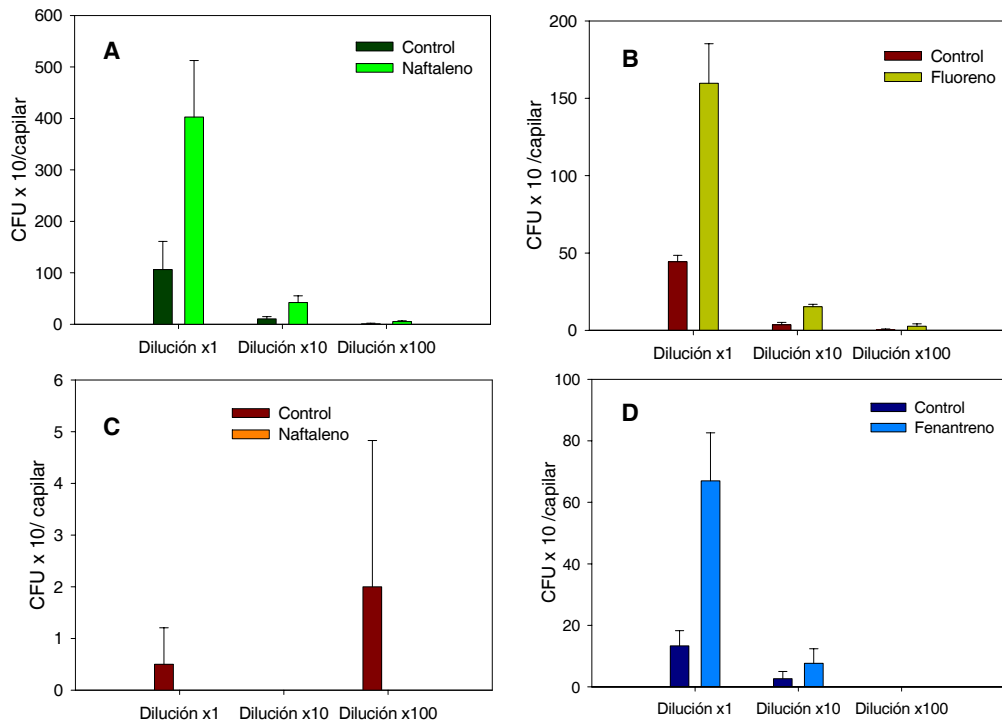


Figura IV.11 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 frente a naftaleno (A), *Sphingomonas* sp. LB126 frente a fluoreno (B) *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) frente a naftaleno (C) y *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ frente a fenantreno (D)

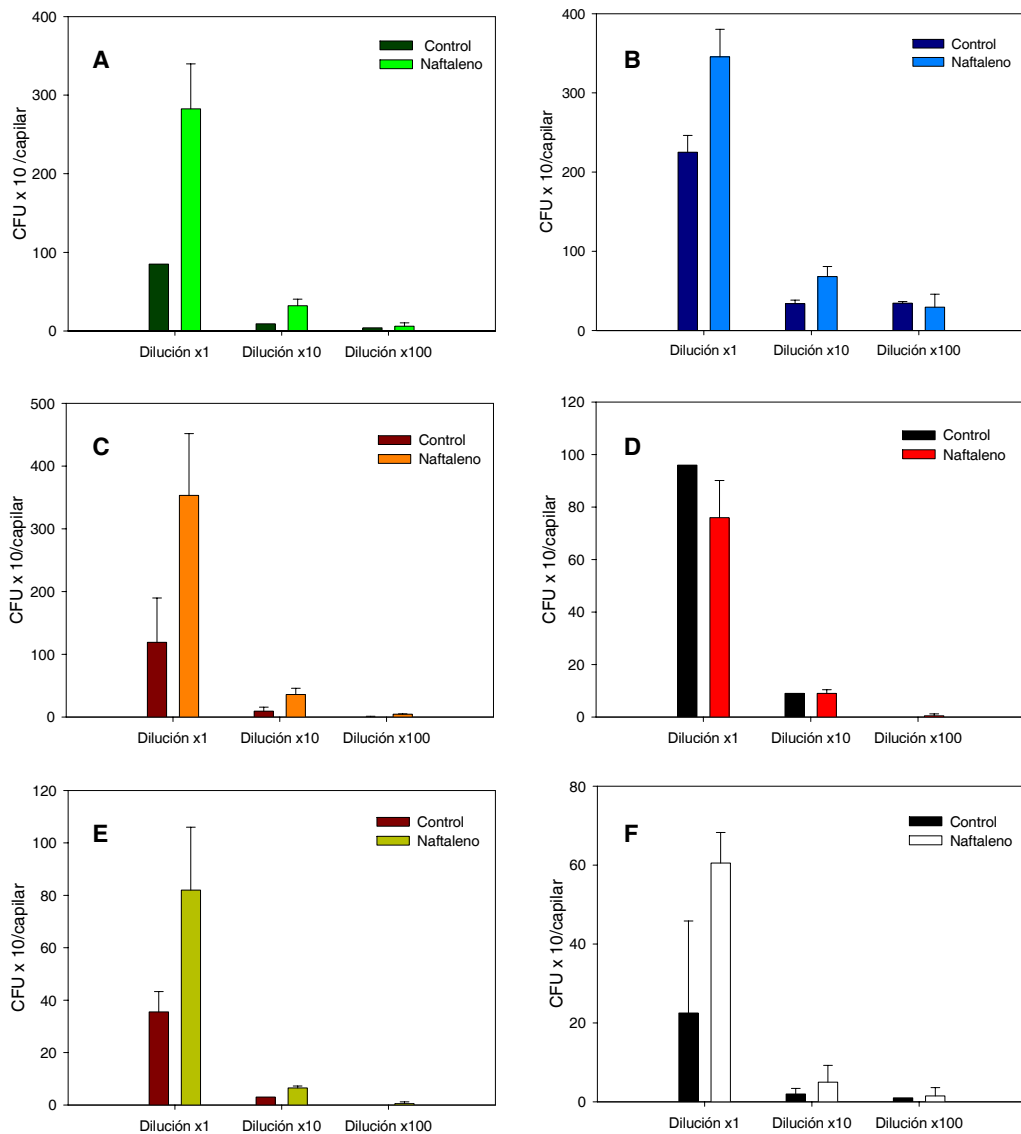


Figura IV.12 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 frente a naftaleno, cultivada en MSB suplementado con salicilato sódico 5 mM y resuspendida en medio de mineralización (A) o tampón fosfatos (B). La estirpe cultivada en medio de mineralización suplementado con salicilato sódico 5 mM y resuspendida en medio de mineralización (C) o tampón fosfatos (D). La estirpe cultivada en MSB a pH 5,7 suplementado con salicilato sódico 5 mM y resuspendida en MSB a pH 5,7 (E) o tampón fosfatos (F)

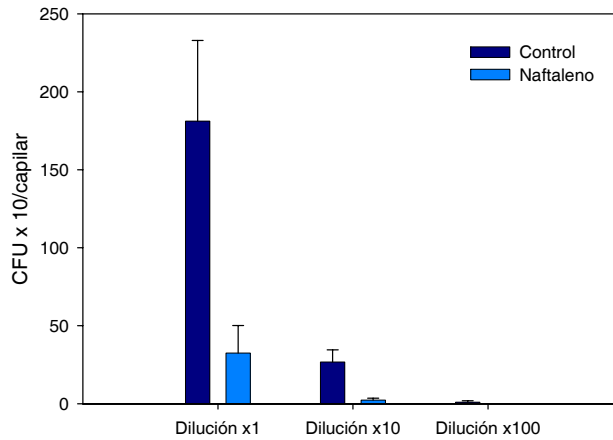


Figura IV.13 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 frente a naftaleno cuando la bacteria está resuspendida en una solución de Brij 35

A efectos comparativos, en la figura IV.14 se incluyen los resultados obtenidos con *P. putida* G7 para los distintos quimioefectores utilizados (dilución x1). Se puede observar que la magnitud de la respuesta quimiotáctica frente a naftaleno y ácidos orgánicos fue muy parecida en todos ellos, existiendo una diferencia clara con los respectivos controles.

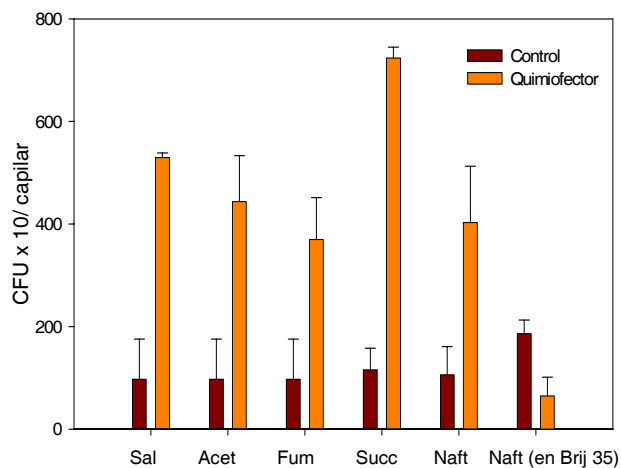


Figura IV.14 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 frente a diferentes quimioefectores

IV.2.2 QUIMIOTAXIS Y ADHESIÓN A NAPLs

IV.2.2.1 Ensayos de adhesión mediante microscopía óptica

Se realizó un seguimiento mediante microscopía óptica de la respuesta quimiotáctica y la adhesión a NAPLs de *P. putida* G7 cuando en el interior del capilar había naftaleno disuelto en un líquido en fase no acuosa, heptametilnonano (figuras IV.15 A y B), en comparación a cuando en el heptametilnonano no había ningún quimioatrayente disuelto (figuras IV.16 A y B).

Cuando no había naftaleno disuelto en heptametilnonano las bacterias entraron en el capilar y se adhirieron a la fase orgánica, algo análogo a lo observado anteriormente (Law y Aitken, 2003). Cuando se disolvió naftaleno en la fase orgánica, las bacterias siguieron entrando en el capilar y formaron un biofilm en la interfase HMN-agua. La entrada en este caso en el capilar se vio favorecida por los dos procesos: quimiotaxis y adhesión de bacterias a esa fase orgánica. No obstante, la comparación de las figuras IV.15 B y IV.16 B indica que la adhesión al HMN fue más acentuada en ausencia que en presencia de naftaleno. Es posible que el reparto de naftaleno desde el NAPL hacia la fase acuosa causara una mayor tendencia de las células a permanecer en la fase acuosa, mediante quimiotaxis. En los ensayos de transporte (sección IV.3.2.1) se obtuvieron resultados análogos.

Se ha descrito anteriormente que las células de *P. putida* G7 experimentaban transitoriamente un descenso notable en su movilidad al ser resuspendidas en succinato, existiendo una mucho menor proporción de células móviles, que además mostraban un patrón típico de movimiento circular y vibratorio. Esta reducción en la movilidad, se reestablecía, no obstante, cuatro horas después de poner en contacto el succinato con la bacteria. Este hecho puede tener relación con el efecto, descrito para *Rhodobacter sphaeroides* (Packer y Armitage, 2000b), del succinato sobre el motor flagelar, que será discutido más adelante. Por ello, se realizaron una serie de experiencias para estudiar la adhesión al NAPL de esta estirpe, cuando la movilidad estaba notablemente reducida debido a la presencia de succinato (figuras IV.17 y IV.18). Se observó que la adhesión al NAPL era mucho más reducida, tanto en presencia como en ausencia de naftaleno, en comparación a los ensayos anteriores (figuras IV.15 y IV.16). No obstante, se observó la misma tendencia, esto es, la presencia de naftaleno parecía disminuir la adhesión al NAPL (figuras IV.17 B y IV.18 B). Es posible que, a pesar de estar notablemente impedida la movilidad debido al succinato, las células fueran capaces de detectar el naftaleno en solución, permaneciendo en la fase acuosa mediante quimiotaxis.

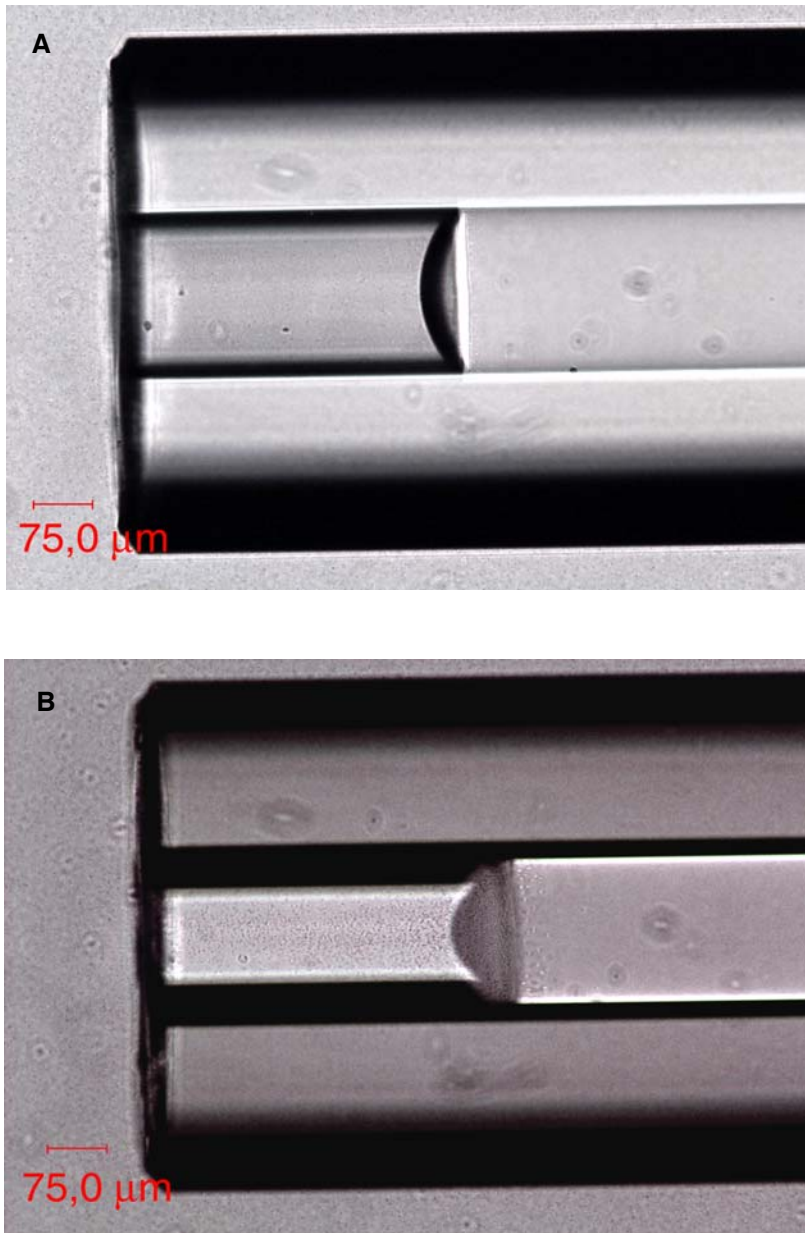


Figura IV.15 Adhesión de *Pseudomonas putida* G7 a heptametilnonano con naftaleno disuelto. **A**, situación inicial. **B**, 60 min.

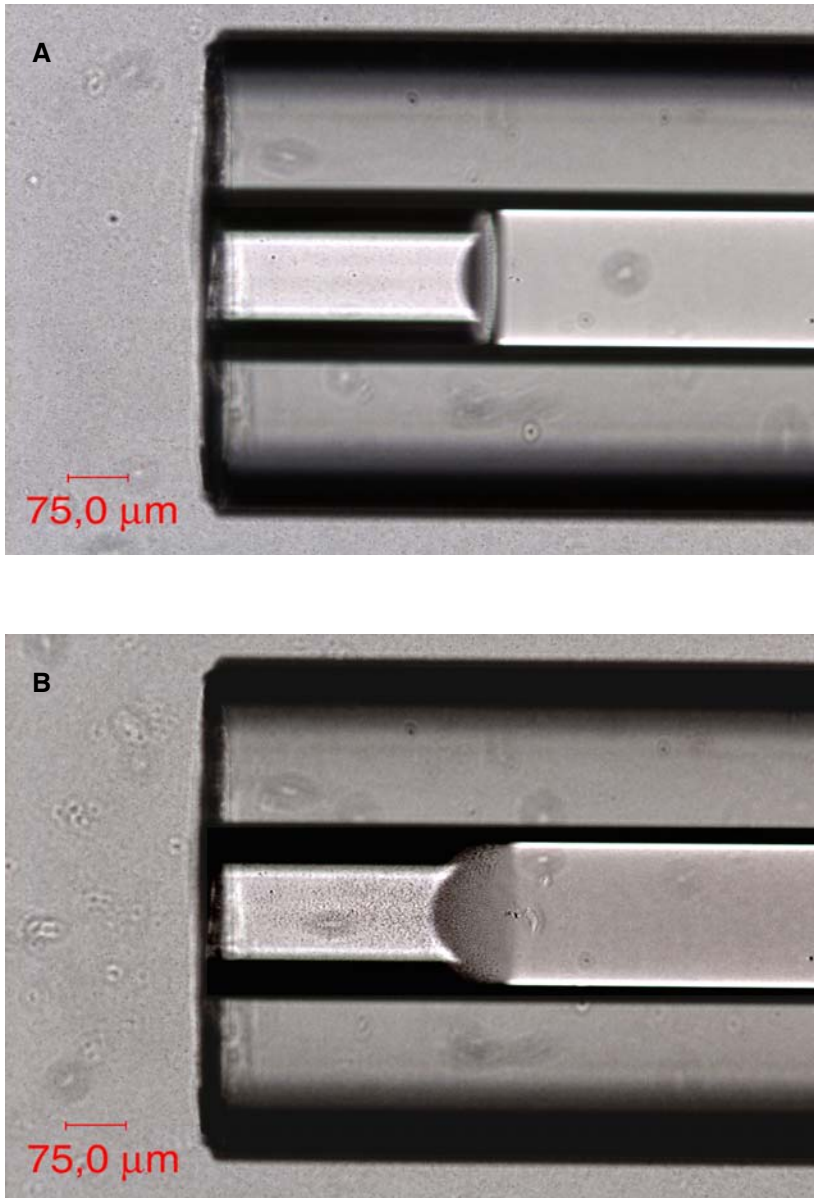


Figura IV.16 Adhesión de *Pseudomonas putida* G7 a heptametilnonano en ausencia de quimioefector (naftaleno). **A**, situación inicial. **B**, 60 min.

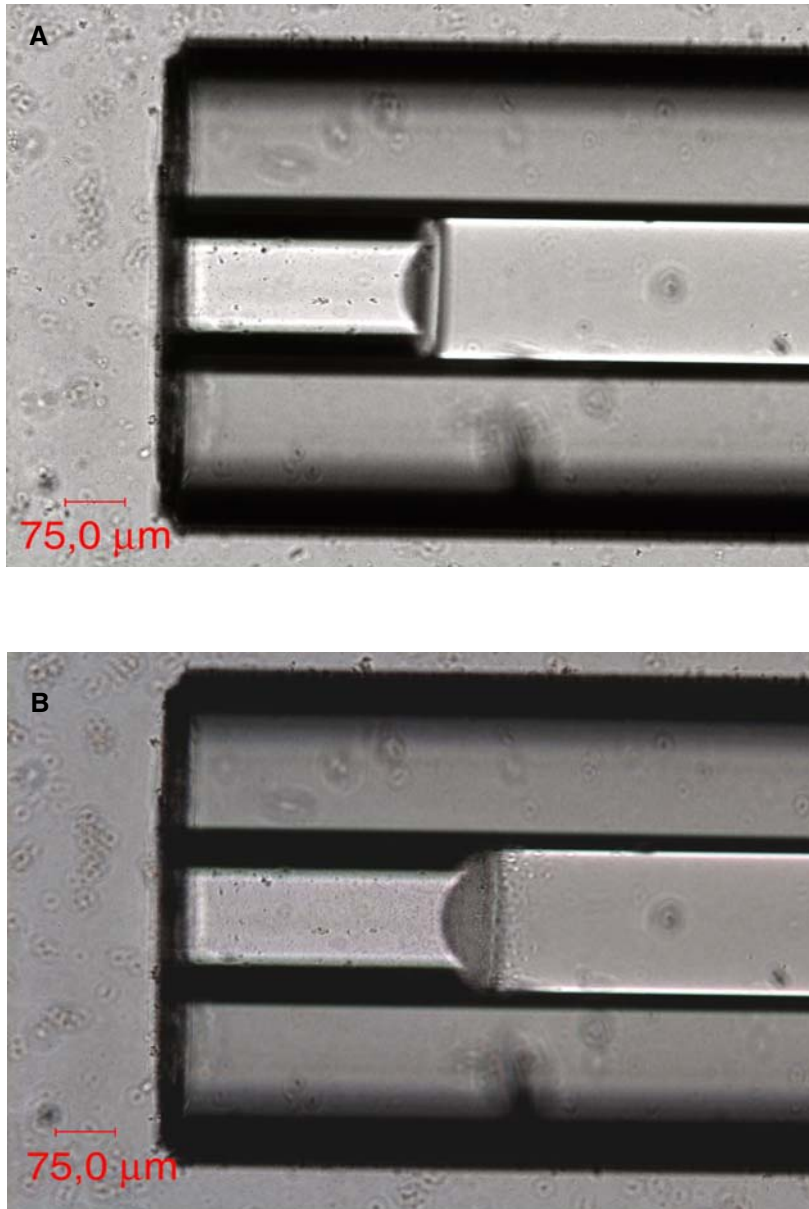


Figura IV.17 Adhesión de *Pseudomonas putida* G7 a heptametilonano en ausencia de naftaleno cuando la bacteria se resuspendió en una disolución de succinato sódico 10 mM en medio de mineralización. **A**, situación inicial. **B**, 60 min.

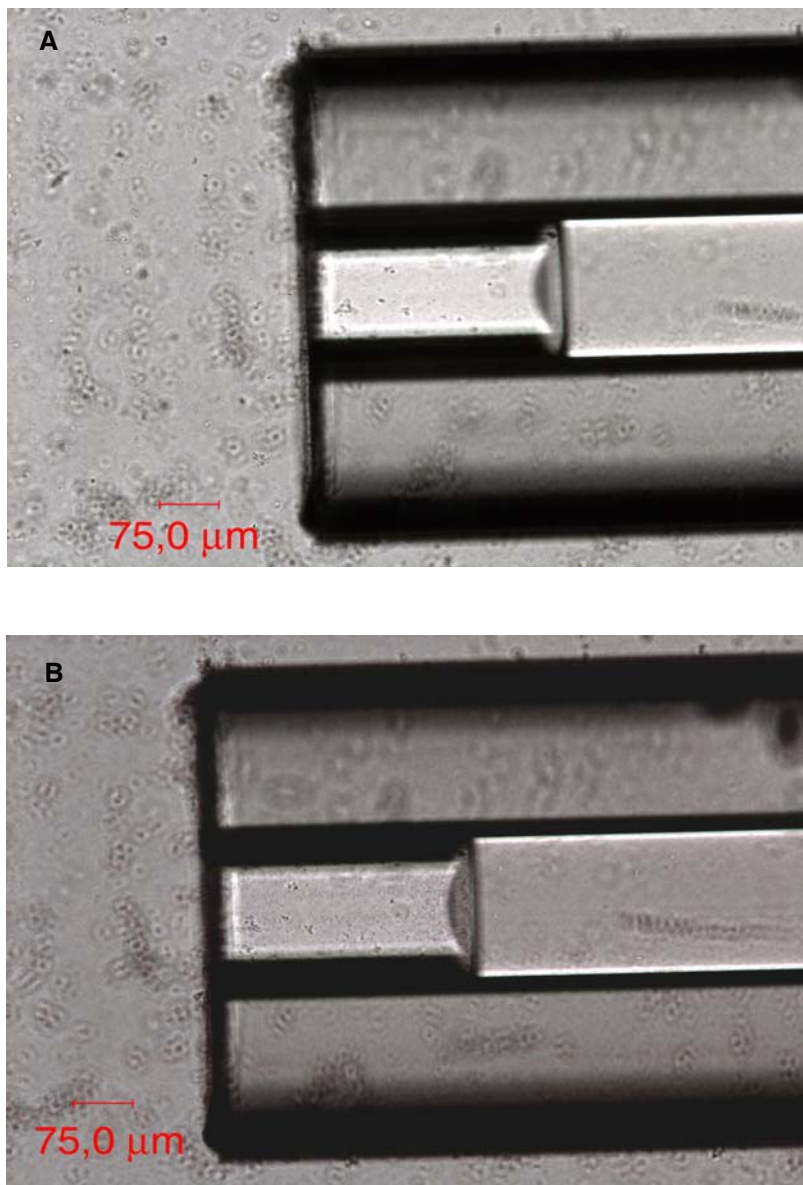


Figura IV.18 Adhesión de *Pseudomonas putida* G7 a heptametilonano con naftaleno disuelto cuando la bacteria se resuspendió en una disolución de succinato sódico 10 mM en medio de mineralización. **A**, situación inicial. **B**, 60 min.

Se estudió también la respuesta quimiotáctica de *P. putida* G7 frente a fuel pesado, observando que en torno a las gotas de fuel se acumularon activamente un gran número de bacterias, confirmando, así, que esta estirpe es quimiotáctica a los componentes del fuel (figuras IV.19 A y B). En la composición del fuel (capítulo de materiales y metodología, sección III.3) se puede observar cómo el naftaleno es el cuarto componente mayoritario tras fenantreno, acenafteno y fluoreno, aunque no se descarta que esta estirpe pueda ser quimiotáctica a algún otro HAP presente en el fuel.

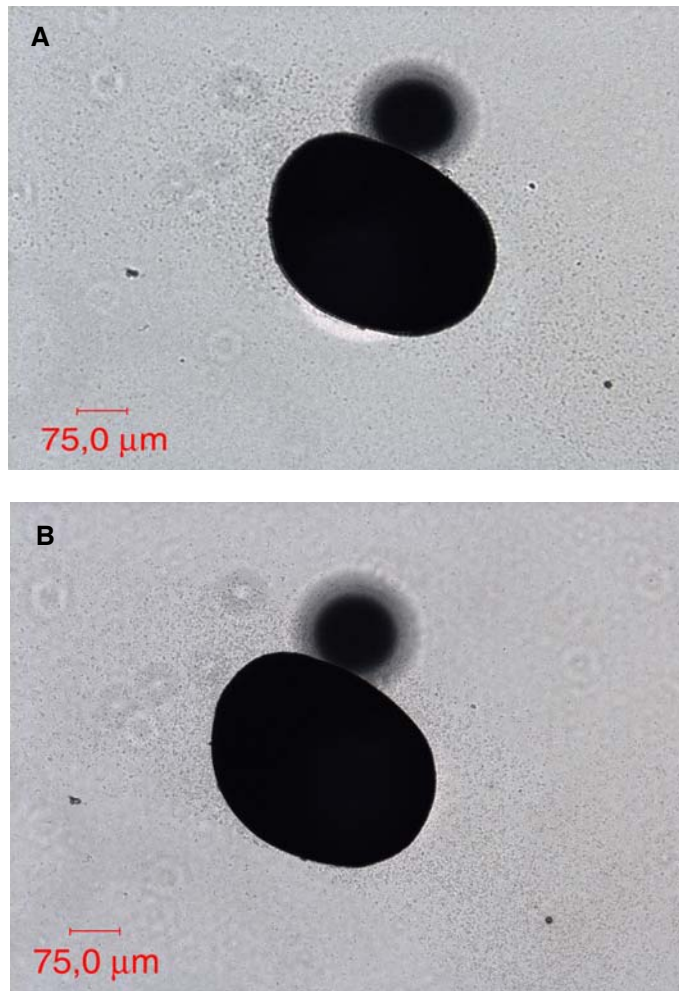


Figura IV.19 Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas putida* G7 a fuel pesado. **A**, 35 min. **B**, 95 min.

IV.2.2.2 Ensayos cuantitativos

Los ensayos se realizaron en sistemas bifásicos HMN-agua, en los que previamente se había establecido el equilibrio en el reparto de naftaleno entre ambas fases (figura IV.20). Como se puede observar a los dos días ya se alcanzó el equilibrio, y es a partir de este momento cuando se empezó el ensayo quimiotáctico.

La figura IV.21 indica que tras la inoculación, la densidad óptica en cada matraz fue disminuyendo con el tiempo, indicando esta disminución la respuesta quimiotáctica positiva de la estirpe (esto es, atracción hacia el NAPL). La figura IV.21 también indica que la completa desaparición de naftaleno (límite de detección_{naftaleno}: 0,14 $\mu\text{g/mL}$) en la fase acuosa tuvo lugar después de 15 minutos.

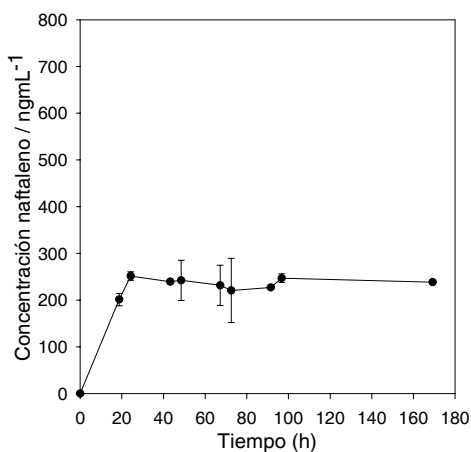


Figura IV.20 Seguimiento del reparto de naftaleno en el sistema HMN-agua

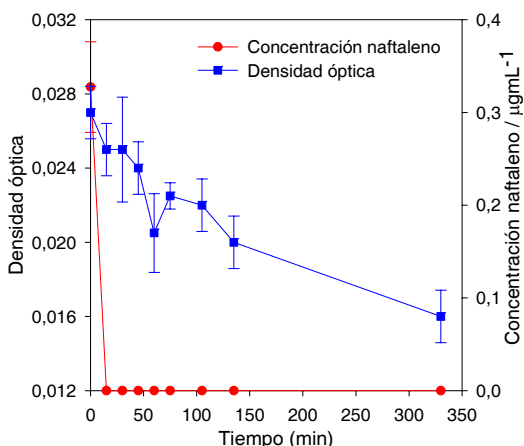


Figura IV.21 Ensayo quimiotáctico con *Pseudomonas putida* G7 frente a naftaleno en un sistema bifásico NAPL/agua

IV.3 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS

IV.3.1 ENSAYOS CON TRAZADOR (TIOUREA)

Aunque es poco común en las investigaciones de transporte bacteriano, este trazador se utiliza a menudo en cromatografía líquida debido a sus propiedades hidrofílicas y a la posibilidad de ser detectado mediante UV (Fesch, 1997). Al contrario que otros trazadores iónicos detectados por UV tales como NO_3^- , la tiourea neutra no sufre ningún intercambio iónico significativo o cualquier otro proceso de adsorción en nuestros sistemas. La realización de un experimento en columna con este trazador permitió confirmar la salida del frente después de bombear un volumen de poro, lo cual es esperable para cualquier soluto que no experimente ninguna interacción con el material de la columna (figura IV.22 A).

En algunos ensayos de transporte bacteriano se utilizaron cristales de HAPs en la zona superior de las columnas. Para determinar si la presencia de estos cristales tenía algún efecto sobre las características hidráulicas de la columna, se realizaron una serie de experimentos con tiourea, utilizando columnas de arena que contenían distintas concentraciones de naftaleno (12, 6, 3 y 1,2 mg de naftaleno/ 12 g de arena). La presencia de cristales de naftaleno no modificó significativamente la aparición del frente de tiourea (figura IV.22 B). No obstante, se observó que para las dos concentraciones más altas de naftaleno hubo una muy leve retención de tiourea (reflejada por valores de C/C_0 ligeramente inferiores).

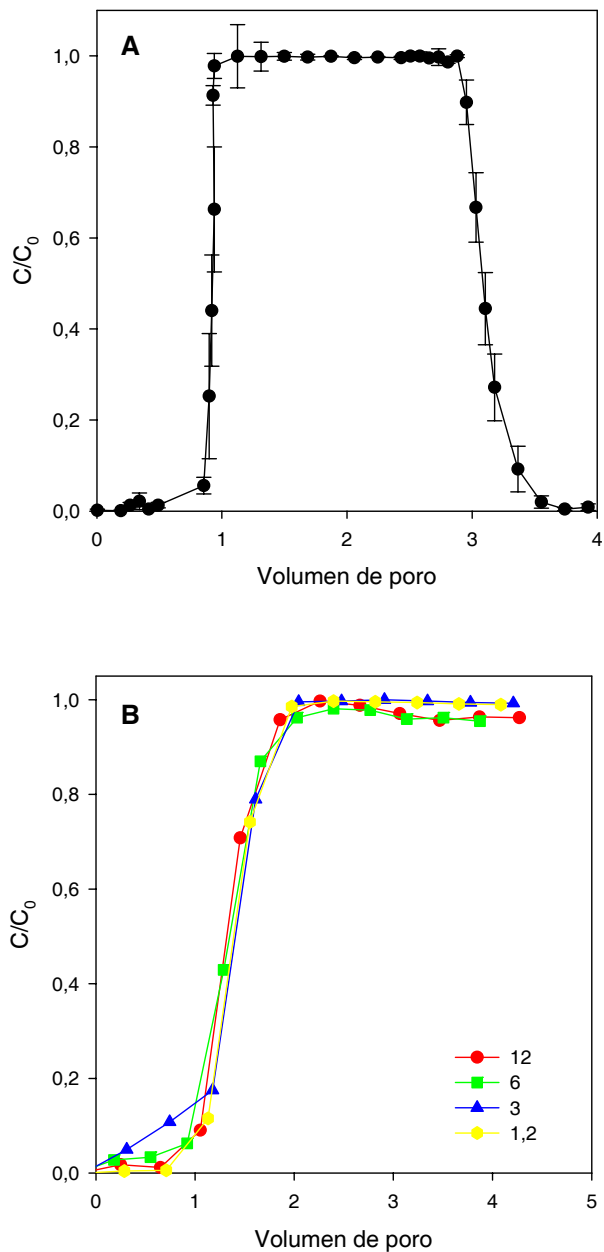


Figura IV.22 Experimento en columna con tiourea, sustancia trazador. **A**, arena. **B**, cuando la arena está contaminada con distintas cantidades de naftaleno (indicadas, en mg presentes en cada columna, al lado de los símbolos)

IV.3.2 INFLUENCIA DE HAPs

IV.3.2.1 Naftaleno

Este HAP, inicialmente presente en forma de cristales, promovió el transporte de *P. putida* G7 a través de columnas de arena saturadas (figura IV.23 A). El valor final de C/C_0 fue mayor que el control. Se observó que con las dos cantidades de naftaleno utilizadas el transporte bacteriano fue mayor que sin naftaleno, aunque no obstante, con la cantidad más baja fue mayor el transporte que con la cantidad más alta. Ello se puede deber a la intercepción directa de las células por parte de los cristales de naftaleno.

Se obtuvo el mismo resultado cuando el naftaleno estaba inicialmente disuelto en un líquido en fase no acuosa (NAPL), en este caso heptametilnonano (figura IV.23 B). Sin embargo, la presencia de esta fase orgánica causó en ambos casos (con y sin naftaleno) valores significativamente más bajos de C/C_0 que en presencia de cristales. Probablemente, esto fue debido a la mayor afinidad de las células por la fase orgánica y/o mayor superficie específica de la misma, en comparación a los cristales de naftaleno.

El naftaleno se aplicó en el interior de la columna y no se bombeó exteriormente por problemas de adsorción a los tubos. Se utilizaron 1,2 y 12 mg de HAP, en el caso de las columnas con naftaleno sólido, para garantizar la presencia de naftaleno en solución durante todo el ensayo. La duración total de cada ensayo fue 180 minutos (8 volúmenes de poro, 18 mL). Al cabo de ese tiempo se disolvieron teóricamente, de los 1,2 mg de naftaleno iniciales, 0,26 mg y de los 12 mg, 0,32 mg. Para este cálculo se tuvo en cuenta la concentración de naftaleno medida en el efluente de la columna tras el lavado de la columna durante 30 min (2,5 VP), previo al bombeo de la suspensión bacteriana: $12,84 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ (columnas con 12 mg de naftaleno), y $10,53 \pm 2,04 \mu\text{g/mL}$ (columnas con 1,2 mg de naftaleno).

Se llevaron a cabo medidas de la concentración de naftaleno en el efluente al finalizar el experimento para comprobar que seguía habiendo quimioatrayente en solución. Estas fueron, para las columnas con 12 mg de naftaleno, $15,85 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$, y para las columnas con 1,2 mg de naftaleno, $2,11 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$. Para el ensayo en el que el naftaleno estaba inicialmente disuelto en HMN no se detectó HAP en el efluente al finalizar el experimento (límite de detección: $0,14 \mu\text{g/mL}$). La mayor acumulación de bacterias en el ensayo con HMN es posiblemente la razón que haya dado lugar a la desaparición del naftaleno en el efluente.

Experimentalmente, se determinó la cantidad de naftaleno residual en la columna al finalizar el ensayo: $1,67 \pm 0,19 \text{ mg}$ (para las columnas con 12 mg de naftaleno) y $0,03 \pm 0,01 \text{ mg}$ (para las columnas con 1,2 mg de naftaleno). Del análisis de estos datos, se puede atribuir a biodegradación las diferencias encontradas entre lo experimental y el cálculo teórico previo de la cantidad de naftaleno que quedaría en la columna sin disolver tras finalizar el experimento. Es posible, por tanto, que la suspensión

bacteriana actuara *in situ* como sumidero adicional, acelerando, debido a su actividad degradadora, el proceso de disolución.

En el caso de la estirpe mutante deficiente en quimiotaxis, *P. putida* G7.C1 (pHG100), el naftaleno, inicialmente presente en forma de cristales, no promovió el transporte a través de columnas de arena saturadas (figura IV.24). Cabe destacar que el transporte de la estirpe silvestre y la mutante no quimiotáctica a través de arena fue muy parecido.

Se comprobó, al igual que en los experimentos con la estirpe silvestre, que hubo quimioatrayente en solución durante todo el ensayo mediante determinación de las concentraciones de naftaleno en el efluente antes y después del paso de la suspensión bacteriana. Estos valores de concentración de naftaleno fueron, para la cantidad inicial de HAP en la columna de 12 mg, $12,81 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$ y $13,99 \pm 1,68 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, y para 1,2 mg de naftaleno, $9,77 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ y $0,60 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$. Se comparó además la cantidad de naftaleno teórica que se disolvió a lo largo de todo el ensayo (0,32 mg para las columnas que inicialmente tenían 12 mg de naftaleno y 0,25 mg para las columnas con 1,2 mg de naftaleno) y la obtenida experimentalmente del análisis de la cantidad residual de HAP en la columna ($1,42 \pm 0,11$ mg para las columnas con 12 mg de naftaleno y $0,05 \pm 0,02$ mg para las columnas con 1,2 mg de naftaleno). Se concluye que, a pesar de que esta estirpe no es quimiotáctica, sí mantuvo intacta su capacidad degradadora de naftaleno durante el ensayo. Es posible que la menor concentración de naftaleno en el efluente de los experimentos a 1,2 mg de naftaleno sólido con la estirpe mutante en comparación a la silvestre se deba a la mayor acumulación de células de aquélla en las columnas durante los ensayos.

En la tabla IV.5 se resumen los principales datos de transporte a través de columnas de arena obtenidos para la estirpe *P. putida* G7 y su mutante no quimiotáctica *P. putida* G7.C1 (pHG100). Se observa que el transporte en ausencia de quimioatrayente fue igual en ambos casos, con valores de C/C_0 de aproximadamente 0,4. Esto no es sorprendente al constatar que ambas estirpes son muy parecidas en cuanto a las propiedades celulares (forma y tamaño celular, hidrofobicidad y carga-ta-ble IV.5). Sin embargo, en presencia de naftaleno, las diferencias en el transporte de estas dos estirpes fueron acusadas, siendo el valor de C/C_0 para la bacteria quimiotáctica el doble que para la bacteria no quimiotáctica. Estas diferencias se observan también en los valores de las eficiencias de adhesión relativas, α_t . Las eficiencias de adhesión relativas fueron calculadas usando los valores de C/C_0 . Al contrario que el valor de C/C_0 , que da una medida global del transporte celular, el cálculo de α_t tiene en cuenta diferentes frecuencias de contacto de la bacteria con el material de empaquetamiento de las columnas. Por tanto, α_t representa la afinidad relativa de la bacteria por el material de empaquetamiento. La afinidad de ambas estirpes por la arena en ausencia de naftaleno fue la misma, sin embargo en presencia de naftaleno, la afinidad de la estirpe quimiotáctica por la arena disminuyó de forma acusada.

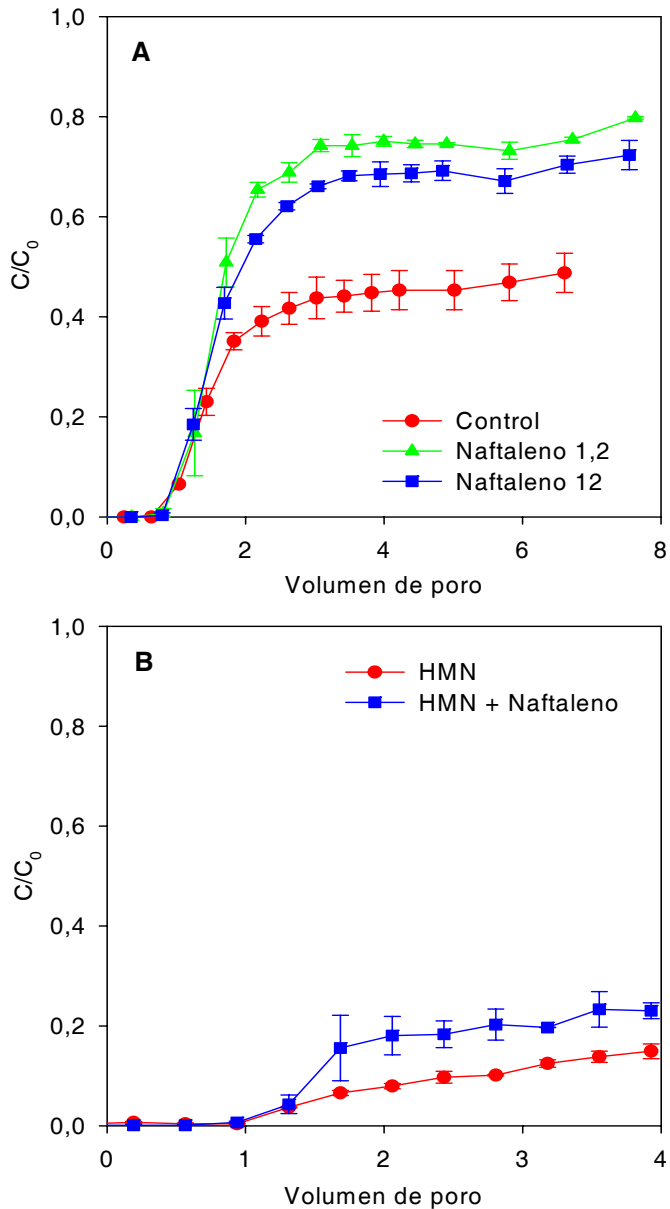


Figura IV.23 Efecto de naftaleno, aplicado en forma de cristales (**A**) o disuelto en un NAPL (**B**), sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena. En la figura IV.22 A se indica la cantidad de naftaleno (en mg) presente inicialmente en las columnas. La cantidad de naftaleno presente en HMN (figura IV.22 B) era 9,5 mg

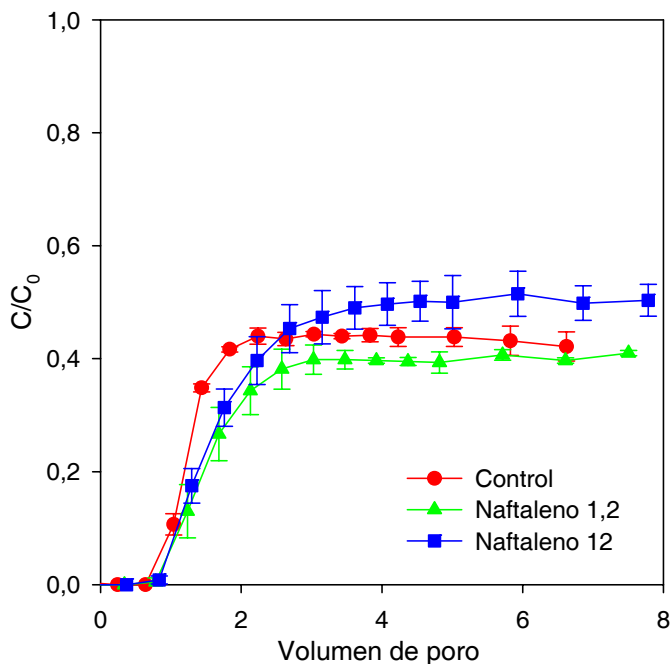


Figura IV.24 Efecto de naftaleno, aplicado en forma de cristales, sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) a través de columnas de arena. En la figura se indica la cantidad de naftaleno (en mg) presente inicialmente en las columnas

Tabla IV.5 Efecto de las características de bacterias degradadoras de naftaleno en el transporte a través de columnas de arena

Bacteria	Ancho célula (µm)	Longitud célula (µm)	Radio medio ^a	$\theta_w^{b,c}$ (°)	$\zeta^{c,d,h}$ (mV)	Transporte ^e			
						Quimioefector	C/C ₀	α_t^f	VP ^g
<i>Pseudomonas putida</i> G7	1,0	3,0	0,72	46 ± 4	-39 ± 2	Ninguno	0,39 (0,49)	0,158 (0,121)	1,83 (6,60)
						Naftaleno ⁱ	0,74 (0,80)	0,054 (0,041)	3,54 (7,63)
<i>Pseudomonas putida</i> G7.C1 (pHG100)	0,9	2,0	0,59	53 ± 3	-38 ± 2	Ninguno	0,42 (0,42)	0,132 (0,130)	1,84 (6,62)
						Naftaleno ⁱ	0,40 (0,41)	0,150 (0,145)	3,03 (7,50)

^a Radio medio: $R = 0.5 \cdot (l \cdot w^2)^{1/3}$. ^b θ_w , Ángulo de contacto. ^c Los valores se dan como la media ± desviación estándar. ^d ζ , Potencial Zeta. ^e Los valores experimentales finales se dan entre paréntesis como una indicación de las dinámicas de bloqueo del filtro. ^f α_t , Eficiencia de adhesión relativa. ^g VP, Volumen de poro. ^h Las determinaciones fueron llevadas a cabo a pH 7,2 en KNO₃. ⁱ Ensayos realizados con 1,2 mg de naftaleno sólido.

Con el objetivo de inhibir la movilidad y la capacidad quimiotáctica de la estirpe *Pseudomonas putida* G7, se realizó otro ensayo en el que la suspensión bacteriana se trató con frío (4°C) (figura IV.25).

Se observó que dicho tratamiento indujo un mayor transporte, en comparación a los experimentos realizados a temperatura ambiente (figura IV.23 A). Posiblemente esto se deba a que, aunque la suspensión bacteriana se mantuvo en frío durante todo el ensayo, las columnas permanecieron a temperatura ambiente. La diferencia de temperatura entre la fase móvil y el relleno de la columna pudo haber originado fenómenos de convección, modificando la afinidad de la bacteria por la arena. A pesar de este artefacto, la presencia de naftaleno sólido originó un ligero aumento en el transporte (figura IV.25), muy posiblemente debido a quimiotaxis. Es posible que el tratamiento en frío no inhibiera totalmente a esta estirpe, o que el paso de la suspensión a través de la columna originara un aumento de temperatura y una reactivación de las células.

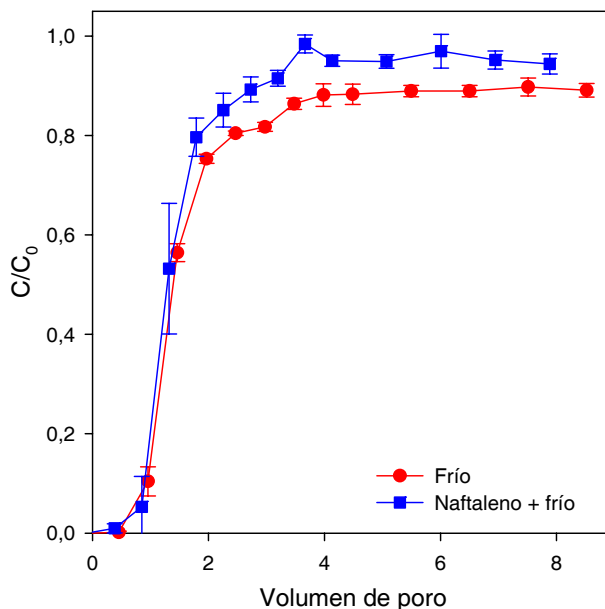


Figura IV.25 Efecto de naftaleno, aplicado en forma de cristales, sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 tratada con frío a través de columnas de arena

Se llevó a cabo otro ensayo con las dos estirpes, *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) cambiando, en este caso, la situación de la porción de columna que contenía naftaleno sólido. En todos los experimentos, el naftaleno estaba situado en la parte superior de las columnas (capítulo III, figura III.4), mientras que en este experimento el naftaleno se situó en la parte inferior.

Los resultados (figura IV.26) indicaron nuevamente un aumento del transporte de *Pseudomonas putida* G7 inducido por naftaleno, aunque más acusado que cuando se dispuso el naftaleno sólido en la zona superior de la columna (figura IV.23 A), alcanzando un valor de C/C_0 muy próximo a 1. También se observó una disminución del transporte de la estirpe mutante con respecto a la figura IV.24. Es posible que esta disposición hiciera que, durante el proceso de preparación de la columna previo al ensayo, que requiere el lavado durante 30 min a 90 rpm (2,5 VP) en sentido inverso al del flujo, se generara un gradiente dentro de la columna, que eventualmente hubiera sido beneficioso para el transporte de la estirpe quimiotáctica.

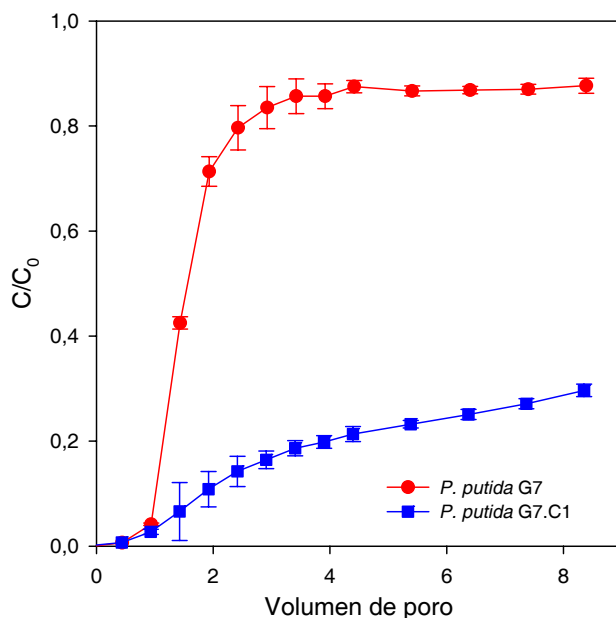


Figura IV.26 Efecto del naftaleno, aplicado en forma de cristales en la zona inferior de la columna, sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100)

También se llevaron a cabo ensayos de transporte con la bacteria *P. aeruginosa* 19SJ. Esta estirpe también modificó significativamente su transporte en presencia de naftaleno a través de columnas de arena saturadas (figura IV.27). En ausencia de naftaleno, se observaron procesos de bloqueo del filtro (aumento progresivo de los valores de C/C_0 después de la aparición del frente) debido al bloqueo de la superficie de la arena por las células adheridas, mientras que con naftaleno estos procesos no se observaron. Esto puede interpretarse, al igual que para *Pseudomonas putida* G7, en base a una mayor preferencia de las células a permanecer resuspendidas, debido a su actividad quimiotáctica.

Se comprobó mediante medidas de la concentración de naftaleno en el efluente, que durante todo el tiempo que duró el ensayo (180 min, 7 VP) hubo quimioatrayente

(naftaleno) en solución. Los valores de concentración de naftaleno en el efluente antes y después del paso de la suspensión bacteriana por la columna fueron $12,17 \pm 2,21$ y $6,65 \pm 3,22$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

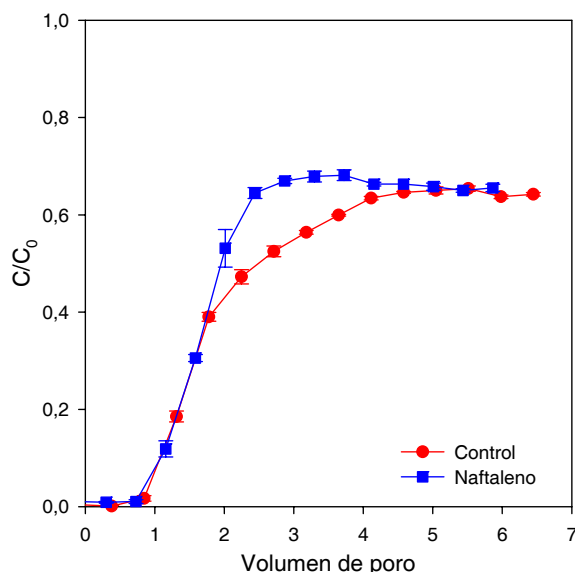


Figura IV.27 Efecto de naftaleno, aplicado en forma de cristales, sobre el transporte de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ a través de columnas de arena con y sin naftaleno sólido

IV.3.2.2 Fluoreno

El fluoreno hizo que se retrasase ligeramente la salida del frente de células de *Sphingomonas* sp. LB126 a través de columnas de arena saturadas (figura IV.28). Este HAP es treinta veces menos soluble que el naftaleno. Debido a esta baja solubilidad del fluoreno, es posible que se formara un gradiente de concentración a través de las columnas. Cabe destacar que no se detectó fluoreno en el efluente de la columna después del paso de la bacteria a través de la misma ($\text{LD}_{\text{fluoreno}}: 0,09$ $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Cuando se sonicó de forma suave durante cinco minutos la bacteria (figura IV.29), se retrasó aún más la aparición del frente bacteriano. La sonicación puede romper los flagelos de la bacteria y por tanto inhibir la atracción quimiotáctica. Se podrían explicar estos resultados como consecuencia de la compleja naturaleza de las interacciones físicas entre las células bacterianas y las fases sólidas: es posible que las bacterias inmóviles (es decir, sin flagelos) tiendan a estar más retenidas en la columna debido a un mejor contacto con las superficies sólidas.

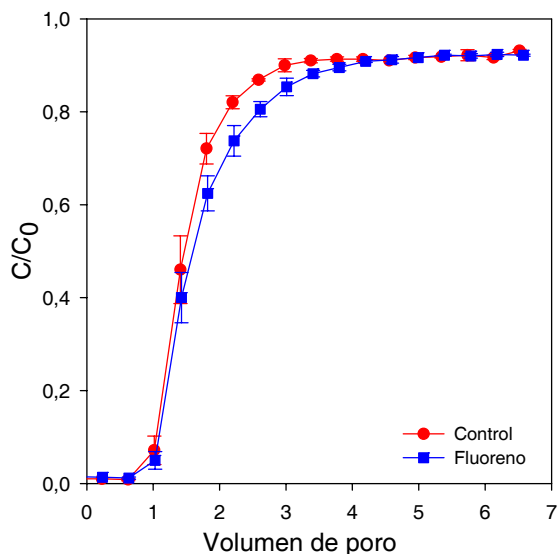


Figura IV.28 Efecto de fluoreno, aplicado en forma de cristales, sobre el transporte de *Spingomonas sp. LB126* a través de columnas de arena

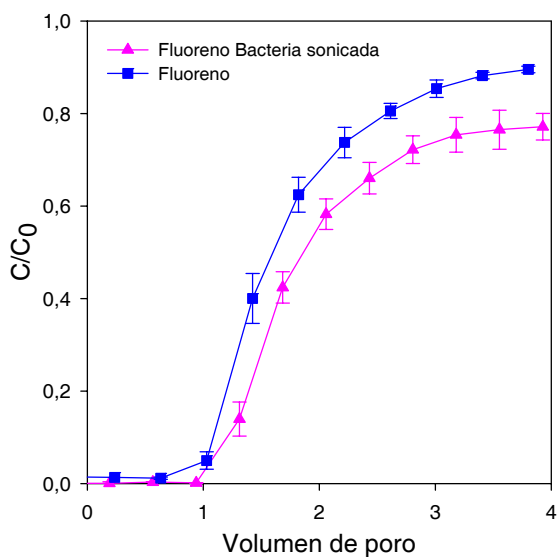


Figura IV.29 Efecto de fluoreno, aplicado en forma de cristales, sobre el transporte de *Spingomonas sp. LB126*, tras ser sometida a sonicación, a través de columnas de arena

IV.3.2.3 Fenantreno

En el caso de fenantreno y con la estirpe quimiotáctica *P. aeruginosa* 19SJ, ocurrió algo análogo a lo que ocurría con *Sphingomonas* sp. LB126 y fluoreno. Este HAP es aproximadamente treinta veces menos soluble que el naftaleno. Probablemente, esto hizo que se retrasase ligeramente el frente de bacterias quimiotácticas a través de las columnas de arena saturadas (figura IV.30) debido a la formación de un gradiente de concentración de fenantreno a través de las mismas. Antes de comenzar el experimento la concentración de fenantreno en el efluente de la columna fue $0,74 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, al finalizar el ensayo y tras el paso de la suspensión bacteriana por la columna no se detectó fenantreno en el efluente ($\text{LD}_{\text{fenantreno}}$: $0,09 \mu\text{g/mL}$).

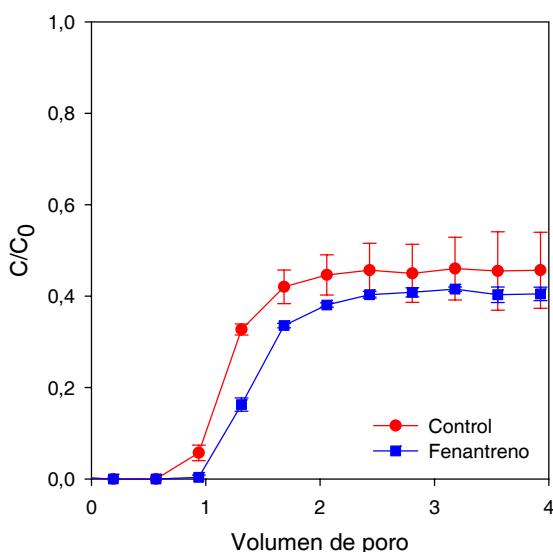


Figura IV.30 Efecto de fenantreno, aplicado en forma de cristales, sobre el transporte de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ a través de columnas de arena

IV.3.3 INFLUENCIA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

A partir de este momento la mayor parte de los experimentos de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo con la estirpe *P. putida* G7. Las razones de haber seleccionado esta estirpe fueron principalmente su rápido crecimiento y su mayor movilidad y más activa capacidad quimiotáctica en comparación a las otras estirpes.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte en presencia de distintos ácidos orgánicos con el objetivo de investigar si éstos favorecían el transporte, lo inhibían, o por el contrario no había efecto. Los ácidos orgánicos seleccionados fueron acetato, fumarato, salicilato y succinato, todos ellos en forma de sal sódica. En estos ensayos, la mayor solubilidad de los ácidos orgánicos en agua (frente a los HAPs) y la menor

interacción con los materiales del sistema (tubos) permitieron introducir estos quimioefectores disueltos en la suspensión bacteriana, a unas concentraciones muy superiores a las que permitían los HAPs en los ensayos ya descritos. En solución, al pH en el que se llevaron a cabo los experimentos (pH=5,7), estos ácidos orgánicos se encontraban mayoritariamente en su forma aniónica.

En la figura IV.31, se representa en forma comparativa, los resultados para cada quimioefector, a una concentración de 10 mM. Se observa que prácticamente todos aumentaron el transporte de la estirpe en mayor o menor proporción, salvo el succinato, que inhibió el transporte bacteriano.

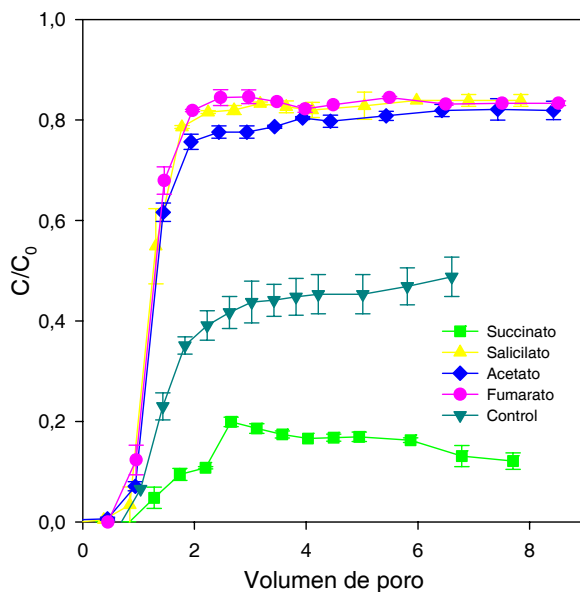


Figura IV.31 Efecto de distintos ácidos orgánicos (10 mM) sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena

En la tabla IV.6 se recogen los valores de C/C_0 para cada tratamiento y el cálculo de la eficiencia de adhesión (α_t) obtenida a partir de los valores de C/C_0 . Se incluyen, a efectos comparativos, los resultados obtenidos para los ángulos de contacto y el potencial zeta de la bacteria, con cada tratamiento, según se describió en la sección IV.1.1. En conjunto, estos resultados indican que el efecto promotor del transporte de estos ácidos orgánicos no se debe a ningún cambio en la superficie celular del organismo (que implique cambio en la hidrofobicidad o carga de la célula). Se concluye por tanto que la actividad quimiotáctica puede modificar muy significativamente la afinidad de la bacteria por el medio poroso. El efecto inhibitor del transporte causado por succinato será tratado más adelante.

Tabla IV.6 Influencia de ácidos orgánicos (10 mM) en el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena

Quimioefector	$\theta_w^{a,b}$ (°)	$\zeta^{b,c,d}$ (mV)	Arena ^e		
			C/C ₀	α_t^f	VP ^g
Ninguno	46 ± 4	-39 ± 2	0,39 (0,49)	0,158 (0,121)	1,83 (6,60)
Acetato	35 ± 3	-37 ± 2	0,61 (0,79)	0,097 (0,045)	1,43 (8,40)
Fumarato	34 ± 2	-36 ± 2	0,82 (0,83)	0,039 (0,036)	1,96 (8,51)
Salicilato	36 ± 2	-36 ± 2	0,83 (0,84)	0,033 (0,033)	1,80 (7,91)
Succinato	36 ± 3	-31 ± 2	0,20 (0,12)	0,297 (0,388)	2,66 (7,70)

^a θ_w , Ángulo de contacto. ^b Los valores son dados como la media ± desviación estándar. ^c ζ , Potential Zeta. ^d Las determinaciones fueron llevadas a cabo a pH 7.2 en KNO₃. ^e Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación de las dinámicas de bloqueo del filtro. ^f α_t , Eficiencia de adhesión. ^g VP, Volumen de poro. ^h Experimentos de transporte llevados a cabo en soluciones de Brij 35.

IV.3.3.1 Acetato

Una vez determinada en forma comparativa la influencia de distintos ácidos orgánicos, se realizó una serie de experimentos para ver su efecto a distintas concentraciones, así como en presencia de cristales de naftaleno (1,2 mg). El primero de ellos, acetato, se probó a dos concentraciones distintas, 10 mM y 24 mM (figura IV.32). A ambas concentraciones este quimioefector (quimioatrayente – figura IV.10 - y fuente de carbono y energía- figura IV.2 – para esta estirpe) promovió sin diferencias significativas, el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena. No se observó además diferencia en el transporte entre las columnas con y sin naftaleno para la concentración más alta ensayada, 24 mM.

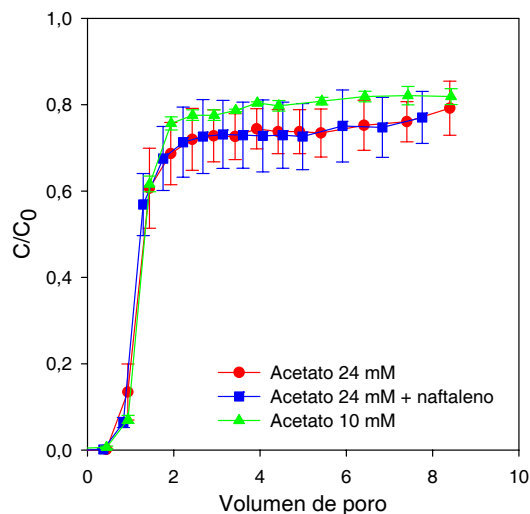


Figura IV.32 Efecto de acetato sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena

IV.3.3.2 Fumarato

El fumarato se utilizó a una concentración de 10 mM con y sin naftaleno sólido (1,2 mg) (figura IV.33).

A diferencia de lo observado con acetato, se observaron diferencias en el transporte entre las columnas con y sin naftaleno. Esto también se ve reflejado en los valores de la eficiencia de adhesión calculados a partir de las curvas de rotura. La comparación de los valores de α_t iniciales para la curva de las columnas con fumarato y naftaleno, $\alpha_t = 0,104$ (VP = 1,53; $C/C_0 = 0,55$) y los obtenidos para la curva de las columnas de arena con fumarato (tabla IV.6), pone de manifiesto que la presencia conjunta de fumarato y naftaleno provocó una alteración en las dinámicas de bloqueo del filtro debido muy posiblemente al papel específico del fumarato como factor de cambio de la quimiotaxis.

Las medidas de concentración de naftaleno en el efluente, antes y después del paso de la suspensión bacteriana por la columna ($10,55 \pm 1,93 \mu\text{g/mL}$ y $2,98 \pm 0,84 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) indicaron que el naftaleno estuvo presente en solución junto con el fumarato durante todo el ensayo.

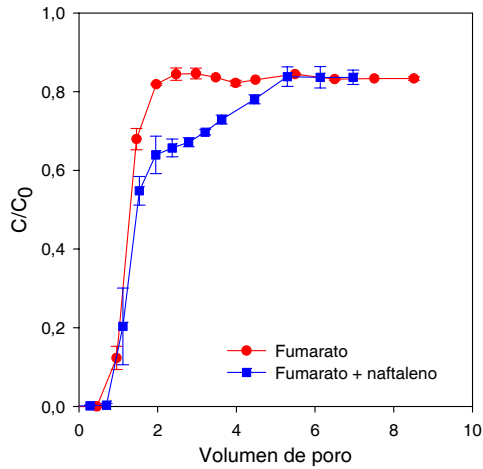


Figura IV.33 Efecto de fumarato (10 mM) sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena. Las columnas con naftaleno contenían 1,2 mg de HAP

IV.3.3.3 Salicilato

El salicilato, al igual que todos los quimioefectores utilizados anteriormente, es un quimioatrayente y fuente de carbono y energía para nuestra estirpe. Se utilizó a una concentración de 5 mM y junto con el fumarato fueron los dos ácidos orgánicos ensayados que más promovieron el transporte de *Pseudomonas putida* G7 (figura IV.34). En el caso del salicilato no se observó diferencia en el transporte entre columnas con y sin naftaleno, al igual que ocurría con el acetato.

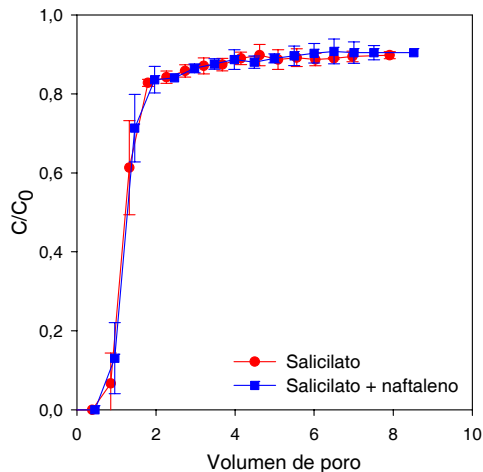


Figura IV.34 Efecto de salicilato (5 mM) sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena. Las columnas con naftaleno contenían 1,2 mg de HAP

IV.3.3.4 Succinato

Hasta ahora, se observó que los ácidos orgánicos, en general, promovían el transporte bacteriano. Sin embargo, el succinato lo inhibió tanto en ausencia como en presencia de naftaleno sólido (figura IV.35). El succinato es un quimioatrayente muy potente y fuente de carbono y energía para *P. putida* G7. Esta estirpe es muy móvil cuando crece con este substrato. No obstante, como se ha explicado anteriormente, cuando la bacteria creció con salicilato y fue resuspendida en una solución de succinato (10 mM) en medio de mineralización, perdió su movilidad casi totalmente durante 5 horas. El periodo que duró el ensayo fue de 3 horas.

A pesar de la pérdida de movilidad en presencia de succinato, los valores de la cantidad teórica de naftaleno residual en la columna (0,95 mg) y los obtenidos experimentalmente ($0,01 \pm 0,00$ mg), confirman que la bacteria mantuvo su capacidad degradadora de naftaleno en presencia de succinato.

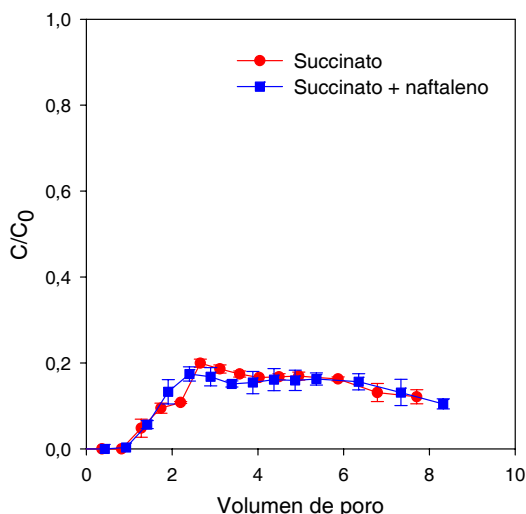


Figura IV.35 Efecto del succinato sódico (10 mM) en el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena. Las columnas con naftaleno contenían 1,2 mg de compuesto

Este proceso de inhibición del transporte causado por el succinato fue, sin embargo, reversible. Transcurridos 60 (figura IV.36 A) y 120 minutos (figura IV.36 B) del experimento recogido en la figura IV.35, se dejó de bombear la suspensión bacteriana con succinato, y se sustituyó por medio de mineralización; al cabo de dos volúmenes de poro (aproximadamente 40 minutos), se observó la aparición de un frente bacteriano. Esto indica que al menos parte de las bacterias recuperaron su movilidad y atravesaron la columna.

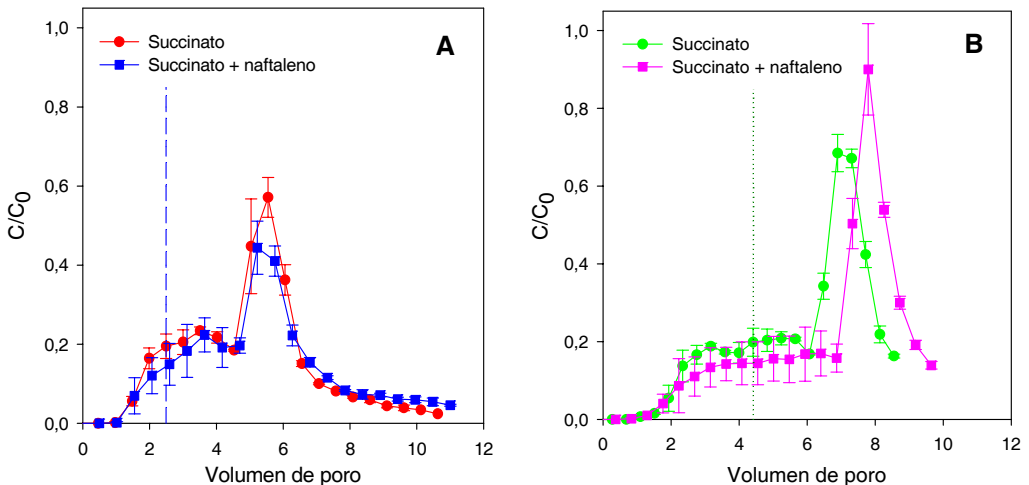


Figura IV.36 Efecto de la sustitución de la suspensión celular con succinato (10 mM) por medio de mineralización (indicada por las líneas de puntos) sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena. **A**, sustitución a los 60 minutos de comenzar el experimento. **B**, sustitución a los 120 minutos de comenzar el experimento

Se llevó a cabo un último ensayo de transporte con otro compuesto, la glucosa (10 mM). Este azúcar es una fuente de carbono y energía para *Pseudomonas putida* G7 (figura IV.2), y al igual que la mayoría de los compuestos que se encuentran en los exudados, la glucosa promovió el transporte bacteriano (resultados no mostrados).

IV.3.4 INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA

Se llevó a cabo un ensayo utilizando NaCl 10 mM, y distintas concentraciones del quimioatrayente salicilato (0,1, 0,5, 1, 5 y 10 mM), con el objeto de comprobar si la fuerza iónica (o el aumento de la concentración de sodio) podía alterar el transporte. El salicilato a estas cuatro concentraciones promovió el transporte bacteriano (figura IV.37), sin embargo, sin diferencias significativas entre los distintos tratamientos (véase control en figura IV.23 A y tabla IV.5). El NaCl también promovió el transporte bacteriano aunque en bastante menor proporción que el salicilato o cualquier otro quimioatrayente estudiados en esta Tesis Doctoral. La teoría DVLO predice que a una mayor fuerza iónica disminuye el espesor de la doble capa eléctrica y la repulsión electrostática, lo que se traduce en un menor transporte bacteriano. Sin embargo, en presencia de salicilato o NaCl, lo expuesto en esta teoría no se cumple. En la tabla IV.7 se recogen los valores de C/C_0 para NaCl y cada concentración de salicilato (y fuerza iónica). El valor de la fuerza iónica en ausencia de quimioefectores, es decir, la del medio de mineralización es 7,7 mM. Se concluye, por tanto, que ni el cambio en la fuerza iónica ni la concentración de sodio puede explicar el aumento del transporte observado en presencia de los ácidos orgánicos.

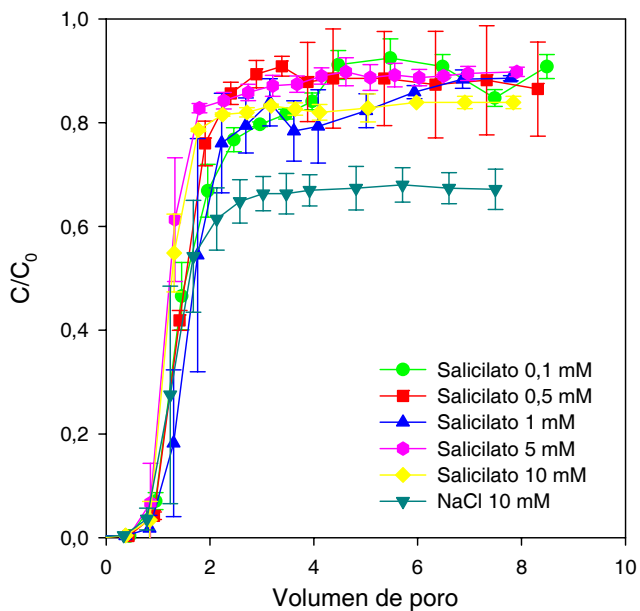


Figura IV.37 Efecto de salicilato a distintas concentraciones en el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena

Tabla IV.7 Comparación del efecto del salicilato a distintas concentraciones y distintas fuerzas iónicas sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena

	Salicilato 0,1 mM	Salicilato 0,5 mM	Salicilato 1 mM	Salicilato 5 mM	Salicilato 10 mM	NaCl 10 mM
Fuerza iónica (mM)	7,8	8,2	8,7	12,7	17,7	17,7
Volumen de poro ^a	2,46 (8,49)	2,40 (8,31)	2,23 (7,79)	1,80 (7,91)	1,78 (7,84)	2,13 (7,50)
C/C_0 ^a	0,77 (0,91)	0,86 (0,86)	0,76 (0,89)	0,83 (0,90)	0,79 (0,84)	0,61 (0,67)

^a Los valores experimentales finales están dados en paréntesis como una indicación de las dinámicas de bloqueo del filtro

IV.3.5 INFLUENCIA DE TENSIOSACTIVOS: BRIJ 35

IV.3.5.1 Determinación de la concentración crítica micelar

Uno de los parámetros más importantes en la caracterización de un agente tensioactivo es el valor de su concentración crítica micelar (CMC). Esta concentración se define como aquella a partir de la cual el valor de la tensión superficial de la solución acuosa no varía al aumentar la concentración del tensioactivo. En solución acuosa, la presencia del tensioactivo a una concentración superior a su CMC, asegura la presencia de fases micelares que incrementan la pseudo-solubilización de compuestos orgánicos apolares, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. La CMC del tensioactivo no iónico empleado en este estudio se determinó según se describe en el capítulo de materiales y metodología, obteniéndose los resultados que aparecen en la figura IV.38. Los valores para la CMC así obtenidos, tanto en agua destilada como en el medio de cultivo, medio de mineralización (MM), están recogidos en la tabla IV.8. La tabla también incluye otros parámetros relevantes, tomados de la literatura (García et al., 2001; Laha y Luthy, 1992).

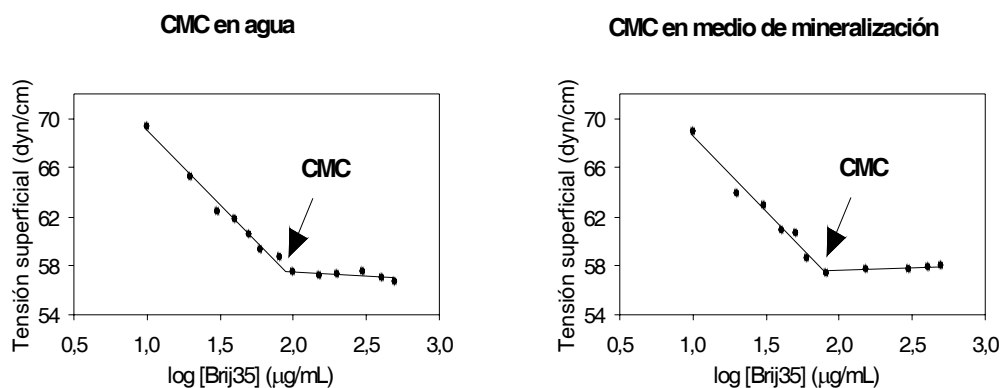


Figura IV.38 Cálculo de la CMC del tensioactivo empleado tanto en fase acuosa, como en medio de mineralización

Tabla IV.8 Propiedades del tensioactivo utilizado, Brij 35

Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	HLB ^a	Número de agregación	Densidad de sorción (mg/g)	CMC en agua (µg/mL)	CMC en MM (µg/mL)
C ₁₂ H ₂₅ (OC ₂ H ₄) ₂₃ OH	1198	16,9	53	3,5	89,3	77,7

^aBalance hidrofílico-hidrofóbico

IV.3.5.2 Transporte en presencia de Brij 35

Se llevó a cabo un experimento de transporte con la estirpe *P. putida* G7 resuspendida en una solución de Brij 35. Se utilizaron dos concentraciones de este tensioactivo, por encima ($250 \mu\text{g/mL}$) y por debajo ($50 \mu\text{g/mL}$) de su concentración crítica micelar. En ambos casos (figura IV.39), el tensioactivo promovió el transporte bacteriano, en comparación a los ensayos sin tensioactivo (figura IV.23 A, control), alcanzando un valor de C/C_0 muy próximo a 1. No se observaron diferencias en el transporte en presencia de naftaleno sólido.

En la tabla IV.9 se recogen los valores de C/C_0 y el cálculo de la eficiencia de adhesión obtenida a partir de los valores de C/C_0 para el tratamiento con Brij 35 cuando éste se encuentra en solución a una concentración por encima de su concentración crítica micelar. Se incluyen, a efectos comparativos, los resultados obtenidos para los ángulos de contacto y el potencial zeta de la bacteria con este tratamiento. En conjunto, estos resultados indican que el efecto promotor del transporte de este tensioactivo no se debe a ningún cambio en la superficie del organismo, que implique cambio en la hidrofobicidad o carga celular. A pesar de la presencia de naftaleno en el efluente de la columna tras el paso de la bacteria por la misma ($2,72 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$), los resultados obtenidos no se deben tampoco a quimiotaxis puesto que el transporte a través de las columnas con y sin naftaleno es el mismo. Aunque, como se vio anteriormente (figura IV.13 - sección IV.2.1.2.2), en presencia de Brij 35 el naftaleno actúa como quimiorrepelente. Es muy probable que el aumento del transporte en presencia de Brij 35 se deba a las complejas interacciones tensioactivo-matriz sólida.

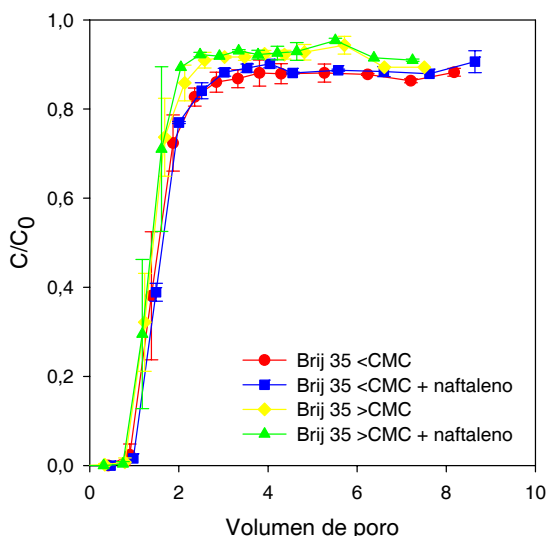


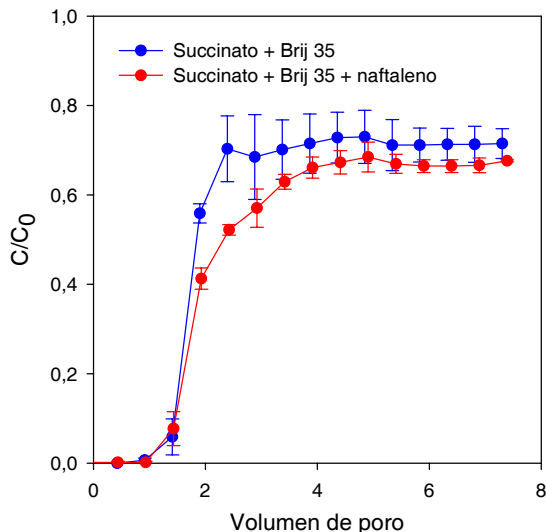
Figura IV.39 Efecto del tensioactivo no iónico Brij 35 sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena. Las columnas con naftaleno contenían 1,2 mg de compuesto

Tabla IV.9 Transporte de *Pseudomonas putida* G7 en presencia del tensioactivo Brij 35 (>CMC) través de columnas de arena

Quimioefector	$\theta_w^{a,b}$ (deg)	$\zeta^{b,c,d}$ (mV)	Arena ^e		
			C/C ₀	α_t^f	VP ^g
Ninguno (en Brij 35)	45 ± 6	-36 ± 2	0,91 (0,89)	0,018 (0,022)	2,58 (7,51)
Naftaleno (en Brij 35)	48 ± 6	-36 ± 2	0,92 (0,91)	0,014 (0,016)	2,48 (7,24)

^a θ_w , Ángulo de contacto. ^b Los valores son dados como la media ± desviación estándar. ^c ζ , Potencial Zeta. ^d Las determinaciones fueron llevadas a cabo a pH 7.2 en KNO₃. ^e Los valores experimentales finales están dados entre paréntesis como una indicación de las dinámicas de bloqueo del filtro. ^f α_t , Eficiencia de adhesión. ^g VP, Volumen de poro.

En otro experimento se intentó aunar las propiedades del Brij 35 como promotor del transporte bacteriano y del succinato como inhibidor del mismo. Se resuspendió la bacteria en una solución de succinato (10 mM) y Brij 35 (250 µg/mL). En la figura IV.40 se observa que predominó el efecto del Brij 35, puesto que se alcanzó un valor de C/C₀ próximo a 0,7, aunque en menor proporción que cuando se resuspendió sólo en el tensioactivo. Se apreció una ligera diferencia en el transporte de la estirpe cuando en la columna había solamente arena o cuando había arena contaminada con naftaleno. En este segundo caso el transporte fue ligeramente menor, poniendo de manifiesto la presencia de succinato como inhibidor de la movilidad bacteriana.

**Figura IV.40** Efecto del tensioactivo no iónico Brij 35 junto con succinato sódico en el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de arena

IV.3.6 INFLUENCIA DEL SUBSTRATO

Hasta ahora se han descrito resultados de transporte bacteriano a través de arena, un material con una baja capacidad de adsorción de los quimioatrayentes ensayados. Con el objeto de investigar el posible efecto de la adsorción, se utilizaron como relleno de las columnas dos nuevos materiales representativos que, *a priori*, podrían interaccionar con los quimioatrayentes. Por una parte, se utilizó agregados arcillosos artificiales, fabricados a partir de montmorillonita, PVA y bolas de cristal, para simular superficies arcillosas, que tienen una gran capacidad para adsorber sobre todo compuestos iónicos. Por otra, se utilizó un suelo forestal, de textura arenosa, y con un relativamente alto contenido en materia orgánica, típicamente activa en procesos de adsorción de compuestos hidrófobos, y también capaz de adsorber compuestos iónicos.

En la figura IV.41 se representan resultados de transporte bacteriano típicos obtenidos para ambos substratos. El naftaleno, inicialmente presente en forma de cristales (1,2 mg), promovió el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de agregados de arcilla (figura IV.41 A). Este mismo efecto fue el que se observó también con la arena como substrato. Se comprobó que durante todo el ensayo hubo naftaleno en solución. Para ello se determinó la concentración de naftaleno en el efluente antes y después del paso de la suspensión bacteriana por la columna ($5,62 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ y $0,16 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Este efecto promotor del naftaleno sobre el transporte, evidente con arena y agregados arcillosos, fue casi inexistente en suelo forestal (figura IV.41 B). La presencia de materia orgánica en el suelo forestal, posiblemente, causó la adsorción del naftaleno y una importante disminución de la concentración de este HAP en solución. De hecho, en estas experiencias no se detectó naftaleno ($\text{LD}_{\text{Naftaleno}}: 0,14 \mu\text{g/mL}$) a la salida de la columna, ni antes ni después del paso de la suspensión bacteriana a través de la misma. Esto permite interpretar el hecho de que a través del suelo el transporte bacteriano no se viera favorecido con la presencia de este quimioefector (figura IV.41 B), como ocurría con otros substratos.

Se midió también la concentración de naftaleno residual en la columna extrayendo el suelo y los agregados de arcilla tras las experiencias. Los valores fueron $0,13 \pm 0,02 \text{ mg}$ y $0,03 \pm 0,00 \text{ mg}$, respectivamente. Cabe destacar que el valor de concentración de naftaleno residual en suelo forestal fue un orden de magnitud más alto que el determinado en arena y agregados de arcilla, lo que vuelve a poner de manifiesto la posible adsorción del naftaleno a la materia orgánica del suelo.

En la tabla IV.10, se recogen de forma comparativa los valores de C/C_0 para los distintos tratamientos y substratos, así como el cálculo de la eficiencia de adhesión obtenida a partir de los valores de C/C_0 . La tabla también recoge los resultados de transporte a través de arcilla y suelo con salicilato, a través de arcilla en presencia de Brij 35 y a través de suelo en presencia de succinato. En ausencia de quimioefectores la bacteria se transportó más en suelo, alcanzando un C/C_0 final de 0,66, siendo la arcilla el substrato que más retuvo la bacteria. Esta mayor o menor afinidad por las distintas matrices también se puede observar en los valores de las eficiencias de

adhesión (α_t). Los valores de los ángulos de contacto y carga celular superficial nos indican que los efectos de promoción o inhibición del transporte bacteriano a través de estos sustratos no se debió a ningún cambio en la superficie celular del organismo.

A diferencia de lo que ocurrió con arena, el salicilato (10 mM) no produjo ningún efecto sobre el transporte bacteriano a través de agregados de arcilla (figura IV.41 A). Posiblemente esto fue debido a que el salicilato se encuentra en solución como forma aniónica y tiende a adsorberse a las superficies de la arcilla. Asimismo, en las columnas con suelo, el salicilato tuvo un efecto inhibitorio sobre el transporte (figura IV.41 B).

El efecto del succinato (10 mM) sobre el transporte a través de suelo fue el mismo que se observó anteriormente en las columnas con arena (tabla IV.10). Cuando se resuspendió la bacteria en succinato perdió su movilidad y por tanto, su capacidad quimiotáctica, tendiendo a quedarse retenida en la columna e inhibiendo de esta forma su transporte. El efecto inhibitorio fue incluso mayor que con arena, como se refleja en el alto valor de α_t .

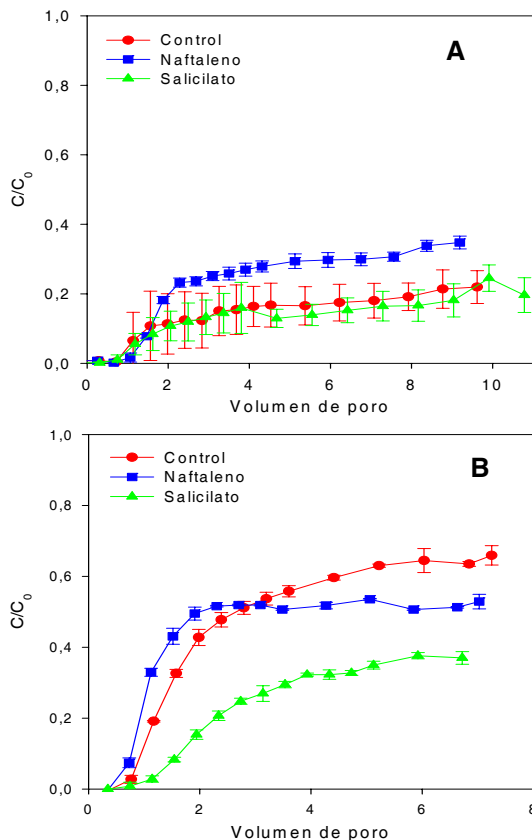


Figura IV.41 Efecto de distintos quimioefectores sobre el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas de agregados de arcilla (A) y de suelo forestal (B)

Tabla IV. 10 Influencia de quimioefectores en el transporte de *Pseudomonas putida* G7 a través de columnas saturadas conteniendo arena, arcilla y suelo

Quimioefector	$\theta_w^{a,b}$		$\zeta^{b,c,d}$		Arena ^e			Arcilla ^e			Suelo ^e			
	(deg)	(mV)	C/C ₀	α_t^f	VP	C/C ₀	α_t^f	VP ^g	C/C ₀	α_t^f	VP ^g	C/C ₀	α_t^f	VP ^g
Ninguno	46 ± 4	-39 ± 2	0,39 (0,49)	0,158 (0,121)	1,83 (6,60)	0,11 (0,22)	1,954 (1,362)	1,56 (9,62)	0,43 (0,66)	1,098 (0,659)	1,98 (7,25)			
Naftaleno	33 ± 3	-35 ± 2	0,74 (0,80)	0,055 (0,041)	3,54 (7,63)	0,23 (0,35)	1,274 (0,922)	2,28 (9,19)	0,50 (0,53)	1,04 (0,529)	1,91 (7,02)			
Salicilato	36 ± 2	-36 ± 2	0,83 (0,84)	0,033 (0,033)	1,80 (7,91)	0,16 (0,20)	1,832 (1,624)	3,80 (10,78)	0,32 (0,37)	1,660 (1,436)	3,93 (6,72)			
Succinato	36 ± 3	-31 ± 2	0,20 (0,12)	0,297 (0,388)	2,66 (7,70)	ND ^h	ND ^h	ND ^h	0,10 (0,11)	3,139 (3,139)	3,56 (6,77)			
Ninguno ⁱ (en Brij 35)	45 ± 6	-36 ± 2	0,91 (0,89)	0,018 (0,022)	2,48 (7,24)	0,30 (0,44)	1,188 (0,841)	2,50 (8,61)	ND ^h	ND ^h	ND ^h			

^a θ_w , Ángulo de contacto. ^b Los valores se dan como la media ± desviación estándar. ^c ζ , Potencial Zeta. ^d Las determinaciones se realizaron a pH 7.2 en KNO₃. ^e Los valores experimentales finales se dan entre paréntesis como una indicación de las dinámicas de bloqueo del filtro. ^f α_t , Eficiencia de adhesión. ^g VP, Volumen de poro. ^h ND, No determinado. ⁱ Experimentos de transporte llevados a cabo en soluciones de Brij 35.

IV.4 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN LA BIODEGRADACIÓN DE NAFTALENO EN MEDIOS POROSOS SATURADOS

El estudio de la influencia de la quimiotaxis sobre la biodegradación de naftaleno se llevó a cabo en las mismas condiciones de saturación que las utilizadas en los experimentos de transporte. Para ello se siguió la mineralización de naftaleno marcado con ^{14}C . Se llevaron a cabo experimentos comparando la estirpe quimiotáctica, *Pseudomonas putida* G7, y su mutante no quimiotáctica, *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100), con el objeto de investigar si la quimiotaxis podía aumentar la biodisponibilidad y, consecuentemente, la biodegradación de naftaleno en materiales porosos saturados. Estos ensayos se llevaron a cabo en matraces biométricos que contenían lechos de arena y agregados de arcilla, mantenidos en condiciones estáticas, o, en el caso de los controles, en fase acuosa bajo agitación constante. El naftaleno se añadió en forma de cristales o disuelto en líquidos en fase no acuosa (heptametilnonano -HMN- y fuel pesado). Las curvas de mineralización obtenidas, que representan el porcentaje acumulativo de ^{14}C -naftaleno mineralizado frente al tiempo, aparecen en las figuras IV.42-IV.44. La tabla IV.11 compara los valores para las velocidades y porcentajes máximos de mineralización en todos los ensayos.

En la figura IV.42 y tabla IV.11 se observa que no existieron diferencias significativas en la tasa máxima de mineralización entre las dos estirpes cuando el naftaleno estaba inicialmente en forma sólida, tanto en suspensiones acuosas bajo agitación constante, como en lechos saturados de arena y arcilla. Esto indica que la estirpe mutante, inhabilitada para quimiotaxis, posee una capacidad degradadora comparable a la estirpe quimiotáctica. Por tanto, las diferencias que se observaran en ensayos posteriores de mineralización, diseñados para limitar la biodisponibilidad del compuesto, no serían atribuibles a limitaciones fisiológicas debidas a la manipulación genética a la que ha sido sometida la bacteria *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100).

En las figuras IV.43 y IV.44 y tabla IV.11 se observan diferencias en las tasas de mineralización entre ambas estirpes, cuando el naftaleno está inicialmente en HMN y fuel pesado. La estirpe quimiotáctica mineralizó significativamente más que la no quimiotáctica, tanto en fase acuosa en agitación, como en arena o arcilla en más de la mitad de los tratamientos. Se puede observar, por tanto, que en condiciones de baja biodisponibilidad, causadas por la presencia de un NAPL, que indujo en ambas estirpes una significativamente menor tasa de mineralización (tabla IV.11), la estirpe quimiotáctica mineralizó el compuesto más rápidamente que la estirpe no quimiotáctica.

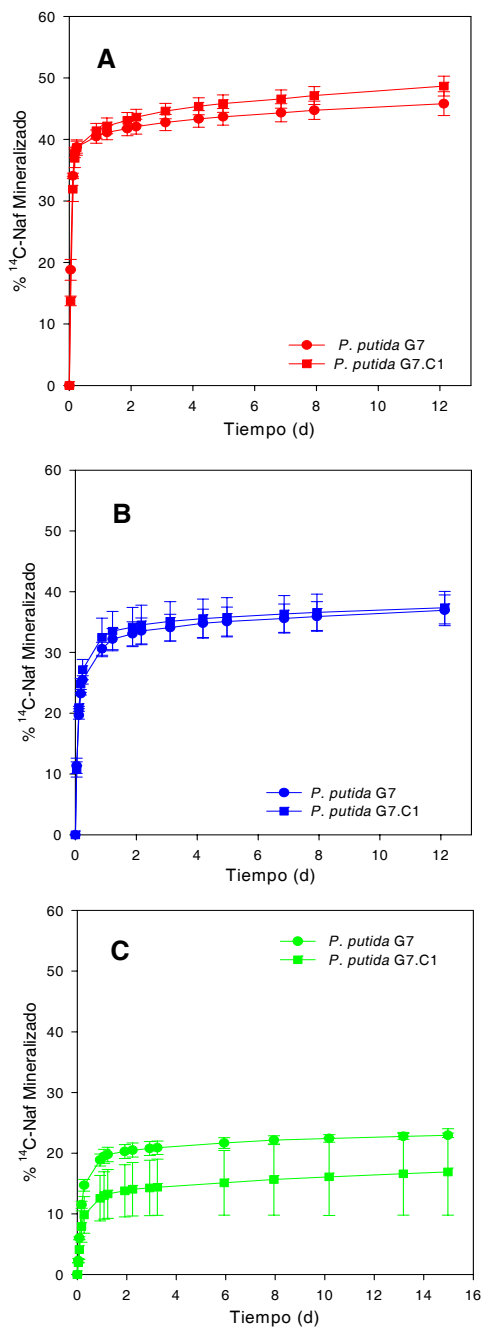


Figura IV.42 Mineralización de naftaleno sólido por *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) en fase acuosa (A), lechos de arena (B) o de agregados de arcilla (C)

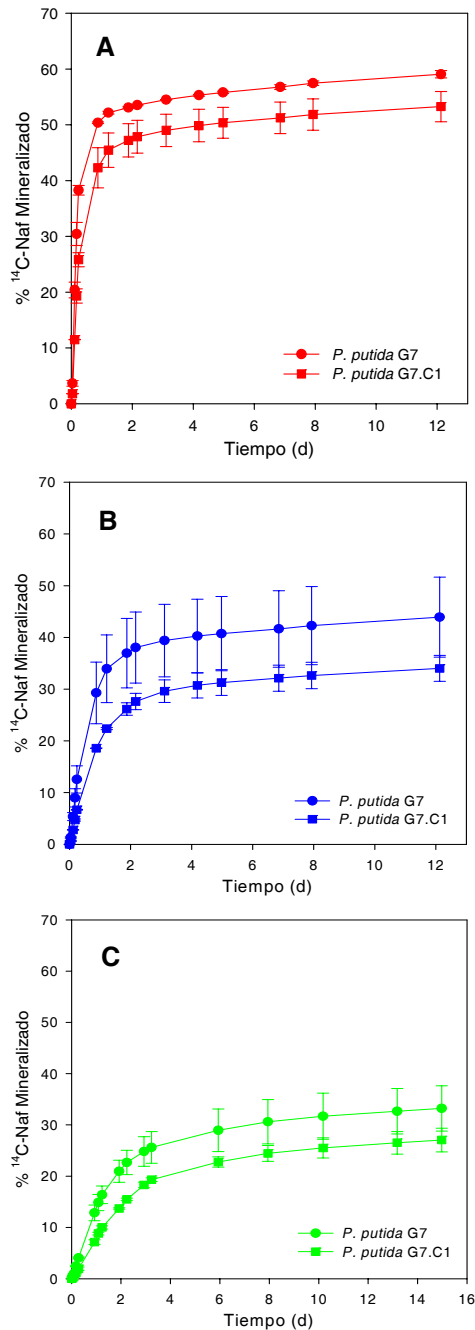


Figura IV.43 Mineralización de naftaleno disuelto en heptametilnonano por *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) en fase acuosa (A), lechos de arena (B) o de agregados de arcilla (C)

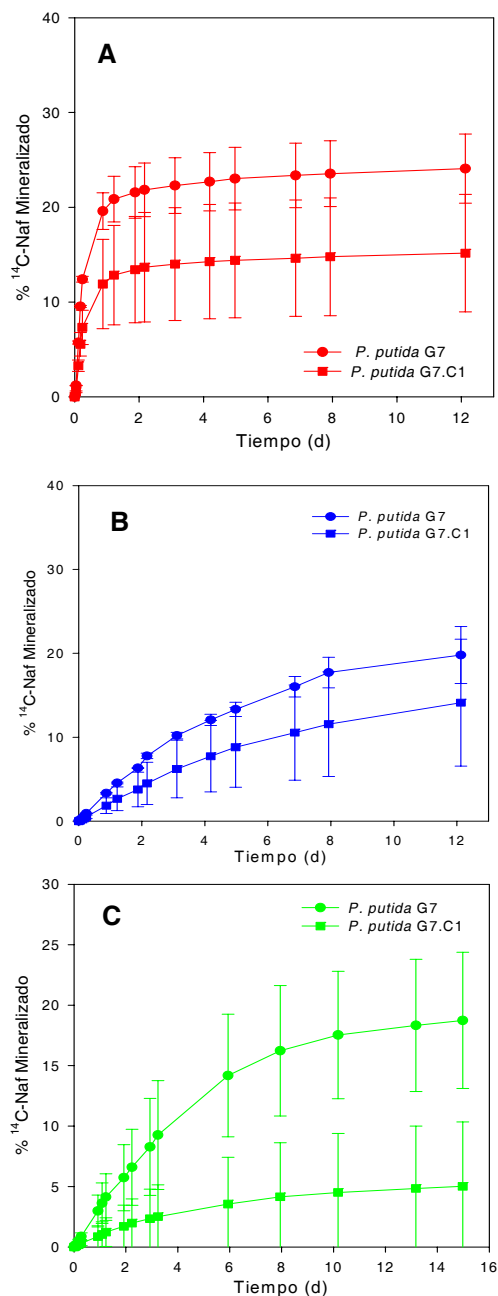


Figura IV.44 Mineralización de naftaleno disuelto en fuel pesado por *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) en fase acuosa (A), lechos de arena (B) o de agregados de arcilla (C)

Tabla IV.11 Mineralización de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 (chem+) y la estirpe mutante no quimiotáctica (chem-) *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) en lechos saturados de arena y agregados arcillosos

Forma Física Naftaleno	Lecho	Tasa máxima ^{a,b} (% h ⁻¹)		Porcentaje final ^a (%)	
		Chem+	Chem-	Chem+	Chem-
Sólido	Fase acuosa agitación	18,80 ± 1,69 Aa	13,75 ± 0,77 Aa	45,81 ± 1,94 A	48,66 ± 1,61 A
	Arena	11,35 ± 1,26 Ab	10,74 ± 1,25 Aa	36,95 ± 2,52 A	37,36 ± 2,68 A
	Arcilla	3,72 ± 0,13 Ac	2,06 ± 0,80 Ab	22,95 ± 0,38 A	16,92 ± 7,13 A
NAPL (HMN)	Fase acuosa agitación	9,56 ± 0,52 Ab	5,39 ± 0,38 Bc	59,07 ± 0,66 A	53,27 ± 2,72 A
	Arena	2,36 ± 0,53 ^c Ac	1,26 ± 0,00 ^c Ab	43,92 ± 7,74 A	34,02 ± 2,51 A
	Arcilla	0,66 ± 0,03 Ac	0,43 ± 0,07 Bb	33,22 ± 4,43 A	27,05 ± 2,33 A
NAPL (Fuel pesado)	Fase acuosa agitación	2,57 ± 0,02 A	1,55 ± 0,35 B	24,08 ± 3,64 A	15,16 ± 6,20 A
	Arena	0,20 ± 0,05 A	0,11 ± 0,05 A	19,79 ± 3,40 A	14,11 ± 7,56 A
	Arcilla	0,18 ± 0,09 A	0,05 ± 0,03 A	18,74 ± 5,63 A	5,02 ± 5,33 A

^a Los valores de tasas máximas y porcentajes finales de mineralización en una fila seguidos por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ($p=0,05$). ^b Los valores en una columna seguidos por la misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p=0,05$). ^c Los valores de tasas máximas de mineralización en esta fila son significativamente diferentes ($p=0,1$).

En la figura IV.45 se representa la mineralización de naftaleno cuando la bacteria fue resuspendida en medio de mineralización sólo o suplementado con salicilato, succinato o acetato. Los ensayos se realizaron en distintas condiciones: naftaleno completamente disuelto en fase acuosa y en agitación (figura IV.45 A), naftaleno en fase acuosa y en lecho de arena (figura IV.45 B), y naftaleno en HMN y en lecho de arena (figura IV.45 C). La tabla IV.12 compara los valores para las velocidades y porcentajes máximos de mineralización. El succinato, como se vio anteriormente, inhibía el transporte bacteriano. En las figuras IV.45 A y IV.45 B se observa que, mientras que bajo agitación constante no hubo diferencia en la mineralización con y sin succinato, en lechos de arena existió menos mineralización de naftaleno cuando la bacteria estaba resuspendida en succinato que en ausencia de éste. Los resultados obtenidos con salicilato no reflejaron lo estudiado anteriormente en los experimentos de transporte. La presencia de salicilato aumentaba mucho el transporte de nuestra estirpe, y cabía esperar que la mineralización de naftaleno

fuese por tanto mucho mayor que la obtenida. No obstante, la presencia de salicilato indujo una menor velocidad de mineralización.

El siguiente paso en el estudio de la influencia de la quimiotaxis en la biodegradación fue el uso de NAPLs para limitar la biodisponibilidad del contaminante (figura IV.45 C). En este caso se utilizó HMN como NAPL. No se apreció apenas diferencia entre los distintos tratamientos con respecto al control, lo que se confirma con los datos de las tasa máximas de mineralización recogidas en la tabla IV.13.

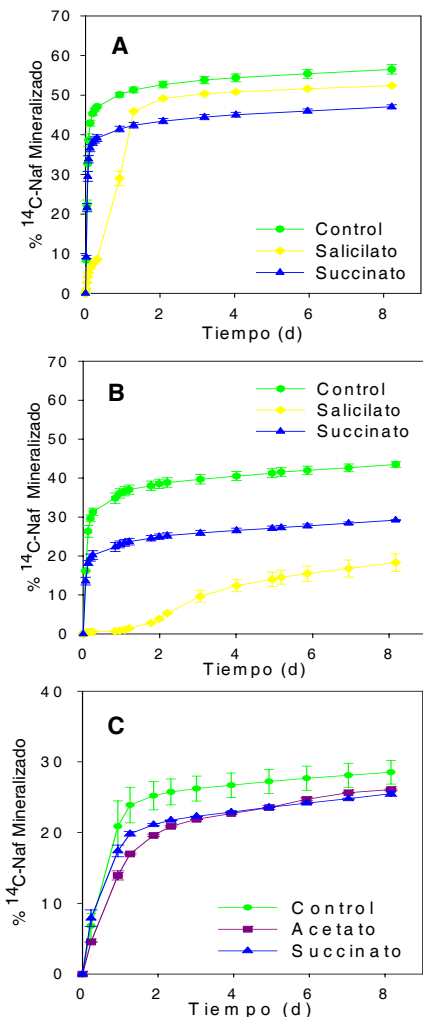


Figura IV.45 Mineralización de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 en presencia de distintos quimioefectores. **A**, naftaleno totalmente disuelto en fase acuosa bajo condiciones de agitación. **B**, naftaleno totalmente disuelto en fase acuosa y en lechos saturados de arena. **C**, naftaleno disuelto en HMN y en lechos saturados de arena.

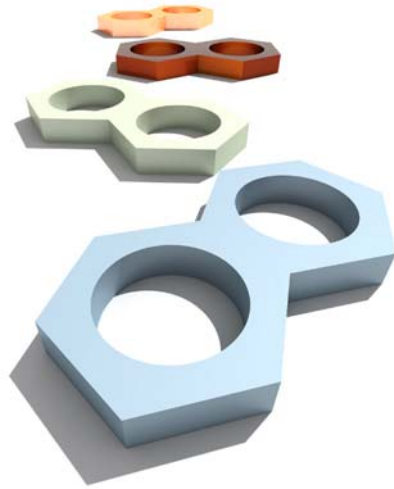
Tabla IV.12 Influencia de quimioefectores hidrofílicos sobre la mineralización de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 en lechos saturados de arena, en comparación a medio de cultivo en agitación sin fase sólida.

Forma física naftaleno/ tipo de lecho	Tasa máxima ^b (% h ⁻¹)					Porcentaje final ^b (%)					
	Control	Succinato	Salicilato	Acetato	Control	Succinato	Salicilato	Acetato	Succinato	Salicilato	Acetato
Disuelto en fase acuosa/ Agitación	24,36 ± 1,55A	25,00 ± 1,31A	2,97 ± 0,21B	ND ^a	56,5 ± 1,19A	47,07 ± 0,50B	52,42 ± 0,23C	ND ^a			
Disuelto en fase acuosa/ arena	8,56 ± 0,49A	5,93 ± 0,20B	0,25 ± 0,01C	ND ^a	43,51 ± 0,81A	29,20 ± 0,11B	18,30 ± 2,29C	ND ^a			
NAPL (HMIN)/ arena	1,24 ± 0,32A	1,44 ± 0,21A	ND ^a	0,83 ± 0,02A	28,53 ± 1,66A	25,50 ± 0,39A	ND ^a	26,09 ± 0,10A			

^a ND, No determinado. ^b Los valores de tasas máximas y porcentajes finales de mineralización en una fila seguidos por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ($p=0,05$).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN



V.1 QUIMIOTAXIS FRENTE A HAPs Y ÁCIDOS ORGÁNICOS

V.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA

En este trabajo de investigación se utilizó el método capilar, originalmente desarrollado por Adler (1973). Se trata de un ensayo simple que permite estudiar la respuesta quimiotáctica de forma cualitativa mediante observación al microscopio y de forma cuantitativa mediante conteo de viables. La elección de este método para estudiar la quimiotaxis se basó principalmente en que permite minimizar el metabolismo de un quimioefector biodegradable, de forma que lo que realmente se observe sea quimiotaxis hacia el quimioatrayente primario y no a alguno de sus productos de degradación. El metabolismo se minimiza debido al uso de una concentración bacteriana baja ($\sim 10^6$ células/mL), que permite determinar la acumulación bacteriana en el capilar. Eventualmente, el método también permite caracterizar respuestas quimiotácticas negativas, esto es, la acumulación de células en el capilar en un número significativamente menor que el control sin quimioefector (en este caso quimiorrepelente).

Cuando se realizaron los ensayos capilares de forma cualitativa mediante observación al microscopio se pudo apreciar que, a concentraciones celulares altas, las bacterias que inicialmente se acumulaban en los capilares con una disolución concentrada de quimioatrayente salían de los capilares con el tiempo. Esto es posiblemente debido a la inversión del gradiente de la sustancia quimioefectora, debido al consumo por parte de las células que entran en el capilar, o a una disminución del oxígeno en los capilares. De hecho, estudios de quimiotaxis frente a naftaleno en *P. putida* G7 han sugerido que su movimiento hacia naftaleno puede estar afectado por el oxígeno disuelto (Law y Aitken, 2003; Marx y Aitken, 2000a). Estas observaciones indican la complejidad del proceso quimiotáctico, y la importancia de la puesta a punto de métodos adecuados que permitan su estudio bajo condiciones reproducibles.

La baja solubilidad de los HAPs, que dificulta aún más la realización de ensayos capilares, ha causado probablemente que existan muy pocos estudios sobre quimiotaxis centrados en este tipo de compuestos. La mayor parte de la información existente se ha obtenido con naftaleno, con el que se han realizado, principalmente con la estirpe *Pseudomonas putida* G7, estudios fisiológicos y genéticos del proceso quimiotáctico (Grimm y Harwood, 1997; Grimm y Harwood, 1999). Estos estudios demostraron que para que esta estirpe sea quimiotáctica son necesarios genes propios que regulan esta característica, y no es suficiente con que posea los genes que regulan la degradación de naftaleno (Grimm y Harwood, 1997). En otro estudio de este laboratorio (Ortega-Calvo et al., 2003) se observó quimiotaxis frente a distintos HAPs, entre los que se encontraban naftaleno, fenantreno, pireno y antraceno. En la presente Tesis Doctoral se han descrito resultados positivos para la atracción quimiotáctica frente a naftaleno, fenantreno y, por primera vez, fluoreno. Parece por tanto que la baja solubilidad típica de estos compuestos no ha impedido la

evolución, por parte de bacterias capaces de degradarlos, de mecanismos específicos de detección quimiotáctica, con claras implicaciones para su biodisponibilidad, lo que ha constituido el tema principal de estudio en esta Tesis Doctoral.

Es importante el hecho de que, mientras *P. putida* G7 resultaba claramente atraída por naftaleno mediante quimiotaxis, la presencia del tensioactivo Brij 35, a una concentración superior a su CMC, causó quimiotaxis negativa frente al hidrocarburo. Esto pudo deberse a la incorporación de naftaleno dentro de las micelas, aumentando de esta forma su toxicidad. De hecho, se han descrito efectos tóxicos del naftaleno para estirpes de *P. putida* degradadoras de este compuesto (Ahn et al., 1998; Park et al., 2004), posiblemente causados por su carácter lipofílico y su tendencia a acumularse en la membrana celular (Sikkema et al., 1995). Las dificultades observadas en nuestro trabajo para cultivar este organismo en medio líquido con naftaleno como única fuente de carbono y energía pueden haber sido debidas a dicho efecto tóxico. Es posible, por tanto, que la presencia del tensioactivo potenciara el efecto tóxico del naftaleno, induciendo quimiotaxis negativa, tal como se ha observado para algunos HAPs (Ortega-Calvo et al., 2003). Estos resultados son explicables, por tanto, postulando que la incorporación de naftaleno a la membrana celular, mediada por el tensioactivo, da lugar a una acumulación del compuesto dentro de la célula, causando efectos tóxicos que no pueden ser eliminados mediante el proceso de biodegradación.

Esta Tesis Doctoral también se ha centrado sobre una serie de ácidos orgánicos, muchos de ellos intermediarios de las rutas de biodegradación de HAPs, y además con una gran importancia ecológica. Los ácidos orgánicos que hemos seleccionado para nuestro trabajo son: acetato, fumarato, salicilato y succinato. El estudio de la respuesta quimiotáctica confirmó que todos ellos eran quimioatrayentes para *P. putida* G7, siendo el succinato el quimioefector más potente.

Los primeros trabajos en los que se estudió la naturaleza quimioatrayente de ácidos aromáticos procedentes de los exudados de las raíces de las plantas, se realizaron con *Pseudomonas putida* PRS2000 (Harwood et al., 1984) y *Azospirillum brasilense* (Zhulin et al., 1988). En ellos se puso de manifiesto que la quimiotaxis puede favorecer la asociación simbiótica con determinadas plantas, acercando a las bacterias a las proximidades de las raíces. *P. putida* es una estirpe que está ampliamente distribuida en suelos y aguas, donde es muy posible que haya compuestos aromáticos de origen vegetal, como los exudados de las raíces, o componentes de residuos tóxicos. Puesto que *P. putida* puede utilizar muchos de estos compuestos como fuente de energía y carbono, la quimiotaxis positiva hacia compuestos aromáticos se puede ver como una estrategia ecológica muy ventajosa. Otros autores (Robinson y Bauer, 1993) estudiaron la respuesta quimiotáctica de *Rhizobium meliloti* JJ1c10 frente a succinato y fumarato y sus resultados mostraron que la quimiotaxis frente a estos compuestos es independiente del metabolismo de los mismos. Otro estudio puso de manifiesto cómo la variación en los gradientes de succinato y acetato modificaban la respuesta del sistema sensorial de *Rhodobacter sphaeroides* provocando cambios en la velocidad de movimiento y rotación flagelar (Packer y Armitage, 2000a).

Cabe destacar el efecto de los quimiotrayentes sobre el patrón de movimiento de la bacteria. Se observó al microscopio que en ausencia de quimioatrayentes el movimiento de *P. putida* G7 era aleatorio y desordenado, con cambios bruscos de dirección. Sin embargo, en presencia de quimioatrayentes, como salicilato, las células describían a menudo trayectorias circulares en el sentido contrario a las agujas del reloj, más suaves y permaneciendo en una misma dirección durante un periodo de tiempo mayor. Este efecto fue observado anteriormente para la estirpe *P. putida* PRS2000 (Harwood et al., 1989). Este estudio ofreció información precisa acerca de la flagelación de las células de *P. putida* y de su comportamiento móvil. Observaron que la movilidad de las células en ausencia de quimioatrayentes consistía en un movimiento unidireccional marcado por cambios abruptos en la dirección. Sin embargo, en presencia de benzoato (quimioatrayente para esta estirpe) las células cambiaban de dirección con mucha menos frecuencia y tenían un movimiento más continuo en una dirección y sentido durante periodos prolongados de tiempo.

La mayor capacidad quimioatrayente del succinato en *P. putida* G7 cultivada con salicilato, determinada mediante ensayos capilares, está en aparente contradicción con la inhibición a corto plazo (5 h) de la movilidad observada mediante microscopía óptica en células resuspendidas en succinato. Sería en principio esperable que, ante esta paralización, la respuesta quimiotáctica fuera menor o incluso negativa, al disminuir la probabilidad de entrada en el capilar mediante movimiento aleatorio. No obstante, considerando que las células en estos ensayos sólo entran en contacto con el succinato presente en el interior del capilar, caber pensar que, tras atracción quimiotáctica, las células tiendan a permanecer dentro del mismo debido a dicha inhibición de la movilidad. Ello explicaría además esta ligeramente mayor capacidad quimioatrayente, que por otra parte viene confirmada por el patrón de movimiento adquirido tras el proceso de adaptación al succinato (5 h), análogo al que ocurría, de forma inmediata, con salicilato.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado sustancias quimioatrayentes que, asimismo, pueden ser utilizadas como fuentes de energía para el crecimiento bacteriano. Como se indicó en la introducción (sección I.3.1), las bacterias pueden ser atraídas (o repelidas) por un substrato metabolizable no sólo mediante quimiotaxis sino además a través de mecanismos internos regulados por el sistema de transporte electrónico celular, que se han denominado taxis energética (Alexandre et al., 2004). Aunque la elucidación de los mecanismos moleculares implicados en la atracción quimiotáctica no ha formado parte de los objetivos de esta Tesis Doctoral, cabe preguntarse hasta qué punto es posible discriminar en nuestros resultados la contribución de uno y otro mecanismo de taxis. Varias líneas de evidencia, obtenidas tanto en este trabajo como previamente por otros autores, indican que, en efecto, los resultados obtenidos con los ensayos capilares responden, al menos con *P. putida* G7, a quimiotaxis: 1) Ausencia de reacción quimiotáctica frente a naftaleno con la estirpe mutante no quimiotáctica *P. putida* G7.C1 (pHG100), precultivada con salicilato y capaz de utilizar naftaleno como fuente de carbono y energía; 2) Reacción quimiotáctica muy similar de *P. putida* G7 frente a los distintos quimioefectores (naftaleno y ácidos orgánicos), a pesar de las muy diferentes tasas de crecimiento observadas con cada uno de ellos; y 3) Trabajos previos realizados a nivel molecular sobre quimiotaxis con éstas y otras

estirpes, que han demostrado a menudo la naturaleza inducible de la respuesta quimiotáctica y la ocurrencia de un mecanismo común regulatorio de los genes de los quimiorreceptores y de las rutas de biodegradación de contaminantes y otras moléculas orgánicas (Parales y Harwood, 2002). Dada la escasez de información sobre el fenómeno quimiotáctico frente a otros HAPs, tales como fluoreno y fenantreno, los mecanismos moleculares implicados en dicho proceso deberían ser objeto de futuros estudios.

V.1.2 QUIMIOTAXIS Y ADHESIÓN A NAPLs

En los ensayos capilares con naftaleno disuelto en heptametilnonano, *P. putida* G7 se acumuló cerca de la interfase NAPL-agua como respuesta a la presencia de naftaleno. No obstante, a una concentración celular elevada, la movilidad aleatoria (es decir, en ausencia de quimioatrayente) fue suficiente para provocar una acumulación celular en la interfase. Esta acumulación se debió a la adhesión de células colisionando con la gota de HMN. En un estudio sobre quimiotaxis bacteriana frente a naftaleno disuelto en heptametilnonano se pusieron de manifiesto las diferencias entre la estirpe quimiotáctica *P. putida* G7, su mutante no quimiotáctica (*Che*⁻) y su mutante no móvil (*Mot*⁻) (Law y Aitken, 2003). La estirpe *Che*⁻ se acumuló en la interfase NAPL-agua mucho más que la estirpe *Mot*⁻ y prácticamente en la misma extensión que la estirpe salvaje bajo las mismas condiciones experimentales. Puesto que la estirpe *Mot*⁻ no puede moverse, sus células chocan con la gota de HMN menos frecuentemente y por tanto se acumularon en mucha menor extensión para una concentración celular dada. Eso es precisamente lo que se observó en nuestro trabajo cuando se resuspendió la bacteria en succinato. Como pierde movilidad, su acumulación en la interfase NAPL-agua es prácticamente inexistente, puesto que la probabilidad de que colisione con esta interfase es menor.

Se ha observado, no obstante, que la adhesión bacteriana al NAPL es menor en presencia de naftaleno, tanto para los ensayos en los que se resuspendió la bacteria en succinato como para los ensayos en ausencia de éste. El reparto de naftaleno desde el NAPL a la fase acuosa pudo provocar que la bacteria permaneciera en la fase acuosa siguiendo el gradiente de naftaleno formado, disminuyendo, de esta forma, la adhesión a la fase orgánica. Este resultado también está de acuerdo con lo expuesto en otro estudio (McClaine y Ford, 2002), en el que se observó que, de acuerdo a distintos patrones de movilidad, una misma estirpe podía permanecer adherida o liberarse de la superficie. Esto está relacionado con lo expuesto anteriormente del cambio de movilidad de *P. putida* G7 en presencia o ausencia de quimioatrayente. Cuando hay naftaleno en las inmediaciones de esta bacteria su movimiento más suave y continuo, hace que las células, mayoritariamente, no se encuentren adheridas al NAPL, sino suspendidas en la fase acuosa.

V.2 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO A TRAVÉS DE MEDIOS POROSOS SATURADOS

La quimiotaxis bacteriana a menudo se obvia en sistemas porosos en los que predomina la advección (transferencia de calor debida al movimiento horizontal de un flujo tal como el aire o el agua) ya que, generalmente, se asume que los efectos de la movilidad bacteriana son despreciables comparados con la advección. Sin embargo, las bacterias pueden moverse a través de medios acuosos a velocidades de 20-40 $\mu\text{m/s}$ ó 1,7-3,5 m/día (Duffy et al., 1995; Frymier et al., 1995; Harwood et al., 1989), valores que son comparables o mayores que los típicos flujos de aguas residuales de 1 m/día. Por tanto, a esos flujos particularmente bajos, la quimiotaxis puede jugar un papel importante en el transporte bacteriano. En esta Tesis Doctoral se proporcionan evidencias experimentales de la influencia significativa de la quimiotaxis frente a HAPs y ácidos orgánicos sobre el transporte a través de diferentes medios porosos saturados.

La clara influencia positiva observada en nuestro estudio de la actividad quimiotáctica sobre el transporte bacteriano contradice, aparentemente, otros estudios. Por ejemplo, se ha observado que estirpes mutantes no quimiotácticas de *E. coli* muestran velocidades de penetración a través de arena mayores que las estirpes quimiotácticas (Reynolds et al., 1989). Según este estudio, las células quimiotácticas detectan los gradientes de nutrientes en tres dimensiones y migran a lo largo de todo el volumen de poro. Las células no quimiotácticas, pero móviles, no son sensibles a estos gradientes y por tanto, es más probable que se muevan a través de macroporos a velocidades mayores. Por tanto, estos autores propusieron que, más que por quimiotaxis, la tasa de penetración de bacterias móviles está regulada por la tasa de crecimiento bacteriano *in situ*. Otros autores (Sharma et al., 1993) llegaron, en un estudio también con *E. coli*, a conclusiones análogas, así como otro estudio (Barton y Ford, 1995) con *P. putida*, en el que no se observó influencia significativa de la quimiotaxis sobre el transporte a través de arena. No obstante, todos estos autores utilizaron condiciones muy diferentes a las utilizadas en nuestro trabajo, que pueden explicar las diferencias: 1) condiciones estáticas, y 2) periodos experimentales largos (>24 h) que permitían el crecimiento bacteriano. La utilización de un flujo continuo y de experimentos relativamente cortos puede habernos permitido observar con más claridad la influencia de la quimiotaxis frente a HAP y ácidos orgánicos sobre el transporte bacteriano a través de substratos porosos. De esta forma, pueden haberse evitado las interferencias debidas a las distintas tasas de crecimiento de las diferentes estirpes, así como los fenómenos de asociación típicos del crecimiento bacteriano en condiciones estáticas, tales como la formación de patrones simétricos (Budrene y Berg, 1995) y la acumulación celular en emplazamientos estancos (Park et al., 2003).

V.2.1 EFECTO DE HAPs SOBRE EL TRANSPORTE BACTERIANO

El naftaleno inicialmente presente en forma de cristales o disuelto en un líquido en fase no acuosa promovió el transporte de la estirpe *P. putida* G7 a través de columnas de arena saturadas. La presencia de heptametilnonano hizo que

aumentase la hidrofobicidad en la columna y, por tanto, la adhesión bacteriana. No obstante, tanto cuando se encontraba el naftaleno en forma de cristales como cuando estaba disuelto en heptametilnonano, la presencia de naftaleno hizo que el transporte bacteriano aumentase el doble.

Esta diferencia en el transporte de *P. putida* G7 en presencia o ausencia de naftaleno, posiblemente, se deba a los distintos patrones de movilidad que experimenta la estirpe en ambas situaciones ya descritas en la sección V.1.1. En presencia de un quimioatrayente, la bacteria se mueve de forma suave, en una dirección más o menos continua durante periodos prolongados de tiempo. Se ha determinado que este patrón de movimiento se produce porque los flagelos se agrupan formando un haz detrás del cuerpo bacteriano y rotan como una unidad en sentido contrario a las agujas del reloj (McClaine y Ford, 2002). Si la bacteria se adhiere a la superficie de la arena en un punto de su cuerpo, es posible que el movimiento conjunto de estos flagelos haga que la bacteria se libere de la superficie y se transporte. En ausencia de quimioatrayente, el movimiento es más brusco y con cambios de dirección más frecuentes. Si, en esta situación, la bacteria se adhiere a la superficie de la arena, y cambia la dirección de rotación de uno o más flagelos, esto puede provocar un cambio en la conformación de los flagelos. De esta forma, se deshace el haz, la fuerza rotacional del haz disminuye y el flagelo o flagelos que cambiaron la dirección, una vez fuera del haz pueden adherirse a la superficie de la arena para iniciar o fortalecer la adsorción, disminuyéndose, por tanto, el transporte.

Para que se produzca adhesión bacteriana a la superficie, tiene que existir a su vez un momento de pausa en el movimiento. El movimiento ininterumpido de la estirpe en presencia de naftaleno puede impedir que estas células tengan tiempo suficiente para adherirse a la superficie. No obstante, en ausencia del HAP, la fracción de tiempo en el cual la célula cambia de dirección puede ser el momento en el que la célula se adhiera ya que disminuye mucho la velocidad de su movimiento.

Estas diferencias en movilidad también hacen que el ángulo de acercamiento de la bacteria a la superficie sea distinto, y este ángulo es crítico para la adhesión a la superficie y para saber cuánto decrece la velocidad de las células (Frymier et al., 1995; Ramia et al., 1993). En estos estudios se determinó que las bacterias que se mueven perpendicularmente a la superficie experimentan una gran reducción de la velocidad. Las células que se acercan a la superficie con ángulos que varían entre los 90° y 0° experimentan una disminución de la velocidad menor. De hecho, las células que se mueven paralelamente a la superficie se mueven ligeramente más rápido que las que se encuentran en el seno de la fase acuosa. Es posible que el ángulo de contacto afecte al número de colisiones de la bacteria con la superficie, y por tanto, a la probabilidad de adhesión. En ausencia de quimioatrayentes la bacteria puede incidir de forma perpendicular a la superficie debido a sus cambios en la dirección de movimiento. Esto favorece que aumente el número de choques con la superficie y por tanto la probabilidad de adhesión. En presencia de quimioatrayentes, *P. putida* G7 se mueve de forma más lineal, más suave y, probablemente, con ángulos más próximos a 0° con respecto a la superficie de la arena. De esta forma se ven reducido los choques con la superficie y existe menor probabilidad de adhesión bacteriana,

causando el observado descenso en la afinidad (α_t) de la bacteria por el material de la columna.

Esta diferencia en el transporte basada en un patrón de movilidad distinto fue observado anteriormente en *E. coli* (McClaine y Ford, 2002). En ese estudio se compararon diversas estirpes de *E. coli* con distintos patrones de movimiento, dos de ellas con movilidades comparables a las expuestas anteriormente en esta Tesis Doctoral. Observaron que, para dos flujos y fuerzas iónicas distintas, la adhesión al vidrio de la bacteria con movimiento más suave y continuado era menor en todos los casos que para la estirpe con un movimiento más brusco.

En esta Tesis Doctoral se caracterizó en profundidad la estirpe no quimiotáctica *P. putida* G7.C1 (pHG100), con el objetivo de comprobar si la manipulación genética a la que se vio sometida la estirpe pudo alterar de algún modo sus propiedades físicas. Se comprobó que a pesar de estas modificaciones genéticas sufridas, ambas estirpes, *Pseudomonas putida* G7 y *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) mantuvieron las mismas propiedades superficiales, tales como, carga celular superficial y ángulo de contacto y la misma capacidad degradadora de naftaleno y otras fuentes de carbono solubles. Esto permitió comparar los resultados obtenidos con ambas estirpes puesto que se diferencian únicamente en su capacidad quimiotáctica, *a priori*, frente a naftaleno. Ambas estirpes, en ausencia de naftaleno, se transportaron a través de arena en igual grado alcanzando un valor aproximado de C/C_0 de 0,4.

El modelo extendido DVLO permite el cálculo de las entalpías de interacción que incluyen las interacciones de van der Waals, electrostáticas y ácido-base. Se trabajó con un medio poroso hidrofílico, las bacterias son ligeramente hidrófobas y cuando al menos una de las dos superficies es hidrófoba las interacciones ácido-base son atractivas. Una bacteria que se aproxima a una superficie sólida es atraída por las fuerzas de van der Waals. Las interacciones electrostáticas surgen por la superposición de la doble capa eléctrica de las superficies bacterianas y la de las superficies sólidas. El grosor de la doble capa eléctrica varía desde 1 nm ($l=10^{-1}$ M) hasta 100 nm ($l=10^{-5}$ M). A fuerzas iónicas elevadas el espesor de la doble capa eléctrica disminuye y aumenta la atracción bacteria-superficie, a fuerzas iónicas bajas aumenta la repulsión entre ambas por el efecto contrario. En los ensayos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, en ausencia de quimioatrayentes, se trabajó a una fuerza iónica media (8×10^{-3} M). A una distancia de separación de varios nanómetros, la teoría DVLO predice una atracción neta (en el mínimo de energía secundario) entre una bacteria y las superficies en un fluido de fuerza iónica moderada (Jucker, 1998). Sin embargo, si se tiene en cuenta la carga superficial de ambas superficies, las interacciones electrostáticas son repulsivas. La suma de estas distintas interacciones bacteria-superficie son las que provocaron que las estirpes bacterianas se transportaran en un 40% y se quedasen retenidas en un 60%.

El aumento del transporte en la estirpe quimiotáctica en presencia de naftaleno sólido se podrían achacar a la presencia del HAP sólido en la columna, pudiendo, de esta forma, cambiar la porosidad de la columna y abrir caminos preferenciales, aumentando así el transporte. Sin embargo, este razonamiento no es válido puesto que el transporte tendría que aumentar por igual en las dos estirpes. El transporte de

P. putida G7 en presencia de un quimioatrayente (y nutriente) como es el naftaleno es mucho mayor, que en el caso de la estirpe no quimiotáctica. Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo con una sustancia trazador, tiourea, en presencia de distintas concentraciones de naftaleno y en ausencia del mismo. El transporte no se modificó en estas distintas situaciones.

En los ensayos llevados a cabo con la bacteria *P. putida* G7 inactivada en frío se observaron diferencias en el transporte bacteriano en ausencia de naftaleno, en las columnas rellenas con arena el transporte se duplicó alcanzando un valor de C/C_0 de 0,89. La diferencia de temperatura entre la fase móvil y el relleno de la columna pudo haber originado fenómenos de convección, modificando la afinidad de la bacteria por la arena.

Con la estirpe *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ se observó el mismo resultado con naftaleno que para *Pseudomonas putida* G7. La presencia de naftaleno en el medio aumentó el transporte bacteriano. Sin embargo, este aumento en el transporte fue mucho menor y menos significativo. Esto puede ser explicado porque la estirpe *P. aeruginosa* 19SJ produce biosurfactantes cuando es cultivada en naftaleno (Dézuel et al., 1996). Es posible que la presencia de biosurfactantes asociados a las células ejerza un papel en la adhesión al material, dificultando en este caso el efecto promotor de la quimiotaxis sobre el transporte bacteriano.

Se estudio también el transporte a través de arena de dos estirpes quimiotácticas frente a fluoreno y fenantreno, *Sphingomonas* sp. LB126 y *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ, respectivamente. *Sphingomonas* sp. LB126 se transportó en un 90% a través de arena. Esto se debió a que tanto el medio poroso como la bacteria son hidrofílicos y están cargados negativamente, con lo que tanto las interacciones electrostáticas como ácido-base son de tipo repulsivo y hacen que aumente el transporte bacteriano. Sin embargo, frente a lo observado para naftaleno, esta estirpe disminuyó su transporte en presencia de fluoreno. Esto probablemente se debió a la baja solubilidad de este HAP. Hay mucha menos cantidad de fluoreno en solución y por tanto las bacterias tienden a seguir el gradiente de concentración, permaneciendo en el interior de la columnas, donde la concentración de HAP es máxima. Cuando se paralizó la bacteria mediante sonicación (que causó la rotura de los flagelos), ésta disminuyó aún más su transporte. Este efecto fue observado anteriormente en otros estudios, donde se determinó que a flujos bajos la fracción de células móviles retenidas en columnas empaquetadas con suelo (Camesano y Logan, 1998) o en vidrio (McClaine y Ford, 2002) era mucho menor que la de células paralizadas. Esta observación fue realizada a flujos y fuerzas iónicas semejantes a las utilizadas en este trabajo de investigación. La disminución en el transporte en presencia de fenantreno se observó, de forma análoga, para *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ.

V.2.2 EFECTO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO

Se estudió el efecto de diversos ácidos orgánicos sobre el transporte de la estirpe quimiotáctica objeto principal de este estudio, *Pseudomonas putida* G7. Estos ácidos ensayados, que también son quimioatrayentes, son acetato, fumarato, salicilato y

succinato. Cuando se resuspendió la bacteria en disoluciones de estos quimioefectores no variaron ni el potencial Z ni el ángulo de contacto de la bacteria. Fumarato y salicilato aumentaron el transporte bacteriano hasta un 85%, acetato hasta un 80%, y el succinato, sin embargo, inhibió el transporte bacteriano.

Estos resultados pueden explicarse considerando el efecto que estos ácidos orgánicos ejercen sobre diversos aspectos de la movilidad bacteriana. Por ejemplo, las células de *Rhodobacter sphaeroides* modifican la rotación del motor flagelar frente a cambios en los gradientes de diversos ácidos orgánicos quimioatrayentes. Esta modificación puede ser tanto un aumento mantenido en la rotación flagelar (como es el caso típico del acetato), como la paralización de la misma (lo cual ocurre con succinato), respuestas que se revierten a la situación original cuando se retira el estímulo (Packer y Armitage, 2000a; Packer y Armitage, 2000b). Los mecanismos que regulan uno u otro tipo de respuesta aún se desconocen. En nuestro estudio hemos observado un comportamiento análogo en *P. putida*. El efecto positivo sobre el transporte de salicilato, fumarato y acetato puede explicarse debido a un aumento en la rotación flagelar y a un cambio en el patrón de movimiento, similar al ya descrito para el caso de naftaleno. En cambio, el efecto claramente negativo del succinato sobre el transporte, junto a las observaciones de su respuesta móvil a corto plazo frente a este quimioatrayente (véase sección IV.2.1.2.1), sugieren que en presencia de succinato las células interactúan con el sustrato poroso mucho más fuertemente, probablemente debido a la interrupción del movimiento flagelar. No obstante, esta interacción puede revertirse al eliminar dicho efector de las columnas, como se observó en los experimentos de sustitución de fase (figura IV.36), muy probablemente causado por la recuperación de la movilidad celular.

Pese a la utilización de células precultivadas con salicilato (intermediario de la ruta de degradación de naftaleno), la combinación de naftaleno junto a otro ácido orgánico no resultó en diferencias de transporte en la mayoría de los casos, en comparación a cuando sólo había ácido orgánico, lo cual es explicable a la menor concentración de naftaleno en la fase acuosa. Sólo en el caso de fumarato la presencia combinada con naftaleno resultó en una disminución del transporte (figura IV.33). El fumarato fue escogido para este trabajo porque ha sido muy estudiado como regulador del sistema motor flagelar bacteriano en *Halobacterium salinarum*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Barak et al., 1996; Barak y Eisenbach, 1992; Marwan et al., 1990; Montrone et al., 1998; Prasad et al., 1998). Estos estudios han determinado que el fumarato actúa sobre el complejo regulador del conmutador flagelar ("switch"), y que afecta a la rotación del flagelo disminuyendo el nivel de energía libre del estado CW (sentido de las agujas del reloj)/CCW (sentido contrario a las agujas del reloj). De esta forma, aumenta la probabilidad de giro en sentido CW, y por tanto de movimiento celular aleatorio. Como se ha explicado anteriormente, en nuestro caso un patrón de movimiento aleatorio induciría una mayor probabilidad de intercepción por el material poroso (frente al movimiento mantenido en una sola dirección), y por lo tanto un menor transporte. Aunque con los resultados disponibles es difícil dar una interpretación clara para la inhibición del transporte observada en nuestro estudio en presencia de naftaleno y fumarato, es posible que la presencia de naftaleno (o de alguno de sus metabolitos) sea necesaria para que el fumarato ejerza su función

sobre la conmutación del giro flagelar. Ello sería comprensible teniendo en cuenta que se ha utilizado células pre-acondicionadas con salicilato. Por tanto, la presencia conjunta de dos quimioefectores y el hecho de que el fumarato sea un regulador del sistema motor puede ser la causa de esta diferencia en el transporte.

El salicilato ha sido un compuesto muy estudiado previamente, tanto por su capacidad de estimular la degradación de HAPs (Chen y Aitken, 1999), por ser inductor de la quimiotaxis (Grimm y Harwood, 1997), así como por encontrarse en la ruta de degradación de diversos HAPs (véase introducción). En algunos estudios se demostró que la presencia de salicilato sódico en suelos aumentaba la población de *Pseudomonas putida* G7 desde 10^4 a 10^8 CFU/g de suelo y aumentaba la presencia de *P. putida* G7 en la rizosfera (Colbert et al., 1993b; Colbert et al., 1993a). Otros estudios sugirieron que el salicilato aumentaba las tasas iniciales de degradación además del fenantreno, que era fuente de carbono y energía para la estirpe *Pseudomonas saccharophila* P15, de fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, y benzo(a)pireno que no eran utilizadas por esta estirpe para su crecimiento. La mineralización de estos compuestos se estimulaba cuando se precultivaba la estirpe en salicilato (Chen y Aitken, 1999) por estas razones. Por todo ello, de los ácidos orgánicos estudiados, el salicilato supone quizás el candidato idóneo para ser utilizado como promotor del transporte bacteriano durante el diseño de estrategias de biorrecuperación.

Se estudió el efecto de la fuerza iónica sobre el transporte en nuestro sistema y tras probar distintas concentraciones de salicilato y por tanto distintas fuerzas iónicas, no se observó ninguna influencia de la misma en el transporte de nuestra estirpe a través de las columnas de arena. El efecto de la fuerza iónica en la deposición de *P. putida* G7 no está de acuerdo con la teoría de estabilidad coloidal de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), que establece que a una fuerza iónica elevada, la doble capa difusa está comprimida provocando una reducción en las fuerzas electrostáticas repulsivas de la doble capa y, por tanto, un aumento en la tasa de deposición de las células bacterianas. Existen estudios en los que se probó que la fuerza iónica tenía un efecto importante sobre el transporte bacteriano. Diversos autores estudiaron el efecto de la fuerza iónica sobre el transporte bacteriano a través de medios porosos saturados, y mostraron que a medida que la fuerza iónica aumentaba, decrecía la curva de rotura siguiendo la teoría DLVO, que sugería que las interacciones electrostáticas eran el principal mecanismo que controlaba el transporte de *Sphingomonas* sp. (Brown y Jaffé, 2001). Otros autores estudiaron el transporte de *Cryptosporidium* Oocysts en medios porosos y las curvas de rotura obtenidas a distintas fuerzas iónicas mostraban que la deposición de la bacteria en arena aumentaba al aumentar la fuerza iónica. Sin embargo, la deposición bacteriana era menor que la esperada siguiendo la teoría DVLO debido al efecto de la filtración (Tufenkji et al., 2004). Nuestros resultados, sin embargo, están de acuerdo con lo postulado en otro estudio llevado a cabo con bacterias móviles, en el cual se determinó que a un flujo de 0,0044 cm/s, la fuerza iónica no influía en la retención bacteriana en una superficie de vidrio (McClaine y Ford, 2002). En nuestro caso, el flujo utilizado fue muy parecido al del estudio, 0,0062 cm/s. En este trabajo de investigación la dificultad de la teoría DVLO para predecir el transporte puede venir

provocado por el hecho de que la estirpe es quimiotáctica a salicilato y sea cual sea la concentración del quimioatrayente, la respuesta quimiotáctica es suficientemente fuerte como para superar cualquier barrera energética que le obligue a depositarse sobre el medio poroso.

V.2.3 EFECTO DE TENSIOSACTIVOS EN EL TRANSPORTE BACTERIANO

Debido a sus propiedades activas en superficie, el tensioactivo adsorbido puede afectar a la adhesión bacteriana alterando las interacciones estéricas, electrostáticas e hidrofóbicas. Si esto provoca un aumento en la repulsión entre los granos de arena y la bacteria, los tensioactivos aumentarán el transporte bacteriano. El Brij35 fue capaz de aumentar el transporte de *P. putida* G7 a través de medios porosos. El mecanismo de este aumento del transporte parece ser debido a la expansión de la doble capa eléctrica sobre la bacteria y la arena mediante el desplazamiento de los contraiones por el surfactante adsorbido (Brown y Jaffé, 2001). Esta doble capa eléctrica expandida aumenta la repulsión electrostática, con la resultante reducción en la eficiencia de colisión. Si las interacciones hidrofóbicas fueran el mecanismo dominante que afectase al transporte bacteriano, los resultados de ángulos de contacto obtenidos en esta Tesis Doctoral (que no varían en presencia de Brij35) sugieren que la eficiencia de colisión debería de permanecer inalterable en presencia del tensioactivo. Puesto que la eficiencia de adhesión disminuye apreciablemente, parece ser que las interacciones hidrofóbicas no son dominantes en este sistema.

V.2.4 EFECTO DE LA ADSORCIÓN DEL QUIMIOEFECTOR SOBRE EL TRANSPORTE

Los experimentos en columna indicaron que las diferentes matrices ejercen distintas influencias sobre el transporte de las bacterias degradadoras de HPA.

Puesto que las células bacterianas no se adsorben a las bolas de cristal recubiertas de PVA ($\alpha_t < 0,04$) (Lahlou et al., 2000), fueron las superficies de arcilla las que retuvieron a *P. putida* G7. Como la arcilla se utilizó en forma de agregados adheridos a bolas de cristal, esta retención de las células no fue dominada por intercepción directa, como se podría haber esperado con la arcilla pura, sino a la tendencia de muchas bacterias a asociarse a las superficies de arcilla.

El suelo también retuvo, aunque en menor proporción, a la bacteria. Es posible que las superficies irregulares del suelo puedan haber causado una retención bacteriana adicional en las columnas, diferente de aquellas atribuidas a las interacciones físico-químicas. Esta limitación no invalida el uso de las eficiencias relativas de adhesión como indicadores del transporte bacteriano en este estudio. El hecho de que los valores de α_t sobrepasen el valor de 1 solamente en las columnas con suelo o agregados de arcilla (lo cual podría no ser posible teóricamente con esferas ideales) sugiere que algunos agregados presentes estaban actuando como un filtro por un mecanismo adicional. Cabe la posibilidad de que la arcilla haya causado una alta retención bacteriana debido a los efectos combinados de alta eficacia de adhesión

bacteriana a la columna y a la gran probabilidad de contacto entre las bacterias y el material de la columna.

El efecto del salicilato y naftaleno sobre el transporte de la estirpe *P. putida* G7 a través de las distintas matrices ensayadas fue diferente atendiendo a cada matriz. Estas diferencias pueden explicarse en base a la distinta adsorción que experimentan estos dos compuestos a arena, suelo o arcilla. El naftaleno, debido a su naturaleza hidrófoba, tiende a absorberse de forma preferente a la materia orgánica del suelo, mediante mecanismos de reparto típicos de estos compuestos, presentando menos afinidad hacia las fracciones minerales, tales como arena y arcilla (Bayard et al., 1998; Lee et al., 2002). En cambio, el salicilato puede establecer interacciones iónicas con la materia orgánica y con fracciones minerales cargadas tales como arcillas y óxidos. En un estudio sobre la adsorción de distintos ácidos aromáticos a suelos agrícolas entre los que se encontraba el ácido salicílico, se encontró que a tiempos muy pequeños de muestreo (1h) existía una disminución importante en la concentración de la solución de ácido salicílico, que se debió a una rápida adsorción del mismo a las partículas del suelo (Celis et al., 2005). Otro estudio reflejó que las superficies del suelo cargadas positivamente jugaron un papel muy importante en la adsorción de ácido salicílico por suelos y apuntaron a la posibilidad de que este ácido aromático formase complejos bidentados con los metales (Dubus et al., 2001). En estos complejos, tanto los grupos -COOH y -OH del ácido salicílico se enlazarían simultáneamente a la superficie del óxido metálico. El ácido salicílico se encuentra en suelos principalmente en su forma aniónica, sin embargo, una parte de la forma neutra puede estar presente en la mayoría de los suelos ácidos. Los mecanismos de adsorción de los ácidos débiles en suelos pueden incluir mecanismos no-específicos (fuerzas de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo) o específicos. La adsorción de la forma neutra de las moléculas es posible que implique principalmente interacciones no-específicas acopladas a interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógenos. La adsorción de la forma aniónica del ácido salicílico es posible que sea más débil que la de la forma neutra en cambisoles debido a la repulsión entre las cargas electronegativas de los constituyentes del suelo y las de las moléculas ionizadas. Sin embargo, los mecanismos de adsorción pueden incluir también puentes con un catión bivalente entre la molécula ionizada y las superficies cargadas negativamente tales como filosilicatos o materia orgánica. Es conocida la forma en que el ácido salicílico se adsorbe al suelo y es preferentemente mediante intercambio de ligandos con los grupos hidroxilo de las superficies de los óxidos.

Los experimentos de transporte a través de arena, material con poca capacidad de adsorción, mostraron claramente el efecto positivo del naftaleno y salicilato sobre el transporte bacteriano. Debido a la muy probable adsorción de estos compuestos sobre los otros materiales, a través de los mecanismos ya descritos, el transporte bacteriano se modificó de forma muy significativa. En el caso de la arcilla, con una menor afinidad por el naftaleno (dada la naturaleza hidrófoba de éste) y mayor por el salicilato (debido a interacciones de tipo iónico), el naftaleno siguió estimulando el transporte, como ocurría con la arena, y, en cambio, el efecto promotor del salicilato sobre el transporte desapareció completamente. Con el suelo forestal, en cambio, la alta capacidad de adsorción de la materia orgánica presente anuló con ambos

compuestos el efecto positivo sobre el transporte. En el caso del salicilato, incluso, se produjo un menor transporte que en el control, lo cual podría explicarse postulando que la fuerte adsorción del compuesto al suelo provocó la acumulación preferencial del quimioefector en zonas próximas a los agregados. Esto podría haber inducido una mayor eficiencia de adhesión (α_i) de las células al suelo, debido a una mayor probabilidad de intercepción, afectando negativamente el transporte.

Es posible que las diferencias observadas en el transporte a través de arena en presencia de naftaleno, fluoreno y fenantreno puedan atribuirse también a su distinta capacidad de adsorción. Mientras que el naftaleno, de mayor solubilidad, se encontraba disuelto en la fase acuosa, los otros dos HAPs poseen una menor solubilidad y pueden haber permanecido adsorbidos a la fase sólida, de forma que las estirpes quimiotácticas permanecieron retenidas en lugar de transportarse con la fase acuosa.

V.3 PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS EN LA BIODEGRADACIÓN

No hubo diferencia en la mineralización de naftaleno entre dos estirpes, una quimiotáctica, *Pseudomonas putida* G7 y su mutante no quimiotáctica, *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100) bajo condiciones homogéneas. Esto implica que el sistema de enzimas responsable de la degradación de naftaleno no está afectado por las mutaciones que se llevaron a cabo para obtener la estirpe mutante *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100). Por tanto, cualquier diferencia que se observe en la degradación de naftaleno en un sistema no homogéneo no sería atribuible a diferencias inherentes a su potencial degradador.

Sin embargo, sí se observaron diferencias en biodegradación entre ambas estirpes cuando el naftaleno estaba disuelto en líquidos en fase no acuosa, como son el heptametilnonano o el fuel pesado. La presencia de un NAPL limita la transferencia de naftaleno a la fase acuosa, creando un gradiente de concentración y un efecto quimiotáctico en la bacteria similar al expuesto en la sección V.1.2.

La quimiotaxis provoca un aumento en la densidad celular en o cerca de la interfase desde la cual se desorbe o disuelve un quimioatrayente. Tal aumento en la densidad celular puede conducir a un aumento en la velocidad de biodegradación de atrayente cerca de la interfase, disminuyendo la concentración en la fase acuosa y por tanto aumentando el gradiente de concentración en la dirección opuesta a la que ocurre la transferencia de masa. Esta puede ser la explicación de por qué la estirpe quimiotáctica hace que haya una mayor biodisponibilidad de naftaleno y por tanto un aumento en la biodegradación del mismo en comparación con la estirpe mutante no quimiotáctica.

Estas diferencias observadas con el heptametilnonano no fueron tan claras con el fuel pesado. La concentración de naftaleno en éste es menor que en HMN y el reparto entre el fuel y la fase acuosa en condiciones estáticas puede resultar tan lento que la quimiotaxis no ejerza ningún papel. El simple hecho de que ambas estirpes

sean móviles puede hacer que se adhiriesen al fuel y degradasen en la misma proporción.

Las velocidades máximas de mineralización observadas y el porcentaje final mineralizado fueron mayores para heptametilnonano que para fuel pesado, y en ambos tratamientos menores que para los ensayos en los que el naftaleno se encontraba en forma de cristales. Esto indica que existe menos limitación en la biodisponibilidad que en el caso de los líquidos en fase no acuosa.

Como se explicó anteriormente, la presencia de un quimioatrayente hace que la estirpe *P. putida* G7 modifique su patrón de movimiento y la adhesión a superficies sea menor. Diversos estudios investigaron las diferencias en la biodegradación de células suspendidas y adheridas (Gordon et al., 1983; Harms y Zehnder, 1994; Jeffery y Paul, 1986; Park et al., 2001). Harms y Zehnder (1994) sugirieron que el área superficial expuesta de las células adheridas es menor que la de las células suspendidas. Park et al. (2001) asumieron que las células se adherían a la arena en una sola capa, y determinaron que las células adheridas presentaban al seno de la solución menos del 17% de superficie, por lo que la actividad de las células adheridas era menor que la de las células suspendidas. Jeffery y Paul (1986) encontraron que la tasa de incorporación de la timidina y la relación ATP/ADN de las células libres suspendidas era mayor que la de las adheridas. Ellos atribuyeron esa reducción en las tasas a diferencias fisiológicas entre los dos sistemas, fundamentalmente a una reducción en la cantidad de superficie celular disponible para la toma de nutrientes. Gordon et al. (1983) estudiaron en sus ensayos que las células adheridas una menor eficiencia metabólica y que la tasa del metabolismo respiratorio era más lento que las de las células suspendidas. Sugirieron diversas posibilidades, incluyendo una disminución en la disponibilidad de nutrientes inorgánicos u oxígeno, efectos del pH, y reducción area celular superficial expuesta. Sin embargo, Park et al. (2001) postularon en su estudio que no había ninguna razón para creer que la disminución en la actividad celular podía deberse a limitaciones en la disponibilidad de aceptores de electrones, sustrato, u otros nutrientes en el seno de la disolución de los sistemas en columnas con los que trabajaron. En otro estudio de nuestro laboratorio se observó que las células de *Burkholderia* sp. adheridas a agregados de arcilla disminuían mucho su actividad degradadora de 2,4-DNT en comparación con las bacterias suspendidas, debido a un tiempo mayor de exposición al compuesto nitroaromático y por tanto, aun posible efecto tóxico de esta sustancia (Ortega-Calvo et al., 1999).

Estos estudios corroboran los resultados obtenidos en biodegradación, donde debido a su patrón de movimiento en presencia de naftaleno, la estirpe *P. putida* G7 tiende a permanecer suspendida, mientras que la estirpe mutante *P. putida* G7.C1 tendería a adherirse a la superficies debido a sus cambios de dirección más continuados y movimientos más bruscos. Las células quimiotácticas, en suspensión degradaron el naftaleno más rápidamente y en mayor proporción que las células no quimiotácticas y adheridas.

En la influencia de distintos ácidos orgánicos quimioefectores en la biodegradación de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 no se observó ningún efecto positivo. En los

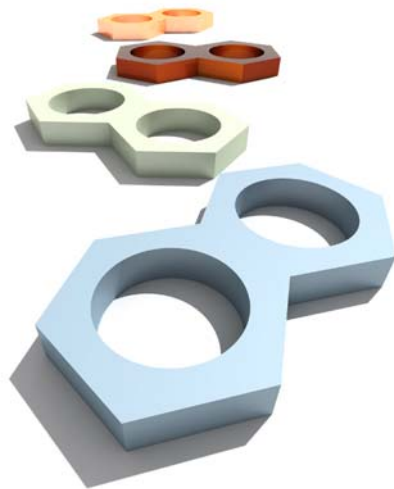
ensayos en columna se estudió que la presencia de salicilato y acetato aumentaba mucho el transporte bacteriano. Cabría esperar que en los ensayos de biodegradación este aumento del transporte debido a quimiotaxis se viese reflejado en un aumento en la biodegradación de naftaleno con respecto al control. Sin embargo, ni el salicilato ni el acetato aumentaron la biodegradación de naftaleno.

El efecto de una fuente de carbono adicional sobre la biodegradación de naftaleno fue estudiada anteriormente (Lee et al., 2003). Determinaron en cultivos con piruvato y naftaleno que no existía crecimiento diáuxico y que, por tanto, el piruvato no inhibía la biodegradación de naftaleno, sino que podía utilizarse como una fuente de carbono que se podría añadir a suelos contaminados con HAPs para estimular el crecimiento de las poblaciones indígenas del suelo y aumentar la bioremediación *in situ*. En nuestro estudio, los resultados de biodegradación en presencia de acetato no fueron estadísticamente diferentes de los resultados en ausencia del mismo. La presencia de salicilato causó una disminución en la biodegradación de naftaleno por inhibición por sustrato tanto en los ensayos en fase acuosa como los llevados a cabo en lechos saturados de arena. Las tasas de mineralización y el porcentaje final mineralizado fueron estadísticamente diferentes y menores con respecto al control.

El succinato, como se estudió anteriormente, inhibía el transporte de *Pseudomonas putida* G7. En los ensayos en lechos saturados de arena la tasa máxima de mineralización y el porcentaje final mineralizado, fueron casi el doble para los ensayos en ausencia de succinato, poniendo de manifiesto nuevamente la importancia de la movilidad bacteriana sobre la biodisponibilidad. En fase acuosa con agitación no existen diferencias en la biodegradación entre el control y los matraces con succinato, hecho que confirma, que bajo estas condiciones de agitación la quimiotaxis no ejerce ningún efecto.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES



Las conclusiones más importantes obtenidas en esta tesis son:

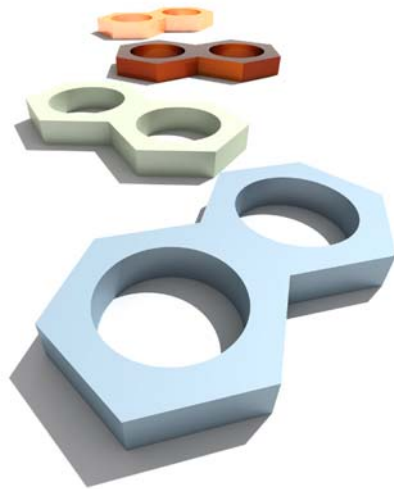
- 1. El naftaleno favorece el transporte bacteriano a través de medios porosos saturados, mientras que fluoreno y fenantreno lo inhiben ligeramente.** Estas diferencias se deben a las distintas propiedades de estos HAPs. Mientras que el naftaleno tiene una solubilidad más elevada y muy probablemente se encuentra disuelto en la fase acuosa, los otros dos hidrocarburos aromáticos policíclicos poseen una solubilidad baja y van a permanecer adsorbidos a la fase sólida, de forma que las estirpes quimiotácticas permanezcan retenidas en lugar de transportarse con la fase acuosa.
- 2. Los ácidos orgánicos quimioefectores, aumentan, en general, el transporte bacteriano a través de medios porosos saturados.** El efecto del salicilato en el transporte está notablemente afectado por las interacciones de éste con las diferentes matrices: arena, suelo o agregados de arcilla; en general el salicilato tiende a adsorberse en gran proporción al suelo, se adsorbe también aunque en menor proporción a los agregados de arcilla y no se adsorbe a la arena. De ahí que aumente el transporte bacteriano en arena, ni aumente ni disminuya el transporte a través de agregados de arcilla y disminuya el transporte en suelos. Sin embargo, el succinato provoca la reducción de la movilidad bacteriana y por tanto una inhibición del transporte bacteriano.
- 3. El tensioactivo no iónico Brij 35 aumentó de forma considerable el transporte bacteriano.** Debido a sus propiedades activas en superficie, el surfactante adsorbido puede afectar a la adhesión bacteriana, alterando las interacciones estéricas, electrostáticas e hidrofóbicas, de forma que aumente su transporte a través de medios porosos saturados.
- 4. No existe influencia positiva de distintos ácidos orgánicos en la biodegradación de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7.** En los ensayos en columna se veía que la presencia de estos quimioefectores aumentaba mucho el transporte bacteriano. Sin embargo, ni el salicilato, que produjo una disminución en la biodegradación de naftaleno por inhibición por sustrato, ni el acetato aumentaron la biodegradación de naftaleno.
- 5. La biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sistemas porosos aumenta con estirpes quimiotácticas.** Se han observado diferencias en biodegradación entre la estirpe quimiotáctica *Pseudomonas putida* G7 y la estirpe mutante no quimiotáctica *Pseudomonas putida* G7.C1 (pHG100), tanto

cuando el naftaleno está en forma de cristales como cuando está disuelto en líquidos en fase no acuosa, como son el heptametilnonano o el fuel pesado.

- 6. La selección de bacterias como inoculantes para biorremediación debe tener en cuenta, además de su capacidad quimiotáctica, el uso de quimioefectores que permitan favorecer o inhibir el transporte de acuerdo a la situación de peligro medioambiental en la que nos encontremos.** Es previsible que para contaminaciones localizadas y superficiales en suelos o acuíferos, será beneficiosa el utilizar quimioefectores que paralicen las bacterias en esa zona determinada. En cambio, el tratamiento de zonas de contaminación más dispersas y a cierta profundidas puede verse beneficiado por la presencia de sustancias que aumenten el transporte de estas estirpes quimiotácticas.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA



- Absolom, D. R.; Lamberti, F. V.; Policova, Z.; Zingg, W.; Van Oss, C. J.; Neumann, A. W. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46*, 90-97.
- Adler, J. Chemoreceptors in bacteria. *Science* **1969**, *166*, 1588-1597.
- Adler, J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **1973**, *98*, 77-91.
- Ahn, I.-S.; Ghiorse, W. C.; Lion, L. W.; Shuler, M. L. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 587-594.
- Alexander, M. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press: San Diego, CA, 1999.
- Alexander, M. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnol. Bioeng.* **1973**, *15*, 611-647.
- Alexandre, G.; Zhulin, I.B. More than one way to sense chemicals. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4681-4686.
- Alexandre, G.; Greer-Phillips, S.; Zhulin, I. B. Ecological role of energy taxis in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 113-126.
- Armitage, J. P. Behavioural responses of bacteria to light and oxygen. *Arch. Microbiol.* **1997**, *168*, 249-261.
- Barak, R.; Eisenbach, M. Fumarate or a Fumarate Metabolite Restores Switching Ability to Rotating Flagella of Bacterial Envelopes. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 643-645.
- Barak, R.; Giebel, I.; Eisenbach, M. The specificity of fumarate as a switching factor of the bacterial flagellar motor. *Mol. Microbiol.* **1996**, *19*, 139-144.
- Barton, J. W.; Ford, R. M. Determination of effective transport coefficients for bacterial migration in sand columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3329-3335.

Barton, J. W.; Ford, R. M. Mathematical model for characterization of bacterial migration through sand cores. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *53*, 487-496.

Bayard, R.; Barna, L.; Mahjoub, B.; Gourdon, R. Investigation of naphthalene sorption in soils and soil fractions using batch and column assays. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 2383-2390.

Bendinger, B.; Rijnaarts, H. H. M.; Altendorf, K.; Zehnder, A. J. B. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3973-3977.

Bezalel, L.; Hadar, Y.; Cerniglia, C. E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 292-295.

Bialek, W.; Setayeshgar, S. Physical limits to biochemical signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 10040-10045.

Bosma, T. N. P.; Schnoor, J. L.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B. Simulation model for biotransformation of xenobiotics and chemotaxis in soil columns. *J. Contam. Hydrol.* **1988**, *2*, 225-236.

Bouchez, M.; Blanchet, D.; Vandecasteele, J.-P. Substrate availability in phenanthrene biodegradation: transfer mechanism and influence on metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 952-960.

Brown, D. G.; Jaffé, P. R. Effects of nonionic surfactants on bacterial transport through porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 3877-3883.

Budrene, E. O.; Berg, H. C. Dynamics of formation of symmetrical patterns by chemotactic bacteria. *Nature* **1995**, *376*, 49-53.

Bueno-Montes, M. Biorrecuperación de suelos contaminados: Influencia de los agentes tensioactivos en la biodisponibilidad microbiana de hidrocarburos aromáticos policíclicos, Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla 2005.

Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H.; van der Mei, H. C.; Pelt, A. J. W.; de Jong, H. P.; Arends, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *48*, 980-983.

Caetano-anollés, G.; Wall, L. G.; De Micheli, A. T.; Macchi, E. M.; Bauer, W. D.; Favelukes, G. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **1988**, *86*, 1228-1235.

Camesano, T. A.; Logan, B. E. Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 1699-1708.

Carroquino, M. J.; Alexander, M. Factors affecting the biodegradation of phenanthrene initially dissolved in different nonaqueous-phase liquids. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 265-270.

Celis, R.; Real, M.; Hermosin, M. C.; Cornejo, J. Sorption and leaching behaviour of polar aromatic acids in agricultural soils by batch and column leaching tests. *Eur. J. Soil Sci.* **2005**, *56*, 287-297.

Cerniglia, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* **1984**, *30*, 31-71.

Cerniglia, C. E.; Heitkamp, M. A Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*; Varanasi, U., Ed; CRC Press, Boca Raton, FL: USA, 1989; pp 41-68.

Cerniglia, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **1992**, *3*, 351-368.

Chen, C. S. H.; Delfino, J. J.; Rao, P. S. C. Partitioning of organic and inorganic components from motor oil into water. *Chemosphere* **1994**, *28*, 1385-1400.

Chen, S.-H.; Aitken, M. D. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 435-439.

Chu, W.; Chan, K. H. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *Sci. Total Environ.* **2003**, *307*, 83-92.

Clayton, R. K. On the interplay of environmental factors affecting taxis and motility in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* **1958**, *29*, 189-212.

Coates, J. D.; Woodward, J.; Allen, J.; Philp, P.; Lovley, D. R. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3589-3593.

Colbert, S. F.; Isakeit, T.; Ferri, M.; Weinhold, A. R.; Hendson, M.; Schroth, M. N. Use of an exotic carbon source to selectively increase metabolic activity and growth of *Pseudomonas putida* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993a**, *59*, 2056-2063.

Colbert, S. F.; Schroth, M. N.; Weinhold, A. R.; Hendson, M. Enhancement of population densities of *Pseudomonas putida* PpG7 in agricultural ecosystems by selective feeding with the carbon source salicylate. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993b**, *59*, 2064-2070.

Curl, E. A. The Rhizosphere. Springer-Verlag: Berlin, 1986.

Currier, W. W.; Strobel, G. A. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to plant root exudates. *Plant Physiol.* **1976**, *57*, 820-823.

Currier, W. W.; Strobel, G. A. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to a glycoprotein produced by Birdsfoot trefoil roots. *Science* **1977**, *196*, 434-436.

Currier, W. W.; Strobel, G. A. Characterization and biological activity of trefoil chemotactin. *Plant Sci. Lett.* **1981**, *21*, 159-165.

Davis, J. I.; Evans, W. C. Oxidative metabolism of naphthalene by soil Pseudomonads. The ring-fission mechanism. *Biochem. J.* **1964**, *91*, 251-261.

DeLeon, I. R.; Ferrario, J. B.; Byrne, C. J. Bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by the clam, *Rangia cuneata*, in the vicinity of a creosote spill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1988**, *41*, 872-879.

Déziel, E.; Paquette, G.; Villemur, R.; Lépine, F.; Bisailon, J.-G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1908-1912.

Dillon, R.; Fauci, L.; Gaver, D. A microscale model of bacterial swimming, chemotaxis and substrate response. *J. Theor. Biol.* **1995**, *177*, 325-340.

Dubus, I. G.; Barriuso, E.; Calvet, R. Sorption of weak organic acids in soils: clofencet, 2,4-D and salicylic acid. *Chemosphere* **2001**, *45*, 767-774.

- Duffy, K. J.; Cummings, P. T.; Ford, R. M. Random walk calculations for bacterial migration in porous media. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 800-806.
- Duffy, K. J.; Ford, R. M.; Cummings, P. T. Residence time calculation for chemotactic bacteria within porous media. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2930-2936.
- Dunn, N. W.; Gunsalus, I. C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **1973**, *114*, 974-979.
- Eaton, R. W. Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: sequence of the DNA encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase and *trans*-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase from the NAH7 plasmid. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 7757-7762.
- Edwards, D. A.; Luthy, R. G.; Liu, Z. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solution. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 127-133.
- Edwards, D. A.; Adeel, Z.; Luthy, R. G. Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 1550-1560.
- Efroymsen, R. A.; Alexander, M. Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 1172-1179.
- Eisenbach, M. Bacterial chemotaxis. In *Nature Encyclopedia of Life Sciences*; Nature Publishing Group, 2001; pp 1-14.
- El Fantroussi, S.; Agathos, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opinion Microbiol.* **2005**, *8*, 268-275.
- Engelmann, T. W. Eine neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen. *Arch. Physiol.* **1881**, *25*, 285-292.
- Fesch, C. Transport of organic pollutants in aggregated porous media: effects of nonlinear and competitive sorption under saturated and unsaturated conditions, Ph.D. Thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland 1997.

Fleer, G. J.; Scheutjens, J. M. H. M. Modeling polymer adsorption, steric stabilization and flocculation. In *Coagulation and flocculation*; Dobias, B., Ed; Marcel Dekker Inc.: New York, 1993; pp 209-263.

Frymier, P. D.; Ford, R. M.; Berg, H. C.; Cummings, P. T. Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1995**, *92*, 6195-6199.

Fuerst, J. A.; Hayward, A. C. Surface appendages similar to fimbriae (pili) on *Pseudomonas* species. *J. Gen. Microbiol.* **1969**, *58*, 227-237.

García, J. M.; Wick, L. Y.; Harm, H. Influence of the nonionic surfactant Brij 35 on the bioavailability of solid and sorbed Dibenzofuran. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 2033-2039.

Garcia-Junco, M.; De Olmedo, E.; Ortega-Calvo, J. J. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 561-569.

Garrity, G. M.; Bell, J. A.; Lilburn, T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2, The proteobacteria. Part B The Gammaproteobacteria. 2nd Edition. Garrity, G.M., Ed; Springer: New York, 2005; pp 323-365.

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

Gee, G. W.; Bauder, J. W. Particle-size Analysis. In *Methods of Soil Analysis*; Klute, A. Ed; Monografía nº9 de la serie Agronomy. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1986; pp 383-411.

Ghosal, D.; You, I.-S.; Gunsalus, I. C. Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xyIE* of TOL pWWO. *Gene* **1987**, *55*, 19-28.

Gibson, D. T.; Mahadevan, V.; Jerina, D. M.; Yagi, H.; Yeh, H. J. C. Oxidation of carcinogens benz[a]pyrene and benz[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science* **1975**, *189*, 295-297.

- Gibson, D. T.; Subramanian, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In *Microbial degradation of organic compounds*; Gibson, D. T., Ed; Marcel Dekker Inc.: New York, 1984; pp 181-242.
- Gilbert, E. S.; Crowley, D. E. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 1933-1938.
- Gitte, R. R.; Rai, P. V.; Patil, R. B. Chemotaxis of *Rhizobium* sp. towards root exudate of *Cicer arietinum* L. *Plant Soil* **1978**, *50*, 553-566.
- Gordon, A. S.; Gerchakov, S. M.; Millero, F. J. Effects of inorganic particles on metabolism by periphytic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *45*, 411-417.
- Grimm, A. C.; Harwood, C. S. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4111-4115.
- Grimm, A. C.; Harwood, C. S. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3310-3316.
- Guerin, W. F.; Boyd, S. A. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 1142-1152.
- Guerin, W. F.; Boyd, S. A. Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents. *Water Res.* **1997**, *31*, 1504-1512.
- Guha, S.; Jaffé, P. R. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of non-ionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 605-611.
- Guha, S.; Jaffé, P. R.; Peters, C. A. Solubilization of PAH mixtures by a nonionic surfactant. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 930-935.
- Harms, H.; Zehnder, A. J. B. Influence of substrate diffusion on degradation of dibenzofuran and 3-chlorodibenzofuran by attached and suspended bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2736-2745.
- Harms, H.; Zehnder, A. J. B. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 27-33.

Harms, H.; Bosma, T. N. P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *18*, 97-105.

Harwood, C. S.; Rivelli, M.; Ornston, N. Aromatic acids are chemoattractants for *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **1984**, *160*, 622-628.

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

Heitkamp, M. A.; Cerniglia, C. E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1612-1614.

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

Jackson, T. J.; Wade, T. L.; McDonald, T. J.; Wilkinson, D.; Brooks, J. M. Polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in oysters from the gulf of Mexico. *Environ. Pollut.* **1994**, *83*, 291-298.

Jeffrey, W. H.; Paul, J. H. Activity of an attached and free-living *Vibrio* sp. as measured by Thymidine incorporation, p-Iodonitrotetrazolium reduction, and ATP/DNA ratios. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 150-156.

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

Kaplan, C. W.; Kitts, C. L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1777-1786.

Kibbey, T. C. G.; Hayes, K. F. A multicomponent analysis of the sorption of polydisperse ethoxylated nonionic surfactants to aquifer materials: equilibrium sorption behavior. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 1171-1177.

Kim, I.; Park, J.-S.; Kim, K.-W. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Appl. Geochem.* **2001**, *16*, 1419-1428.

Kim, M. J.; Breuer, K. Controlled Mixing in Microfluidic Systems Using Bacterial Chemotaxis. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 955-959.

- Kush, A. K.; Dadarwal, K. R. Root exudates as pre-invasive factors in the nodulation of chick pea varieties. *Soil Biol. Biochem.* **1981**, *13*, 51-55.
- Laha, S.; Luthy, R. G. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactant in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 1920-1930.
- Laha, S.; Luthy, R. G. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of Phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 1367-1380.
- Lahlou, M.; Harms, H.; Springael, D.; Ortega-Calvo, J. J. Influence of soil components on the transport of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria through saturated porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 3649-3656.
- Law, A. M. J.; Aitken, M. D. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5968-5973.
- Lee, J.; Hundal, L. S.; Horton, R.; Thompson, M. L. Sorption and transport behavior of naphthalene in an aggregated soil. *J. Environ. Qual.* **2002**, *31*, 1716-1721.
- Lee, K.; Park, J.-W.; Ahn, I.-S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. *J. Hazard. Mater.* **2003**, *235*, 157-167.
- Liste, H. H.; Alexander, M. Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere* **2000**, *40*, 11-14.
- Liu, Z.; Jacobson, A. M.; Luthy, R. G. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 145-151.
- M.A.P.A. Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos fertilizantes, suelos, agua, productos fitosanitarios y fertilizantes inorgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, 1986.
- Martin, R. E.; Bouwer, E. J.; Hanna, L. M. Application of clean-bed filtration theory to bacterial deposition in porous media. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*, 1053-1058.
- Marwan, W.; Schäfer, W.; Oesterhelt, D. Signal transduction in *Halobacterium* depends on fumarate. *EMBO J.* **1990**, *9*, 355-362.

Marx, R. B.; Aitken, M. D. Quantification of chemotaxis to naphthalene by *Pseudomonas putida* G7. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2847-2852.

Marx, R. B.; Aitken, M. D. A Material-balance approach for modeling bacterial chemotaxis to a consumable substrate in the capillary assay. *Biotechnol. Bioeng.* **2000a**, *68*, 308-315.

Marx, R. B.; Aitken, M. D. Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* **2000b**, *34*, 3379-3383.

McClaine, J. W.; Ford, R. M. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1280-1289.

Meharg, A. A. A critical review of labelling techniques used to quantify rhizosphere carbon-flow. *Plant Soil* **1994**, *166*, 55-62.

Mihelcic, J. R.; Luthy, R. G. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soils-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1188-1198.

Miller, R. V.; Poindexter, J. S. Strategies and Mechanisms for Field Research in Environmental Bioremediation; *American Academy of Microbiology: San Antonio, TX*. 1993.

Montrone, M.; Eisenbach, M.; Oesterhelt, D.; Marwan, W. Regulation of Switching frequency and bias of the bacterial flagellar motor by CheY and fumarate. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3375-3380.

Nakahara, T.; Erickson, L. E.; Gutierrez, J. R. Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 9-25.

Ogram, A. V.; Jessup, R. E.; Ou, L.-T.; Rao, P. S. C. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *49*, 582-587.

Olson, M. S.; Ford, R. M.; Smith, J. A.; Fernandez, E. J. Quantification of bacterial chemotaxis in porous media using magnetic resonance imaging. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 3864-3870.

Ortega-Calvo, J. J.; Alexander, M. Roles of Bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2643-2646.

Ortega-Calvo, J. J.; Birman, I.; Alexander, M. Effect of varying the rate of partitioning of phenanthrene in nonaqueous-phase liquids on biodegradation in soil slurries. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2222-2225.

Ortega-Calvo, J. J.; Saiz-Jimenez, C. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3123-3126.

Ortega-Calvo, J. J.; Fesch, C.; Harms, H. Biodegradation of sorbed 2,4-dinitrotoluene in a clay-rich, aggregated porous medium. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3737-3742.

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

Packer, H. L.; Armitage, J. P. Behavioural responses of *Rhodobacter sphaeroides* to linear gradients of the nutrients succinate and acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000a**, *66*, 5186-5191.

Packer, H. L.; Armitage, J. P. Inverted behavioural responses in wild-type *Rhodobacter sphaeroides* to temporal stimuli. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000b**, *185*, 299-304.

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

Parales, R. E.; Harwood, C. S. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr. Opinion Microbiol.* **2002**, *5*, 266-273.

Park, J.-H.; Zhao, X.; Voice, T. C. Comparison of biodegradation kinetic parameters for naphthalene in batch and sand column systems by *Pseudomonas putida*. *Environ. Progress.* **2001**, *20*, 93-102.

Park, S.; Wolanin, P. M.; Yuzbashyan, E. A.; Silberzan, P.; Stock, J. B.; Austin, R. H. Motion to Form a Quorum. *Science* **2003**, *301*, 188.

Park, W.; Jeon, C. O.; Cadillo, H.; DeRito, C.; Madsen, E. L. Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 429-435.

Pearlman, R. S.; Yalkowsky, S. H.; Banerjee, S. Water solubilities of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds. *J. Phys. Chem.* **1984**, *13*, 555-562.

Pedit, J. A.; Marx, R. B.; Miller, C. T.; Aitken, M. D. Quantitative analysis of experiments on bacterial chemotaxis to naphthalene. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 626-634.

Pfeffer, W. Locomotorische richtungsbewegungen durch chemische rizee. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **1884**, *1*, 524-533.

Piskonen, R.; Itävaara, M. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *65*, 627-634.

Platt, A.; Shingler, V.; Taylor, S. C.; Williams, P. A. The 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase and acetaldehyde dehydrogenase (acylating) encoded by the *nahM* and *nahO* genes of the naphthalene catabolic plasmid pWW60-22 provide further evidence of conservation of *meta*-cleavage pathway gene sequences. *Microbiology* **1995**, *141*, 2223-2233.

Prabhu, Y.; Phale, P. S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 342-351.

Prak, D. J. L.; Pritchard, P. H. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in micellar nonionic surfactant solutions. *Water Res.* **2002**, *36*, 3463-3472.

Prasad, K.; Caplan, S. R.; Eisenbach, M. Fumarate modulates bacterial flagellar rotation by lowering the free energy difference between the clockwise and counterclockwise states of the motor. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 821-828.

Rajagopalan, R.; Tien, C. Trajectory analysis of deep-bed filtration with the sphere-in-cell porous media model. *AIChE J.* **1976**, *22*, 523-533.

Ramia, M.; Tullock, D. L.; Phan-Thien, N. The role of hydrodynamic interaction in the locomotion of microorganisms. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 755-778.

Reynolds, P. J.; Sharma, P.; Jenneman, G. E.; McInerney, M. J. Mechanisms of microbial movement in subsurface materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2280-2286.

Rijnaarts, H. H. M.; Norde, W.; Bouwer, E. J.; Lyklema, J.; Zehnder, A. J. B. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3255-3265.

Rijnaarts, H. H. M.; Norde, W.; Bouwer, E. J.; Lyklema, J.; Zehnder, A. J. B. Bacterial deposition in porous media related to the clean bed collision efficiency and to substratum blocking by attached cells. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 2869-2876.

Robinson, J. B.; Bauer, W. D. Relationships between C4 dicarboxylic acid transport and chemotaxis in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2284-2291.

Rutter, P. R.; Vincent, B. 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, 1980; pp 79-93.

Rutter, P. R.; Vincent, B. Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms, and the fluid phase. In *Microbial adhesion and aggregation*; Marshall, K. C., Ed; Springer-verlag: Berlin, 1984; pp 21-38.

Samanta, S. K.; Jain, R. K. Evidence for plasmid-mediated chemotaxis of *Pseudomonas putida* towards naphthalene and salicylate. *Can. J. Microbiol.* **2000**, *46*, 1-6.

Sen, T. K.; Das, D.; Khilar, K. C.; Suraishkumar, G. K. Bacterial transport in porous media: New aspects of the mathematical model. *Coll. Surf. A - Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, *260*, 53-62.

Serdar, C. M. Plasmid involvement in the metabolism of naphthalene and parathion by *Pseudomonas* strains, Ph. D. Thesis. University of Texas at Austin, Austin 1985.

Sharma, P. K.; McInerney, M. J.; Knapp, R. M. In situ growth and activity and modes of penetration of *Escherichia coli* in unconsolidated porous materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3686-3694.

Shimp, J. F.; Tracy, J. C.; Davis, L. C.; Lee, E.; Huang, W.; Erickson, L. E. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **1993**, *23*, 41-77.

Sikkema, J.; De Bont, J. A. M.; Poolman, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 201-222.

Simon, M. J.; Osslund, T. D.; Saunders, R.; Ensley, B. D.; Suggs, S.; Harcourt, A.; Suen, W.-C.; Cruden, D. L.; Gibson, D. T.; Zylstra, G. J. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene* **1993**, *127*, 31-37.

Slater, J. H. Microbial population and community dynamics. In *Micro-organisms in action: concepts and applications in microbial ecology*. Lynch, J. M., Hobbie, J. E., Eds; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1988; pp 52-62.

Soby, S.; Bergman, K. Motility and chemotaxis of *Rhizobium meliloti* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *46*, 995-998.

Stanier, R. Y.; Palleroni, N. J.; Doudoroff, M. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **1966**, *43*, 159-273.

Szurmant, H.; Ordal, G. W. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 301-319.

Taylor, B. L.; Zhulin, I. B. In search of higher energy: metabolism dependent behaviour in bacteria. *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 683-690.

Taylor, B. L., Zhulin, I. B., and Johnson, M. S. Aerotaxis and other energy-sensing behaviour in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 103-128.

Thomas, J. M.; Alexander, M. Colonization and mineralization of palmitic acid by *Pseudomonas pseudoflava*. *Microb. Ecol.* **1987**, *14*, 75-80.

Tiehm, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 258-263.

Tufenkji, N.; Miller, G. F.; Ryan, J. N.; Harvey, R. W.; Elimelech, M. Transport of *Cryptosporidium* Oocysts in porous media: Role of straining and physicochemical filtration. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 5932-5938.

U.S. EPA. Summary review of health effects associated with naphthalene. EPA/600/8-87/055F, Office of Health and Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C, 1987.

Urbieta-Garagorri, M. T.; Egiarte-Intxaurza, I.; Uria-Navaridas, E. Optimization of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in road asphalts by HPLC with fluorimetric detection. *Química Analítica* **1999**, *18*, 197-202.

Van Loosdrecht, M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987a**, *53*, 1898-1901.

Van Loosdrecht, M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987b**, *53*, 1893-1897.

Van Loosdrecht, M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Zehnder, A. J. B. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb. Ecol.* **1989**, *17*, 1-15.

Van Loosdrecht, M. C. M.; Norde, W.; Lyklema, J.; Zehnder, A. J. B. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquat. Sci.* **1990**, *52*, 103-114.

Van Oss, C. J.; Good, R. J.; Chaudhury, M. K. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces. *J. Coll. Interf. Sci.* **1986**, *111*, 378-390.

Van Oss, C. J. The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles-their determination and relative roles. *Biofouling* **1991**, *4*, 25-35.

Van Oss, C. J. Interfacial forces in aqueous media. Marcel Dekker, Inc.: New York, 1994; pp 207.

Van Oss, C. J. Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. *Coll. Surf. B: Biointerf.* **1995**, *5*, 91-110.

Volkering, F.; Breure, A.; Andel, J.; Rulkens, W. Influence of non-ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1699-1705.

Wattiau, P.; Bastiaens, L.; van Herwijnen, R.; Daal, L.; Parsons, J. R.; Renard, M.-E.; Springael, D.; Cornelis, G. R. Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis. *Res. Microbiol.* **2001**, *152*, 861-872.

Whipps, J. M.; Lynch, J. M. Energy losses by the plant in rhizodeposition. *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **1985**, *26*, 59-71.

Wick, L. Y.; de Munain, A. R.; Springael, D.; Harms, H. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of soil anthracene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 378-385.

Wild, S. R.; Berrow, M. L.; McGrath, S. P.; Jones, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. *Environ. Microbiol.* **1992**, *76*, 25-32.

Wilson, S. C.; Jones, K. C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* **1993**, *81*, 229-249.

Witt, M. E.; Dybas, M. J.; Worden, R. M.; Criddle, C. S. Motility-enhanced bioremediation of carbon tetrachloride-contaminated aquifer sediments. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 2958-2964.

Yen, K.-M.; Serdar, C. M. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. *Crit. Rev. Microbiol.* **1988**, *15*, 247-268.

You, I.-S.; Ghosal, D.; Gunsalus, I. C. Nucleotide sequence of plasmid NAH7 gene *nahR* and DNA binding of the *nahR* product. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 5409-5415.

You, I.-S.; Ghosal, D.; Gunsalus, I. C. Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (*nahG*) and its 39-flanking region. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1635-1641.

Zaval'skii, L. Y.; Marchenko, A. I.; Borovik, R. V. The study of bacterial chemotaxis to naphthalene. *Microbiology* **2003a**, *72*, 407-413.

Zaval'skii, L. Y.; Voloshin, A. G. Bacterial motion in porous media. *Microbiology* **2003b**, 72, 369-372.

Zhang, Y.; Walter, J.; Miller, R. M. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 2211-2217.

Zhulin, I. B.; Tretyakova, S. E.; Ignatov, V. V. Chemotaxis of *Azospirillum brasilense* towards compounds typical of plant root exudates. *Folia Microbiol.* **1988**, 33, 277-280.

