

Cod. Barras/ 244419

N.º R. ALEPH 1018876
N.º R. Bib. 5322
Signat. M/CI-40 Velasco

BIORREMEDIACIÓN: BIODISPONIBILIDAD DE XENOBIÓTICOS EN SUELOS. PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS BACTERIANA.

**TRABAJO REALIZADO DURANTE EL XL CURSO INTERNACIONAL DE
EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA VEGETAL**

PATRICIA VELASCO CASAL
(Licenciada en Química)

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA**

VELASCO
M/CI-40
2003

Julio de 2003



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jose Julio Ortega Calvo, por su acogida, valiosa ayuda prestada desde el principio y por su acertada labor de dirección, ayuda y asesoramiento en la elaboración de este proyecto, así como por sus consejos y conocimientos transmitidos.

Al Dr. Luis Clemente, coordinador del Curso Internacional de Edafología y Biología Vegetal por facilitarme el acceso a este curso.

A Manuel por su inestimable apoyo en todo, inagotable paciencia y por los momentos que pasamos realizando este proyecto.

A todo el personal del laboratorio, en especial a Marisa, Rosa, Jose Luis, César y Agüi por la ayuda y amistad que me brindaron en todo momento

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA DEGRADACIÓN DE LOS CONTAMINANTES	6
I.1.1 Bacterias	8
I.1.2 Quimiotaxis bacteriana	9
I.1.3 Mecanismos de degradación de los HPAs	10
I.2 LÍQUIDOS EN FASE NO ACUOSA (NAPLS)	12
II. OBJETIVOS	14
III. MATERIALES Y METODOLOGÍA	15
III.1 REACTIVOS	15
III.2 BACTERIAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	15
III.3 EXPERIMENTOS DE QUIMIOTAXIS	16
III.3.1 Ensayo capilar	16
III.3.1.1 Conteo de viables	17
III.3.1.2 Microscopía óptica	20

III.3.2 Matrices biométricos	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
IV.1 EXPERIMENTOS DE QUIMIOTAXIS	23
IV.1.1 Ensayo capilar	23
IV.1.1.1 Conteo de viables	23
IV.1.1.2 Microscopía óptica	27
IV.1.2 Matrices biométricos	30
V. CONCLUSIONES GENERALES	33
VI. BIBLIOGRAFÍA	34

I. INTRODUCCIÓN

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 o su presencia en fases líquidas libres (o *NAPLs*) 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, a tiempos y costes razonables, los niveles de calidad del suelo establecidos por los organismos reguladores.

Los microorganismos degradadores son capaces, potencialmente, de superar esta limitación, a través de mecanismos específicos, tales como adhesión y la producción de tensioactivos biológicos. La quimiotaxis es 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 substratos, incluso en situaciones de contaminación masiva. La capacidad de localizar gradientes 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, su papel en la biodisponibilidad en suelos es un tema relativamente poco explorado.

En los últimos años, muchos países europeos, al igual que Estados Unidos y Canadá han coincidido en el hecho de afrontar un serio problema de degradación del suelo y de sus aguas subterráneas. Esta situación es el resultado de más de 150 años de actividad industrial, desarrollada con una concienciación ambiental limitada, y que ha provocado que, por ignorancia o falta de recursos, se hayan vertido grandes cantidades de contaminantes al ambiente. Este deterioro ha sido la alarma que ha despertado la preocupación de los dirigentes, obligando a estos últimos a pensar sobre las medidas que hay que plantear para preservar algunos recursos bastante escasos en determinadas ocasiones.

En general, los compuestos orgánicos comúnmente presentes en los emplazamientos contaminados no se encuentran individualmente sino como mezclas simples o complejas. Estas mezclas pueden estar relacionadas con la liberación, el almacenamiento o el transporte de muchos compuestos en aguas superficiales o subterráneas, en sistemas de tratamiento de residuos, y en suelos y sedimentos. El número de los productos químicos encontrados hasta ahora es enorme y los tipos de mezclas son también incalculables. Las concentraciones de los compuestos individuales varían bastante, y pueden ser más de 1 g/l de agua o 1 g/kg de suelo en las zonas sujetas a derrames desde tanques de coches y camiones, a la descarga de residuos industriales o a los escapes desde el almacén o el depósito de los productos industriales. En cambio, las concentraciones pueden ser tan bajas como 1 µg/l de agua o 1 µg/kg de suelo, a cierta distancia del punto del derrame o de almacenamiento. Aunque estas concentraciones son bajas, algunos productos químicos son tóxicos; además, algunos productos químicos a bajas concentraciones son sujetos de bioamplificación y pueden alcanzar niveles que tienen efectos perjudiciales sobre los humanos, los animales y las plantas.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son unos de los contaminantes del medio ambiente con mayor presencia en los suelos, poseyendo un gran potencial cancerígeno y mutágeno. Las vías de exposición humana a los HPAs son la aspiración (la respiración del aire contaminado), la ingestión (bebidas y comida contaminada) y la absorción por la piel. Debido a su naturaleza hidrófoba, los HPAs pueden migrar atravesando las membranas lipídicas de la célula y pueden concentrarse en los tejidos grasos. 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 en la cadena alimentaria.

Los HPAs son moléculas que están constituidas de dos o más anillos aromáticos, pudiendo además estar presentes otras estructuras tales como anillos alifáticos (Fig 1). Las características químicas de estas moléculas, tales como la ausencia de grupos polares, hacen que estos compuestos sean muy hidrófobos, lo que se refleja en su baja solubilidad en agua y en la tendencia a adsorberse a la superficie de las partículas orgánicas, o a estar en la fase líquida no acuosa de las zonas contaminadas (Cerniglia, 1992) (Harms & Zehnder, 1995). La hidrofobicidad de los HPAs se traduce en valores altos de sus coeficientes de reparto octanol-agua (Kow) (Tabla. 1). Con el aumento del peso molecular, la hidrofobicidad aumenta, provocando una disminución en la concentración en el agua de los HPAs de gran peso molecular.

Una serie de procesos, incluyendo 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 HPAs en el medio ambiente (Cerniglia & Heitkamp, 1989) (Cerniglia, 1992). Una serie de bacterias, de hongos y de algas pueden metabolizar los HPAs, llevando a cabo su mineralización, especialmente los

HPAs de bajo peso molecular, o su transformación parcial mediante cometabolismo, particularmente los HPAs de gran peso molecular (Gibson & Subramanian, 1984) (Cerniglia & Heitkamp, 1989) (Wilson & Jones, 1993).

Tabla 1: Pesos moleculares (PM), solubilidades en agua (S), coeficientes de reparto octanol-agua y coeficientes de sorción de algunos HPAs y benceno

HPA	PM [g/mol]	S [Kg/m ³] ^{d,b}	Koc	Log Kow ^c
Benceno	78	1780 ^a	83 ^a	2.13 ^a
Naftaleno	128	31.7	1300 ^a	3.35
Fluoreno	166	1.98		4.18
Fenantreno	178	1.29	23000 ^a	4.57
Antraceno	178	7.30.10 ⁻²	26000 ^a	4.54
Pireno	202	1.35.10 ⁻¹	84000 ^a 62700 ^b	5.18
Fluoranteno	202	2.60.10 ⁻¹		5.22
Criseno	228	2.0.10 ⁻³		5.79

^a Karickhoff et al., 1979; ^b Means et al., 1980; ^c Miller & Wasik, 1985; ^d Dzombak & Luthy, 1984.

El naftaleno es un contaminante prioritario comúnmente encontrado en efluentes industriales y es un constituyente del alquitrán. A menudo se usa como un componente modelo para estudios de biodegradación in situ de hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) porque es degradado por las bacterias relativamente fácil. La relativa alta solubilidad del naftaleno comparada a las del resto de PAHs y el hecho de que los genes de la degradación de naftaleno son codificados por plásmidos ha contribuido a un paso rápido en la investigación en el laboratorio en la degradación de naftaleno

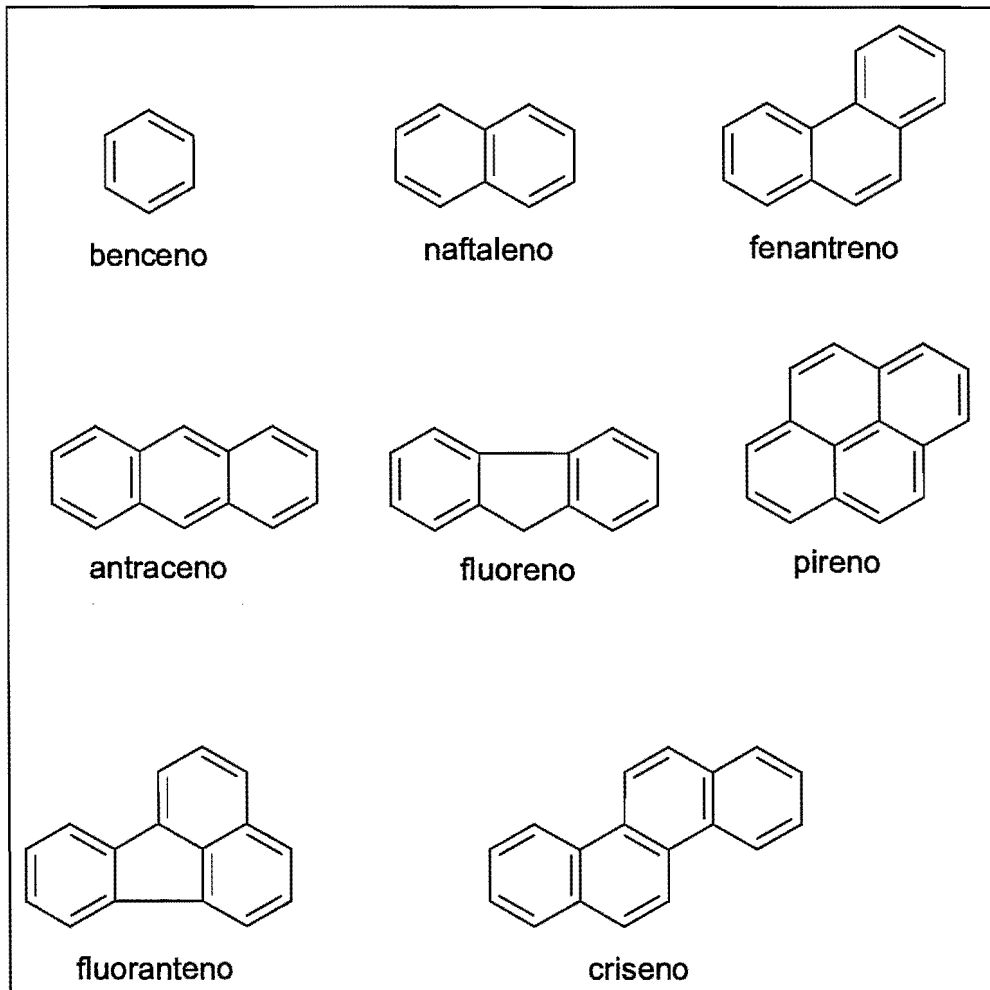


Fig 1: estructura química de algunos HPAs y el benceno.

I.1 Importancia de los microorganismos en la degradación de los contaminantes.

Visto el coste alto de las técnicas fisicoquímicas de remediación de los suelos contaminados, tal como la incineración, la extracción con solventes, la extracción en fase sólida y la oxidación química a través del uso de oxidantes fuertes como el gas ozono (Brown et al., 1995) el peróxido de hidrógeno, o el reactivo de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4$) (Paterek et al., 1994) (Liu et al., 1994), se han orientado los estudios a buscar soluciones alternativas.

El conjunto de información disponible sugiere que el mayor agente que causa las transformaciones biológicas en suelos, sedimentos, agua residuales, aguas subterráneas y de superficie y muchas otras zonas son los microorganismos que habitan estos ambientes. En efecto, frecuentemente los microorganismos son los únicos agentes que transforman los compuestos químicos sintéticos a productos inorgánicos, proceso que es conocido como mineralización. Alexander ha postulado que deben cumplirse varias condiciones para que la biodegradación pueda tener lugar en un ambiente: 1/ Debe estar presente un organismo con los enzimas necesarios para realizar la biodegradación. 2/ El compuesto químico debe ser accesible al organismo que tiene los enzimas necesarios. 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 el enzima inicial que provoca la degradación es extracelular, los enlaces químicos sobre los que actúa el 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 los enzimas que catalizan la degradación inicial son intracelulares, la molécula debe penetrar la superficie de la célula hasta la zona interna donde el enzima actúa. Alternativamente, los productos de una reacción extracelular

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 (Alexander, 1973).

En muchos trabajos se han considerado los diferentes estados físicos en los que puede encontrarse un substrato a la hora de su biodegradación. Por ejemplo, Ogram et al. (Ogram et al., 1985) han estudiado la degradación del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético en los suelos, y han encontrado que las bacterias adheridas y suspendidas son capaces de degradar solamente los compuestos en solución, estando el compuesto adsorbido protegido de la biodegradación. El compuesto aromático naftaleno, adsorbido a una variedad de sorbentes naturales y sintéticos, es mineralizado por dos bacterias distintas a través de distintos mecanismos: Para una bacteria, la adsorción ha limitado a la vez la tasa y la amplitud de mineralización de naftaleno, en acuerdo con los valores que predicen las concentraciones de naftaleno en la fase acuosa en equilibrio, mientras que la otra bacteria ha presentado una tasa y amplitud de mineralización que excede los valores predichos, provocando un aumento de las tasas de desorción de naftaleno a partir de los sorbentes estudiados (Guerin & Boyd, 1992) (Guerin & Boyd, 1997). Harms y Zehnder han propuesto (Harms & Zehnder, 1995), 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. La importancia de la adhesión microbiana a la fuente de compuesto químico que se degrada ha sido demostrada no solamente para compuestos adsorbidos sino también para compuestos químicos sólidos (Thomas & Alexander, 1987) y

líquidos (Nakahara et al., 1977), así como disueltos en fases líquidas no acuosas (NAPLs) (Ortega-Calvo & Alexander, 1994).

I.1.1 Bacterias

Las bacterias son el grupo de organismos más abundantes en los suelos. Miles de especies han sido identificadas en suelos del mundo y la existencia de varios millones más de especies probablemente no ha sido identificada. El número de bacterias y la presencia de especies dominantes presentes es una función de las características del suelo y los ambientes específicos. Las bacterias son un grupo extremadamente diverso de organismos con variaciones extensivas de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas y son los degradadores primarios de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos encontrados en el suelo.

Las bacterias se clasifican usando sus características físicas, químicas, genéticas y metabólicas. El uso y tolerancia al oxígeno es uno de los métodos más generales de clasificación. Los géneros más comunes de bacterias en el suelo son *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Crynebacterium* y *Flavobacterium*.

El crecimiento celular se define simplemente como un incremento en el número de microorganismos por unidad de tiempo. El ciclo de crecimiento típico para una población bacteriana en un sistema discontinuo o cerrado consta de: fase de latencia, crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. El crecimiento mide el cambio en el número de células o en la masa celular. El número de células se mide de dos formas: medios de cultivo y microscopía.

I.1.2 Quimiotaxis bacteriana.

La quimiotaxis favorece la capacidad de las bacterias móviles para localizar y degradar concentraciones bajas de compuestos orgánicos, y es razonable esperar que también dirige el movimiento de las bacterias móviles hacia los compuestos tóxicos pero metabolizables, presentes en ambientes contaminados. Actualmente se sabe que algunas bacterias flageladas tienen sistemas específicos para detectar y responder de forma adecuada frente a contaminantes presentes en medios aerobios a través de este proceso. Se ha especulado que la quimiotaxis puede acelerar la biodegradación de distintas formas. La primera y más obvia, es que la quimiotaxis es capaz de poner en contacto a las células con el producto químico que va a degradar. Y por tanto, las limitaciones en biodisponibilidad debidas a limitaciones en transferencia de masas, baja solubilidad o adhesión de un producto químico a la superficie de la matriz pueden ser reducidas o solucionadas. Además la quimiotaxis puede facilitar la transferencia de plásmidos catabólicos autotransmisibles dirigiendo bacterias móviles a sitios contaminados donde es posible que estén presentes las estirpes que llevan los plásmidos catabólicos relevantes.

El movimiento directo hacia o desde los contaminantes en el medio ambiente por el proceso llamado quimiotaxis es una respuesta exhibida por muchas sino todas las bacterias flageladas. La quimiotaxis se ha estudiado mucho en *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Estas especies detectan aminoácidos o azúcares a través de receptores de la superficie celular llamados proteínas quimiotácticasceptoras de metilos (MCPs). Hasta unirse a un atrayente, una MCP sufre un pequeño cambio conformacional que está comunicado con el motor flagelar a través de una serie de proteínas físicamente asociadas a la quimiotaxis y de fenómenos de fosforilación. El

cambio en la dirección de rotación flagelar que ocurre como consecuencia de una cascada de señales se manifiesta como quimiotaxis. Muchos sets de genes quimiotácticos están presentes en muchas especies y algunas de ellas, incluyendo *Pseudomonas putida*, tienen 25 o más genes MCP. A pesar de estas complejidades, las características fundamentales de la recepción y transducción de señales que ocurren durante la quimiotaxis en *E. Coli* se conservan probablemente entre las bacterias.

1.1.3 Mecanismos de degradación de los HPAs.

Muchos microorganismos poseen la capacidad de degradar HPAs. El metabolismo aeróbico por las bacterias degradadoras de HPAs comienza por la incorporación del oxígeno molecular en el anillo bencénico gracias a enzimas llamados dioxigenasas, para formar cis-dihidrodióles, los cuales se convierten en intermediarios dihidroxilados mediante deshidrogenasas (Cerniglia, 1992) (Cerniglia, 1984) Fig. VI.1. Los intermediarios como el catecol pueden reaccionar siguiendo dos rutas: En una ruta, la ruptura del anillo bencénico por las dioxigenasas, a través del camino *intradiol* u *orto*, lo cual implica la ruptura del enlace entre los átomos de carbono conteniendo los grupos hidroxilo, para conducir al ácido cis, cis-muconico; en la ruta *extradiol* o *meta* se rompe el enlace entre un átomo de carbono con un grupo hidroxilo y un átomo de carbono adyacente (Evans et al., 1965). Posteriormente, tienen lugar muchas reacciones consecutivas para realizar la mineralización completa de los HPAs de bajo peso molecular, produciéndose agua y dióxido de carbono (Cerniglia, 1992) (Komatsu et al., 1993). Todavía no se ha logrado determinar las etapas oxidativas de algunos HPAs de gran peso molecular, como el criseno y el benzo(a)pireno. También hay que recordar que algunos de los HPAs de gran peso molecular no se pueden usar como fuente de carbono y de energía, sino que se transforman mediante cometabolismo (Gibson et al., 1975) (Heitkamp &

Cerniglia, 1988). Además de la biodegradación aerobia, la biodegradación anaerobia también existe (Mihelcic & Luthy, 1988) (Coates et al., 1997), aunque se considera de menor importancia.

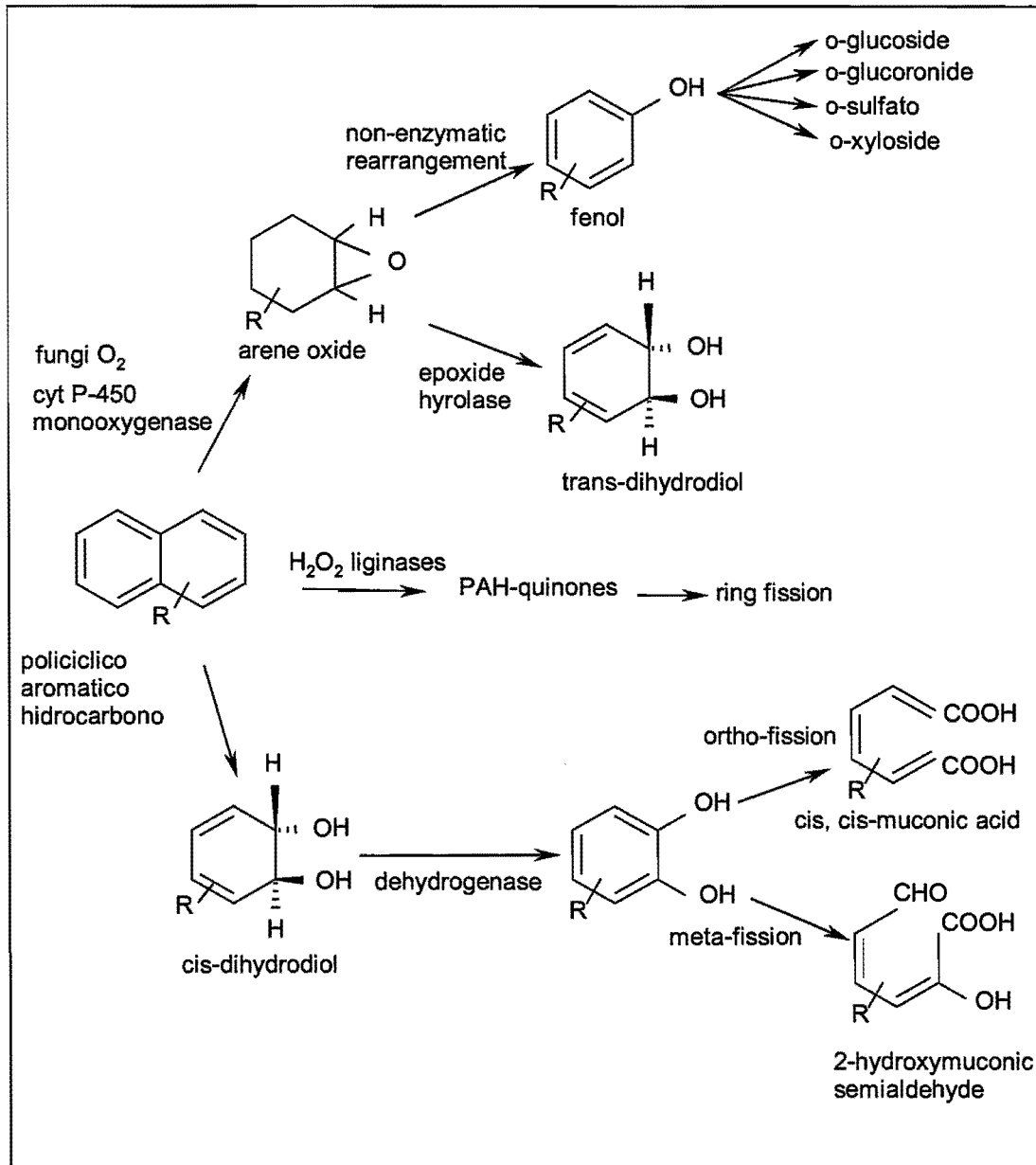


Fig. 2: Vías metabólicas de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Cerniglia, 1992).

La participación de los hongos en la degradación de los HPAs se realiza en la fase inicial con monooxigenasas asociadas al citocromo P-45, que permiten la oxidación de los HPAs a óxidos de areno, los cuales pueden ser transformados a trans-dihidrodióles por la enzima epoxidohidrolasa. Los epóxidos formados sufren reorganizaciones no enzimáticas para formar finalmente fenoles. Los metabolitos de HPA formados por los hongos pueden no ser tóxicos pero también pueden ser cancerígenos o mutágenos, que pueden ser detoxificados mediante la formación de conjugados con glucosa, gluconato, sulfato o xilosa. Además los hongos ligninolíticos o de la podredumbre blanca, tales como *Phanerochaete chrysosporium*, son capaces de producir enzimas extracelulares, como por ejemplo peroxidasas de la lignina, que pueden oxidar los HPAs para formar quinonas (Cerniglia, 1984) (Cerniglia, 1992) (Bezalel et al., 1996).

1.2 Líquidos en fase no acuosa (NAPLs).

Muchos contaminantes no existen en la fase acuosa o adsorbidos a los sólidos, sino en líquidos que no son miscibles en agua. Estos líquidos se llaman líquidos en fase no acuosa (NAPLs). Estos últimos son muy conocidos debido a los derrames o los escapes de los tanques de aceite, de las gasolinas, de las refinerías o de los petroleros, o al descuido durante la descarga de los petroleros en las aguas marinas. Los NAPLs se pueden encontrar en la superficie de las aguas contaminadas, en los sedimentos marinos, en las costas de las playas y en los suelos contaminados. En muchas zonas contaminadas los residuos peligrosos contienen solventes industriales, y estos solventes orgánicos se mueven y entran en las aguas subterráneas adyacentes, frecuentemente convirtiéndolas en no potables.

Casi todos los trabajos realizados sobre fisiología microbiana y metabolismo de los substratos orgánicos se han centrado sobre moléculas que están en solución acuosa, suponiendo siempre que la fracción de un compuesto que no está disuelto en el agua no es fácilmente accesible para la utilización. La observación de los sitios contaminados indican que los NAPLs son siempre extremadamente persistentes, y el mismo comportamiento suele darse con los compuestos que se encuentran en su interior.

Un número de factores influyen en la biodegradación de los constituyentes de los NAPLs: (1) la capacidad intrínseca de la microflora en la zona para transformar los constituyentes, (2) la tasa de reparto de los constituyentes de los NAPLs hacia la fase acuosa. Tales tasas de reparto dependen de la identidad del NAPL (Carroquino & Alexander, 1998), (3) la viscosidad del NAPL (Chen et al., 1994) - es probable que la viscosidad afecte a la tasa de biodegradación debido a la disminución de la difusión desde el NAPL hacia el agua, (4) la toxicidad del NAPL, (5) la superficie de la interfase entre el NAPL y la fase acuosa, (6) la presencia de otros componentes que son degradados más fácilmente que el compuesto específico que nos interesa, y (7) una concentración umbral de equilibrio en la acuosa que pueda permitir el crecimiento de las especies. Además, si el compuesto que nos interesa puede ser transformado solamente por cometabolismo, entonces el compuesto puede ser fácilmente transformado si el NAPL tiene los constituyentes que puedan soportar el crecimiento de las especies cometabolizantes (Alexander, 1999).

II. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la actividad quimiotáctica de las comunidades de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes en suelos contaminados, y determinar si esta actividad representa una ventaja ecológica durante la biorremediación en condiciones de baja biodisponibilidad.

Los objetivos específicos son:

- 1) Aislar, a partir de suelos contaminados, bacterias degradadoras de HPA con capacidad quimiotáctica.
- 2) Caracterizar los patrones de respuesta quimiotáctica de las bacterias aisladas, en concreto frente a diferentes HPA.
- 3) Evaluar el papel de la quimiotaxis en la biodegradación de PAH en sistemas modelo que crean condiciones de baja biodisponibilidad.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

III.1 Reactivos.

Los compuestos usados en este estudio son: naftaleno, salicilato sódico y 2,2,4,4,6,8,8 heptametilnonano (HMN), que se obtuvieron de Sigma, Deisenhofen, Germany.

III.2 Bacterias, medios y condiciones de cultivo.

La bacteria utilizada en este estudio es *Pseudomonas putida* G7 y su mutante no quimiotáctico *Pseudomonas putida* G7.C1, ambas obtenidas de Caroline S. Harwood de la Universidad de Iowa. Dos diferente medios se utilizaron para cultivar las bacterias: un medio mínimo llamado MSB cuya composición en 1 l de agua destilada fue: 0.67 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de NH_4Cl , 0.34 g de KH_2PO_4 , 0.112 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.014 g de CaCl_2 , 0.005 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0025 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.00022 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Y otro medio denominado medio de mineralización, una solución catiónica compuesta de 1.0 litro de agua destilada conteniendo 0.9 g de KH_2PO_4 , 0.1 g de K_2HPO_4 , 0.1 g de NH_4NO_3 , 0.1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g de CaCl_2 , 0.01 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0014 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.002 g de cada uno de los siguientes compuestos: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Las bacterias se mantuvieron de forma permanente en el medio de sales minerales correspondiente, conteniendo 0.2 % de naftaleno o bien 5mM de salicilato sódico. Para resuspender la bacteria se utilizó una solución tampón a pH=7.29 que contenía por litro de agua destilada: 0.8 g de K_2HPO_4 y 0.2 g de KH_2PO_4 . La estirpe forma en medio TSA (Tryptic Soy Agar) colonias blanquecinas de aspecto mucoso y de forma perfectamente esférica.

Para los experimentos de quimiotaxis, las bacterias se cultivaron en 100 ml de medio de sales minerales con el naftaleno o con salicilato sódico, a 30 °C sobre un agitador orbital a 150 rpm. Las células se recogieron al final de la fase de crecimiento exponencial. Los cultivos crecidos en naftaleno se pasaron a través de un filtro de vidrio de 40 μm de tamaño de poro, para eliminar el resto de los cristales del HPA y los cultivos crecidos en salicilato sódico no se filtraron puesto que esta es una sal soluble y no deja cristales.

III.3 Experimentos de quimiotaxis.

III.3.1 Ensayo capilar

Para este ensayo se toman células en el final de la fase de crecimiento exponencial. En primer lugar se puso a punto el método capilar utilizando distintos tamaños de capilar, se empezó probando con jeringas de plástico de 2 mL, después se pasó al capilar de 50 μL (Drummond "microcaps") y finalmente se optimizó el método con capilares de 1 μL (Drummond "microcaps"). La suspensión de células móviles se coloca en una pequeña cámara formada colocando dos capilares de 1 μL paralelos entre un portaobjetos (76 x 26 mm/3 x1 pulgada) y un cubreobjetos (24 x 24 mm) (Fig. 3). Un capilar de 1 μL tras ser cerrado con llama se llena con el atrayente o disolución control.

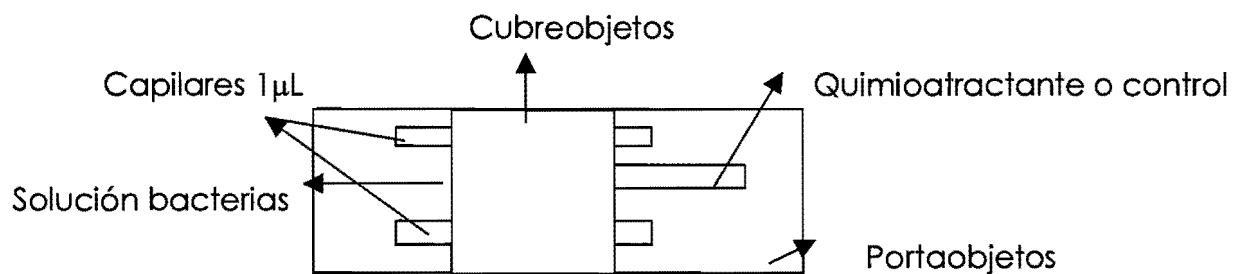


Fig. 3: Cámara de quimiotaxis

III.3.1.1 Conteo de viables

Se toma el cultivo de 100 mL, y se centrifuga (previa filtración en caso de que la fuente de carbono sea naftaleno) durante 10 minutos, a 2570 rpm (1000 g) una vez, la elección de esta velocidad de centrifugación, se hace basándonos en que a mayor velocidad podrían romperse los flagelos de la bacteria que son los que le dan movilidad y por tanto perder su capacidad quimiotáctica.

A continuación se resuspende en el medio de elección hasta conseguir una densidad óptica óptima que en nuestro caso se ha comprobado tras probar con varias densidades que es de entorno a 0.020 a 600 nm, estas densidades se miden en un espectrofotómetro UV-VIS (Genesis 10vis, Spectronic Unicam).

Se cierran por un extremo con llama los capilares y se calientan, a continuación se introducen unos en la disolución de atrayente previamente preparada y otros en la solución control que carece de atrayente. Se deja así 15-20 minutos, a continuación se pasan a la cámara de quimiotaxis tal y como se mostraba en la figura 3 y se deja ahí dos horas.

Finalmente se retiran los capilares, se lavan con disolución control, se rompen en eppendorf, se lava el contenido del capilar, se hacen diluciones y se siembran en placas de TSA. Al día siguiente ya están crecidas las placas, se cuentan las colonias y se halla el índice quimiotáctico (IQ).

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

Si este índice quimiotáctico es mayor de dos, se considera que hay quimiotaxis.

El primer ensayo capilar, se llevo a cabo con cultivos crecidos en MSB + 0.2% naftaleno y para resuspender el pellet tras la centrifugación se utilizó tampón fosfatos. Como quimioattractante se utilizó una disolución saturada de naftaleno, se añadieron 0.1 g de naftaleno a 10 mL de tampón fosfatos y se deja agitando en un agitador de rotación durante dos días, cuando se va a utilizar esta disolución se filtra a través de una pipeta pasteur rellena de lana de vidrio para eliminar los cristales de naftaleno y evitar que en algún capilar entren cristales y en otro no y nos dé, como consecuencia de esto, valores erróneos.

Solubilidad naftaleno= 31.7 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{0.1 \text{ g naftaleno}}{10 \text{ mL tampón fosfatos}} \times \frac{10^6 \mu\text{g}}{1 \text{ g}} = 10^4 \mu\text{g/mL} \quad \text{muy superior a la solubilidad}$$

En un segundo ensayo capilar, la bacteria se creció en cultivos con MSB + 5 mM salicilato sódico, este es una fuente rica de carbono y su elección se basa en que es un intermedio en la ruta de degradación del naftaleno y como tal puede inducir la quimiotaxis bacteriana (fig 4). El attractante es el mismo, una disolución saturada de naftaleno preparada igual que en el primer ensayo.

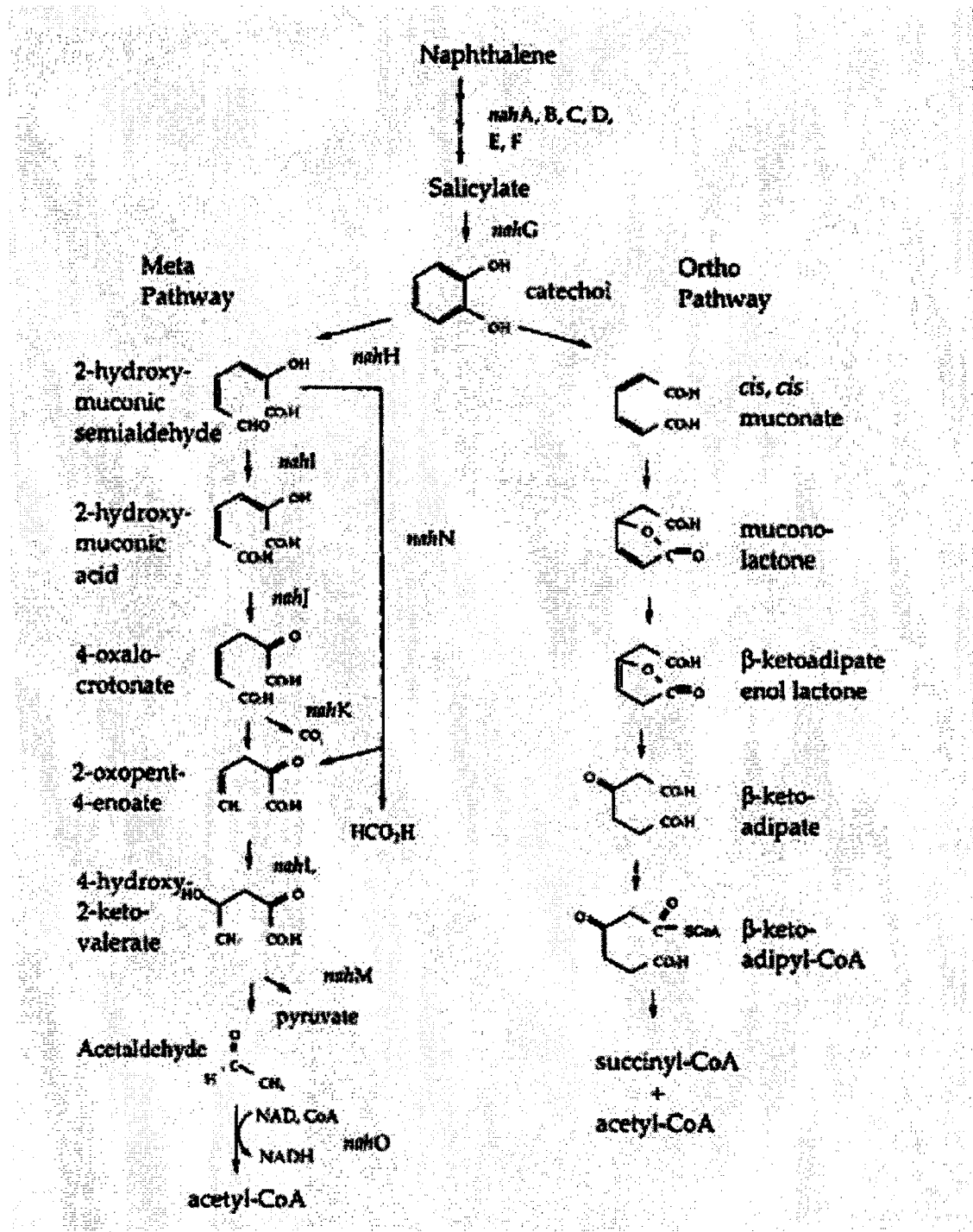


Fig 4: Ruta de degradación de naftaleno (Grimm & Harwood, 1997)

Se probó con otros medios de cultivo para comprobar si el pH también influía en la quimiotaxis bacteriana, principalmente, porque se harán futuros experimentos con el HPA marcado radiactivamente y para esto se necesita utilizar un pH= 5.7. El medio MSB tiene un pH de 7 y el medio de mineralización tiene un pH de 5.7. Se prepararon cultivos en MSB + 5 mM salicilato sódico pero resuspendiendo en medio de mineralización el pellet. Cultivos en medio de mineralización + 5 mM salicilato sódico y resuspendiendo el pellet en medio de mineralización y en tampón fosfatos y cultivos en MSB (ajustando el pH a 5.7) + 5 mM salicilato y resuspendiendo el pellet en MSB (pH= 5.7) y en tampón fosfatos.

III.3.1.2 Microscopía óptica

Para realizar el ensayo de microscopía se utilizó un microscopio óptico, Axioskop 2, Carl Zeiss, Jena, Germany con un objetivo A-plan 10 x (0.25 ∞ /-) y oculares W-PL 10 x/23 Br. foc.; las imágenes fueron capturadas 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. Para poder ver la quimiotaxis por el microscopio óptico la única variación con respecto al conteo de viables en cuanto al método de preparación de la muestra, en nuestro caso bacterias, es la densidad óptica, si en conteo de viables se utilizaba una D.O \cong 0.020, en microscopía se utiliza una D.O \cong 0.1. Una vez preparada la cámara de quimiotaxis, una respuesta quimiotáctica se veía en la acumulación de una nube de células móviles alrededor de la boca del capilar en un periodo de 10 min.

III.3.2 Matraces biométricos

Estos ensayos quimiotácticos se llevan a cabo en matraces biométricos (cristal Bellco) de 250 mL, en los cuales se introduce un cilindro de vidrio (2 cm de diámetro, 10 cm de altura) abierto por ambos extremos que contendrá la NAPL, 2,2,4,4,6,8,8 heptametilnonano (HMN). Se cortaron cuatro ranuras (6 mm de alto, 2 mm de ancho) en la base del cilindro para permitir intercambio de solución acuosa entre el interior y el exterior del cilindro (fig. 5). En el matraz se añadieron 100 mL de medio de mineralización y a la superficie de la fase acuosa en el interior del cilindro se añadió 1 mL de NAPL que contenía la cantidad necesaria de naftaleno para alcanzar una concentración de 1 mg/mL. Los matraces (se hace por duplicado) se cerraron con tapones envueltos en teflón y se incubaron a 25°C en un agitador orbital a 80 rpm. A las 48 horas una vez que se ha alcanzado el equilibrio, se retiran del agitador y se añade a cada matraz 2 mL de bacteria crecidas en 100 mL de medio de mineralización + 5 mM salicilato sódico, centrifugadas una vez a 2570 rpm (1000 g) durante 10 minutos y resuspendidas en 20 mL de medio de mineralización.

Una vez que se añade la bacteria, los matraces tienen que estar en ausencia de cualquier tipo de agitación y cada 15 minutos se va tomando una muestra del mismo punto de la fase acuosa del exterior del cilindro y se mide su densidad óptica y la concentración de naftaleno en ese punto, y en ese instante. La medición de la concentración de naftaleno se lleva a cabo en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Waters (2690 separations module y 474 Scanning Fluorescence Detector. Columna: Waters PAH C₁₈ 5 µm, 4.6 x 250 mm; flujo: 1 mL min⁻¹; fase móvil: 45% acetonitrilo, 55% agua; longitud de onda de excitación: 270 nm; longitud de onda de emisión: 323 nm).

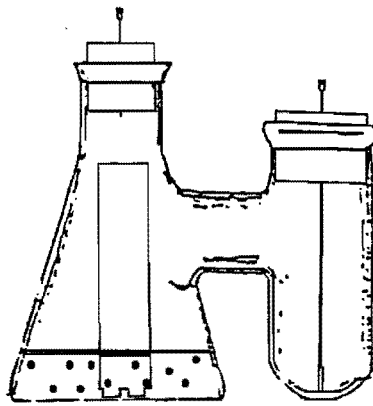


Fig. 5: Montaje matraz biométrico

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Experimentos de quimiotaxis.

IV.1.1 Ensayo capilar

IV.1.1.1 Conteo de viables

En el primer experimento se comparan la bacteria *Pseudomonas putida* G7.C1, con su mutante quimiotáctica *Pseudomonas putida* G7 (tabla 2). Estas dos bacterias en este caso, se crecieron en MSB + 0.2% naftaleno la primera y en MSB + 5 mM salicilato sódico la segunda, el pellet se resuspendió en tampón fosfato (control) y como atrayente se usó una disolución saturada de naftaleno las densidades ópticas medidas a 600 nm fueron: 0.022 (CFU: 3.37×10^6) y 0.024 (CFU: 1.89×10^8). A la vista de los resultados, podemos concluir, que la *Pseudomonas putida* G7 es una bacteria quimiotáctica, puesto que al comparar el número de colonias que entran en el capilar de una y otra bacteria, se observa que el número de colonias de *Pseudomonas putida* G7 es muy superior al de las colonias de la *Pseudomonas putida* G7.C1, y muy superior a su vez al control, el cual carece de naftaleno.

Tabla 2: Comparación de los resultados obtenidos en el ensayo capilar entre las bacterias *Pseudomonas putida* G7.C1 y *Pseudomonas putida* G7.

DILUCIONES eppendorf	CONTROL <i>P putida</i> G7		NAFTALENO <i>P putida</i> G7		NAFTALENO <i>P putida</i> G7.C1	
0	0	1	97	99	0	0
1	0	0	7	13	0	0
2	4	0	3	1	0	0
3	1	0	1	0	0	0

A continuación se comprobó si el pH influía o no en la quimiotaxis y para ello se utilizaron dos medios distintos que poseen distintos pH. La bacteria en este caso es *Pseudomonas putida* G7. Los resultados se observan en las tablas 3, 4 y 5. En la tabla 3, esta bacteria se cultivó en medio MSB + 5 mM salicilato sódico, tras centrifugar el pellet se resuspendió en dos medios distintos, medio de mineralización y tampón fosfatos, con densidades ópticas a 600 nm de 0.023 (CFU: 1.51×10^8) y 0.021 (CFU= 2.52×10^7), respectivamente . A la vista de los datos que se observan y comparando los índices quimiotácticos ($IQ = \frac{n^\circ \text{ colonias que entran en el capilar con naftaleno}}{n^\circ \text{ colonias que entran en el capilar control}}$), podemos decir que la bacteria presenta más capacidad quimiotáctica cuando se resuspende en tampón fosfatos, cuyo pH es prácticamente igual al del medio de cultivo.

En la tabla 4, se muestran los resultados de quimiotaxis de la misma bacteria, pero esta vez cuando la cultivamos en medio de mineralización + 5 mM salicilato sódico, que como se había comentado anteriormente tiene un pH= 5.7, tras centrifugar el pellet se resuspendió en dos medios distintos, medio de mineralización y tampón fosfatos, con densidades ópticas a 600 nm de 0.023 (CFU: 2.79×10^7) y 0.023 (CFU= 2.13×10^7), respectivamente . A la vista de los datos y observando los índices quimiotácticos (IQ), podemos decir que la bacteria presenta más capacidad quimiotáctica cuando se resuspende en medio de mineralización.

En la tabla 5, se muestran los resultados de quimiotaxis de la misma bacteria ahora cultivándola en medio MSB (pH= 5.7) + 5 mM salicilato sódico, tras centrifugar el pellet se resuspendió en dos medios distintos, medio MSB (pH= 5.7) y tampón fosfatos, con densidades ópticas a 600 nm de 0.022 (CFU: 2.31×10^7) y 0.022 (CFU= 2.10×10^7), respectivamente . A la vista de los datos y comparando los índices quimiotácticos (IQ), podemos decir que la bacteria

presenta más capacidad quimiotáctica cuando se resuspende en tampón fosfatos, aunque la diferencia no es significativa.

Si hacemos una comparación entre las tabla 3, 4 y 5, se observa que la bacteria se muestra más quimiotáctica cuando se cultiva en medio MSB y se resuspende en tampón fosfatos (tabla 3) y cuando se cultiva en medio de mineralización y se resuspende en el mismo medio (tabla 4), como en este caso lo que nos interesa es utilizar un medio a pH= 5.7 y que la bacteria siga siendo quimiotáctica, nos inclinamos por la segunda opción. A partir de este momento cualquier experimento con la bacteria *Pseudomonas putida* G7, se llevará a cabo en estas condiciones. La diferencia entre cultivar la bacteria en su medio natural que es el MSB y en medio de mineralización, radica en que en este segundo medio la bacteria tarda más días en crecer, mientras que en medio MSB crece en un día, en medio de mineralización tarda de tres a cuatro días.

Tabla 3: Resultados quimiotácticos de *Pseudomonas putida* G7 cultivada en medio MSB + 5 mM salicilato sódico y resuspendida tras centrifugación en medio de mineralización y tampón fosfatos.

MSB + 5 mM salicilato														
DILUCIONES eppendorf	M. MINERALIZACIÓN D.O: 0.023							TAMPÓN FOSFATOS D.O: 0.021						
	CONTROL			NAFTALENO			IQ	CONTROL			NAFTALENO			IQ
0	210	240	225^b	321	370	346^b	1.54	85	490 ^a	85^b	242	323	283^b	3.33
1	31	37	34	77	59	68	2	9	60	9	26	38	32	3.56
2	36	33	35	18	41	30	-	4	5	4	3	9	6	1.5
3	32	34	33	26	43	35	-	0	0	0	0	0	0	-

^a Datos no tenidos en cuenta en la media ni en el cálculo de IQ, por no considerarse fiables

^b Columna media de las dos columnas anteriores a ella

Tabla 4: Resultados quimiotácticos de *Pseudomonas putida* G7 cultivada en medio de mineralización + 5 mM salicilato sódico y resuspendida tras centrifugación en medio de mineralización y tampón fosfatos.

MEDIO MINERALIZACIÓN + 5 mM salicilato														
DILUCIONES eppendorf	M. MINERALIZACIÓN D.O: 0.023							TAMPÓN FOSFATOS D.O: 0.023						
	CONTROL			NAFTALENO			IQ	CONTROL			NAFTALENO			IQ
0	169	69	119^b	423	284	354^b	2.97	211 ^a	96	96^b	66	86	76^b	0.79
1	14	5	10	43	29	36	3.6	33	9	9	10	8	9	1
2	1	0	1	4	5	5	5	4	0	0	1	0	1	-
3	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	1	0	1	-

^a Datos no tenidos en cuenta en la media ni en el cálculo de IQ, por no considerarse fiables

^b Columna media de las dos columnas anteriores a ella

Tabla 5: Resultados quimiotácticos de *Pseudomonas putida* G7 cultivada en medio MSB (pH= 5.7) + 5 mM salicilato sódico y resuspendida tras centrifugación en medio MSB (pH= 5.7) y tampón fosfatos.

MSB (pH= 5.7) + 5 mM salicilato														
DILUCIONES eppendorf	MSB (pH=5.7) D.O: 0.022							TAMPÓN FOSFATOS D.O: 0.022						
	CONTROL			NAFTALENO			N/C	CONTROL			NAFTALENO			N/C
0	41	30	36^a	65	99	82^a	2.28	6	39	23^a	66	55	61^a	2.65
1	3	3	3	7	6	7	2.33	1	3	2	8	2	5	2.5
2	0	0	0	1	0	1	-	1	1	1	0	3	2	2
3	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-

^a Columna media de las dos columnas anteriores a ella

IV.1.1.2 Microscopía óptica

Para hacer este ensayo quimiotáctico se utilizó la bacteria *Pseudomonas putida* G7. Se cultivó en medio de mineralización + 5 mM salicilato sódico, tras centrifugar se resuspendió en medio de mineralización hasta conseguir una densidad óptica a 600 nm de 0.134 (CFU= 1.16×10^9). El atrayente en este caso fue una disolución saturada de naftaleno.

Se fue tomando una foto del capilar cada 15 minutos y tal como se observa en las figuras 6, 7 8 y 9 se va viendo una acumulación de bacterias entorno a la boca del capilar, en la figura 6 no se observa nada porque está tomada a tiempo 0, pero a medida que pasa el tiempo (fig. 7: 15 minutos) ya se empieza a observar como se empiezan a acumular las bacterias, y ya es completamente evidente en las fotos tomadas a 30 (fig. 8) y 45 minutos (fig. 9), donde no sólo se observa la acumulación de bacterias en la boca del capilar sino que se puede ver como se van adentrando en el mismo.

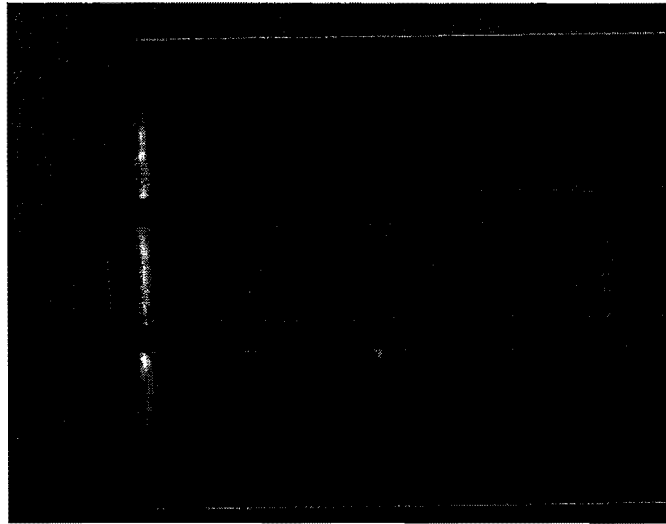


Fig. 6: Foto del capilar tomada a tiempo 0

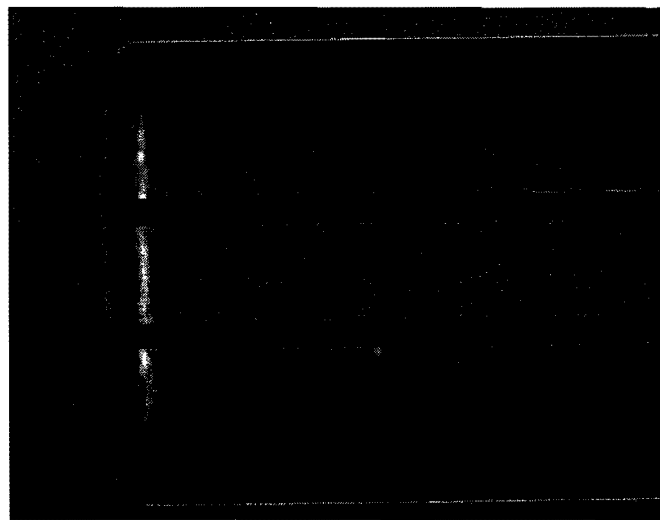


Fig. 7: Foto del capilar tomada a los 15 minutos

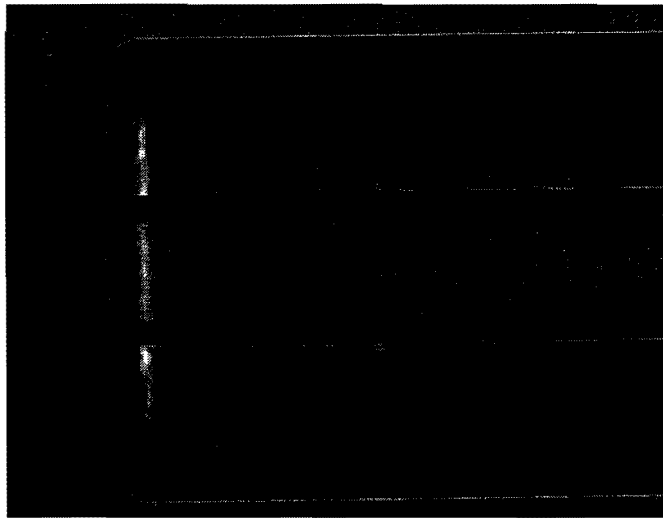


Fig. 8: Foto del capilar tomada a los 30 minutos

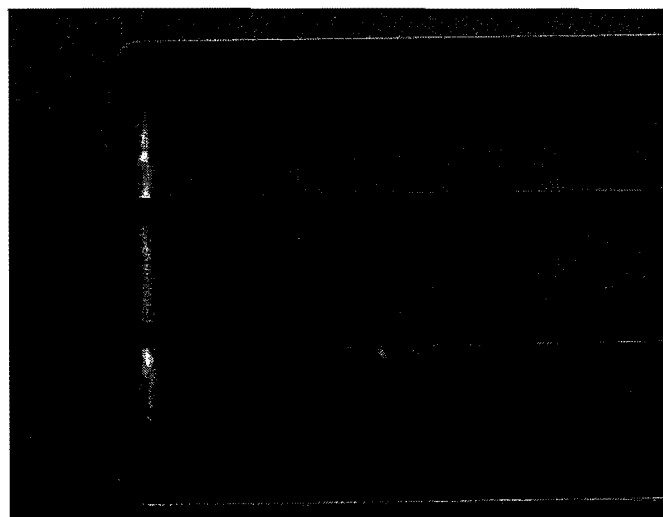


Fig. 9: Foto del capilar tomada a los 45 minutos

IV.1.2 Matraces biométricos

El experimento que llevo a cabo con los matraces biométricos, se hace con el objeto de comprobar si la bacteria muestra su capacidad quimiotáctica acercándose hacia la NAPL (fase líquida no acuosa). La NAPL utilizada en este caso fue heptametilnonano (HMN), la concentración de naftaleno en la misma es de 1 mg/mL. Y la fase acuosa fue medio de mineralización.

Este experimento se hace por duplicado, matraces A y B, la densidad óptica inicial a 600 nm en cada matraz es respectivamente 0.028 y 0.026. A partir del momento en que añado la bacteria (*Pseudomonas putida* G7), cada 15 minutos (al principio, después este tiempo se va alargando en función de los resultados) se van tomando dos muestra de cada matraz, una de las cuales se utilizó para medir la densidad óptica (tabla 6), siempre en el mismo punto, y la otra para medir la concentración de naftaleno mediante HPLC (tabla 7).

Si en primer lugar nos fijamos en los resultados de la tabla 6, se aprecia que la densidad óptica en cada matraz va disminuyendo con el tiempo, lo cual nos da una idea de la capacidad quimiotáctica de nuestra bacteria, la explicación en esta disminución viene dada porque en cada matraz se va formando un gradiente de concentración de naftaleno, desde la NAPL que está en el interior del cilindro disminuyendo paulatinamente a lo largo de la fase acuosa. En este momento la bacteria lo que hace es ir degradando el naftaleno y va desde los puntos más externos de la fase acuosa hacia la NAPL, de ahí que la densidad óptica de la bacteria en los puntos externos de la fase acuosa vaya disminuyendo, puesto que la bacteria se va desplazando haciendo uso de su capacidad quimiotáctica.

Por esta misma razón se puede ver en la tabla 7 como en 15 minutos ya ha desaparecido totalmente el naftaleno que pudo pasar desde la NAPL a la fase acuosa. La cantidad medida de naftaleno a tiempo cero, es la concentración de equilibrio, después de estar los matraces agitando dos días. Al cabo de este tiempo se considera que el equilibrio entre las dos fases (NAPL y fase acuosa) ya se ha alcanzado. La explicación de la desaparición del naftaleno es un poco la misma que para la densidad óptica, cuando añado las bacterias, éstas van avanzando según el gradiente de concentración que se ha formado, de forma que van degradando desde la parte más externa de la fase acuosa hacia la NAPL. Por este motivo a medida que se va degradando el naftaleno, éste va desapareciendo y deja de observarse en el HPLC.

Tabla 6: Datos de densidades ópticas de los duplicados, matraz A y matraz B, tomadas siempre en el mismo punto a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)/ Muestra	D.O. Matraz A	D.O. Matraz B
0/ M0	0.028	0.026
15/ M1	0.026	0.024
30/ M2	0.027	0.023
45/ M3	0.025	0.023
60/ M4	0.022	0.019
75/ M5	0.023 ^a	0.022 ^a
105/ M6	0.023	0.021
135/ M7	0.021	0.019
330/ M8	0.015 ^a	0.017 ^a

^a En estos puntos se hizo cambio de blanco y calibración del mismo.

Tabla 7: Datos de concentración de naftaleno en mg/mL (medidas en HPLC) de los duplicados, matraz A y matraz B, tomadas siempre en el mismo punto a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)/ Muestra	Naftaleno ($\mu\text{g/mL}$) Matraz A	Naftaleno ($\mu\text{g/mL}$) Matraz B
0/ M0	0.3619	0.2927
15/ M1	NO DETECTABLE ^a	NO DETECTABLE ^a
30/ M2	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
45/ M3	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
60/ M4	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
75/ M5	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
105/ M6	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
135/ M7	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
330/ M8	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

^a Límite de detección: 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

Actualmente y para el futuro, estos y otros experimentos con esta y otras bacterias ya comprobado quimiotácticas se aplicarán a suelos, hasta ahora lo que se ha hecho es realizar los pasos previos e imprescindibles para poner a punto el método y elegir las bacterias adecuadas con el objeto de poder aumentar la biodisponibilidad de HPA en suelos.

V. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones que se pueden destacar de este trabajo son:

1. La bacteria elegida para este trabajo, *Pseudomonas putida* G7, presenta quimiotaxis hacia el hidrocarburo policíclico aromático, naftaleno.
2. La quimiotaxis es un proceso que se puede favorecer variando diversos parámetros, tales como el pH del medio de cultivo de la bacteria, o la fuente de carbono que utiliza la bacteria para crecer.
3. El método apropiado para observar la quimiotaxis bacteriana de forma cuantitativa es el método capilar y la microscopía óptica es una forma rápida y sencilla de comprobar cualitativamente esta característica propia de algunas bacterias.
4. El método de los matraces biométricos es muy útil para comprobar la biodisponibilidad de los HPA en sistemas modelo como son las NAPL y para poner de manifiesto la capacidad quimiotáctica de las bacterias, ya que se produce un desplazamiento de las mismas hacia esa NAPL.
5. La quimiotaxis puede ser una muy buena solución para la biorremediación de suelos, ya que se prevee que puede facilitar la biodisponibilidad de xenobióticos (en nuestro caso HPA), que hoy en día es el principal problema con el que no enfrentamos en los suelos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Adler, J. 1973. A Method for Measuring Chemotaxis and Use of the Method to Determine Optimum Conditions for Chemotaxis by *Escherichia coli*. J.Gen.Microbiol. **74**:77-91.

Alexander, M. 1973. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. Biotechnol Bioeng. **15**:611-647.

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press: San Diego, CA.

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

Brown, R. A., M. Jackson., y M. Loucy. 1995. A rational approach to the remediation of soil and groundwater at manufactured gas plant sites. Land Contamination & Reclamation vol 3, number 4- special issue –International symposium and trade fair on the clean-up of manufactured gas plants – Prague, september 19-21.

Carroquino, M. J., y M. Alexander. 1988. Factors affecting the biodegradation of phenanthrene initially dissolved in different nonaqueous-phase liquids. Environ.Toxicol.Chem **17**:265-270.

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

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

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

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

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

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

Dzombak, D. A., y R. G. Luthy. 1984. Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. *Soil Sci.* **137**:292-308.

Evans, W. C., Fernley, H. N., y Griffith, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil Pseudomonads: The ring-fission mechanism. *Biochem J.* **95**: 819-831.

Eweis, J. B., S. Ergas, D. P. Y. Chang, y E. D. Schroeder. 1999. Principios de Biorrecuperación. McGraw-Hill, Madrid.

García-Junco, M., C. Gomez-Lahoz, J. L. Niqui-Arroyo y J. J. Ortega-Calvo. 2003. Biosurfactant- and Biodegradation- Enhanced Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Nonaqueous-Phase Liquids. *Environ.Sci.Technol.* **37**:2988-2996.

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

Gibson, D. T., y V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: *Microbial degradation of organic compounds.* Gibson, D.T.(Eds.).Marcel Dekker Inc.New York **13**:181-242.

Grimm, A. C., y C. S. Harwood. 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the Polyaromatic Hydrocarbon Naphthalene. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:4111-4115.

Guerin, W. F., y S. A. Boyd. 1992. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**:1142-1152.

Guerin, W. F., y S. A. Boyd. 1997. Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents. *Water Res.* **31**:1504-1512.

Harms, H., y A. J. B. Zehnder. 1995. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:27-33.

Harwood, C. S., N. N. Nichols, M. Kim, J. L. Ditty, y R. E. Parales. 1994. Identification of the *pcaRKF* Gene Cluster from *Pseudomonas putida*: Involvement in Chemotaxis, Biodegradation, and Transport of 4-Hydroxybenzoate. *J.Bacteriol.* **176**:6479-6488.

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

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

Karickhoff, S. W., D. S. Brown., y T. A. Scott. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res* **13**:241-248.

Komatsu T., Oori T., y Kodama T. 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic Hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **57**:864-865.

Liu, B. V., S. P. Pradhan., V. J. Srivastava., J. R. Pope., T. D. Hayes., D. G. Linz., C. Proulx., D. E. Jerger., y P. M. Woodhull. 1994. An evaluation of slurry-phase bioremediation of MGP soils. The 7th International IGT symposium on gas, Oil, and Environmental Biotechnology. Dec.12-14, Colorado Springs, Colorado.

Means, J. C., S. G. Wood., J. J. Hassett., y W. L. Banwart. 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ.Sci.Technol.* **14**:1524-1528.

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

Miller, M. M., y Wasik. S. P. 1985. Relationships between octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. *Environ.Sci.Technol.* **19**:522-529.

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

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

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

Paterek, J. R., B. Aronstein, L. E. Rice., K. A. Jackowski., y V. J. Srivastava. 1994. Chemical and biological remediation of waste generated during the exploration and production of natural gas. The 7th International IGT symposium on gas, Oil, and Environmental Biotechnology.Dec.12-14, Colorado Springs, Colorada.

Paterek, J. R., B. Aronstein, L. E. Rice., V. J. Srivastava., J. Chini., y A. Bohrnerud. 1994. Bioremediation of soil of a manufactured gas plant utilising an in-situ treatment mode. The 7th International IGT symposium on gas, Oil, and Environmental Biotechnology.Dec.12-14, Colorado Springs, Colorada.

Randall, B. M., y M. D. Aitken. 2000. Bacterial Chemotaxis Enhances Naphthalene Degradation in a Heterogeneous Aqueous System. *Environ.Sci.Technol.* **34**:3379-3383.

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

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

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