



UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. INSTITUTO DEL AGUA

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS SULFONATOS DE
ALQUILBENCENO LINEALES (LAS) EN SUELO
AGRÍCOLA: BIOTRANSFORMACIÓN Y ESTUDIOS DE
BIODIVERSIDAD

TESIS DOCTORAL

M^a DEL MAR SÁNCHEZ PEINADO

Granada, Julio de 2007

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. INSTITUTO DEL AGUA

“EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS SULFONATOS DE
ALQUILBENCENO LINEALES (LAS) EN SUELO AGRÍCOLA:
BIOTRANSFORMACIÓN Y ESTUDIOS DE BIODIVERSIDAD”

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Granada

DÑA. M^a DEL MAR SÁNCHEZ PEINADO

Directores:

Dña. M^a Victoria Martínez Toledo

Profesora Titular
Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Dña. M^a Belén Rodelas González

Prof. Contratado Doctor
Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Dña. Clementina Pozo Llorente

Investigadora Contratada
Instituto del agua
Universidad de Granada

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través de un proyecto del plan Nacional de I+D (PPQ2003-07978-V02-02).

A Kike

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis Directoras de Tesis todo el apoyo y la ayuda que me han ofrecido durante el desarrollo de esta investigación. A la Dra. M^a Victoria Martínez le agradezco su enorme amabilidad y disponibilidad en todo momento, sus sabios consejos y la dedicación y el cariño que me ha mostrado durante todo este tiempo. La Dra. Clementina Pozo siempre mostró gran interés y atención por mi trabajo, los cuales han sido imprescindibles para la realización de esta Tesis. Muchas gracias por todo el tiempo dedicado a resolver mis consultas y dudas. En la Dra. Belén Rodelas he encontrado siempre una gran ayuda y orientación científica. Sus conocimientos en el mundo de la genética y de la biología molecular han enriquecido de forma considerable mi investigación. Gracias por ayudarme a resolver tantísimos problemas. Y, sobre todo, quiero agradecer a las tres su enorme calidad humana. Además de tres Directoras de Tesis puedo asegurar que tengo tres buenas amigas.

Agradezco enormemente al Dr. Ernesto Hontoria la oportunidad que me brindó de iniciar mi actividad investigadora en el Instituto del Agua de la Universidad de Granada. Desde aquel momento, la supervisión y orientación del Dr. Jesús González resultaron del todo indispensables en mi formación científica y para el desarrollo de esta Tesis. Quisiera aprovechar esta oportunidad para agradecerle el trato tan afectuoso que siempre me ha ofrecido.

¿Y qué seríamos sin el apoyo de las amigas?... quiero agradecer de manera muy especial el apoyo y la amistad que he recibido de mis compañeras Ana y Almudena, así como la gran acogida que me prestaron. No cabe duda de que sin ellas el camino hubiera sido más difícil. Siempre recordaré los buenos momentos que hemos pasado juntas. A Marisa, por su amistad, por estar disponible en tantas ocasiones en las que la he necesitado, animarme siempre y por compartir tan buenos momentos.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto del Agua: Carmen, Luisa, Ginés, Ramiro, Paqui, Fede, Oti, Ada, Belén, Marina, Andrea, Imane, Jessica, Eva, Eloy y Maxi por su disposición y por hacerme el trabajo más agradable.

A los Drs. Miguel Ángel Gómez, Concepción Calvo, Luís Cruz-Pizarro y Victoria Amores, de los que he recibido siempre un trato inestimable y un desinteresado apoyo.

A los Drs. José Luís Vílchez y Marcio Nimer, por su colaboración durante todo este tiempo, ayuda y orientación en las cuestiones de química analítica y en los estudios de campo.

A mi familia por su cariño y apoyo en todos los momentos. En especial a mis padres, de los que he aprendido tanto en la vida y a mis hermanas con las que he compartido tantas cosas.

A mi amiga Lucía, por estar siempre a mi lado y comprenderme.

A kike, que sin duda ha sido mi mayor apoyo, por su enorme entusiasmo, paciencia e ilusión para que este trabajo saliese adelante y por la gran confianza que ha depositado en mí.

A todos ellos, y a aquellas personas que de manera inconsciente no he nombrado, muchas gracias de todo corazón.

1	Introducción	1
1.1.	El suelo como ecosistema heterogéneo y diverso	3
1.2.	La biodiversidad procariota y su relevancia en el sistema edáfico	5
1.3.	Contaminación del suelo. Impacto sobre la comunidad microbiana	8
1.4.	Producción y composición de los detergentes. Impacto ambiental	10
1.4.1.	El Sulfonato de Alquibenceno Lineal (<i>LAS</i>). Síntesis, propiedades físicas y químicas	17
1.4.1.1.	Propiedades físicas y químicas del <i>LAS</i>	19
1.4.1.2.	Producción y aplicaciones del <i>LAS</i>	21
1.4.1.3.	Vías de aporte del <i>LAS</i> al medio	23
1.4.1.4.	Actividad biológica del <i>LAS</i>	26
1.4.1.4.1.	Impacto del <i>LAS</i> sobre los microorganismos	27
1.4.1.4.2.	Impacto del las sobre otros organismos vivos. Toxicidad y bioacumulación en la red trófica	29
1.4.1.5.	Biodegradación del <i>LAS</i>	31
1.5.	Técnicas bioquímicas y de biología molecular aplicadas al estudio de la microbiota del suelo	37
1.5.1.	Técnicas bioquímicas aplicadas al estudio de la función de la comunidad microbiana en el suelo. Actividades enzimáticas	38
1.5.2.	Técnicas moleculares de determinación de la biodiversidad microbiana en el suelo	40
2.	Objetivos de investigación	49
3.	Material y métodos	51
3.1.	Tratamientos con <i>LAS</i> en parcelas experimentales	51
3.1.1.	Determinación microbiológica. Tratamiento y siembra de las muestras procedentes de la parcela	59
3.1.2.	Determinación de <i>LAS</i> en las muestras de suelo recolectadas durante los tratamientos	59

3.2.	Aislamiento e identificación de cepas bacterianas de muestras de suelo adicionadas de <i>LAS</i>	62
3.2.1.	Toma de muestras de suelo	62
3.2.2.	Tratamiento de las muestras	63
3.2.3.	Ensayos de enriquecimiento realizados a las muestras de suelo	63
3.2.4.	Aislamiento de cepas	66
3.2.4.1.	Aislamiento de las cepas obtenidas en el ensayo de enriquecimiento con 10 mg/l de <i>LAS</i>	66
3.2.4.2.	Aislamiento de las cepas obtenidas en el ensayo de enriquecimiento con 500 mg/l de <i>LAS</i>	66
3.2.5.	Pruebas identificativas realizadas a las cepas	66
3.2.5.1.	Pruebas morfológicas	67
3.2.5.2.	Pruebas fisiológicas	67
3.2.5.2.1.	Crecimiento aeróbico - anaeróbico	67
3.2.5.3.	Pruebas bioquímicas	68
3.2.5.3.1.	Catalasa	68
3.2.5.3.2.	Citocromo oxidasa	68
3.2.5.3.3.	Prueba de desnitrificación	68
3.2.5.3.4.	<i>Api 20 E</i>	69
3.2.6.	Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S mediante PCR, a partir de lisados celulares de las cepas aisladas en los ensayos de enriquecimiento	72
3.2.6.1.	Separación del ADN de las muestras mediante electroforesis	75
3.2.6.2.	Extracción del ADN del gel de agarosa	75
3.2.7.	Crecimiento de las cepas aisladas en medios de dializado de suelo	78
3.2.8.	Determinación cuantitativa de <i>LAS</i> mediante HPLC	78
3.2.8.1.	Biotransformación de <i>LAS</i> por la microbiota seleccionada	81
3.2.9.	Determinación de nitrógeno total y fosfatos y en los medios de dializado de suelo	84
3.2.9.1.	Determinación de Nitrógeno total (Nt)	84
3.2.9.2.	Determinación de fosfatos	85

3.3.	Estudios de biotransformación e impacto del LAS mediante el empleo de microcosmos edáficos	87
3.3.1.	Diseño y construcción de microcosmos edáficos	87
3.3.2.	Características edafológicas de las muestra de suelo contenidas en los microcosmos	89
3.3.3.	Microcosmos experimentales	90
3.3.3.1.	<i>Ensayo 1. Determinación del tiempo necesario de tratamiento de los microcosmos edáficos para detectar LAS en el efluente</i>	92
3.3.3.2.	Ensayo 2. Cuantificación de las en las muestras de suelo de los distintos microcosmos y estudio de su microbiota cultivable, actividad enzimática y perfiles de biodiversidad	93
3.3.4.	Cálculo del tiempo de retención del influente en los microcosmos ensayados	95
3.3.5.	Análisis de la microbiota cultivable en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos ensayados	97
3.3.6.	Determinación de actividades enzimáticas en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos	99
3.3.6.1.	Actividad enzimática fosfatasa	99
3.3.6.2.	Actividad enzimática arilsulfatasa	101
3.3.6.3.	<i>Actividad enzimática deshidrogenasa</i>	103
3.3.7.	Determinación de LAS en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos	104
3.3.8.	Estudio de los perfiles de biodiversidad de las comunidades bacterianas en los microcosmos edáficos	104
3.3.8.1.	Extracción del ADN bacteriano de las muestras de suelo	106
3.3.8.2.	Amplificación selectiva de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S de Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Bacterias Gram positivas de alto G+C y Acidobacterias	107
3.3.8.2.1.	Concentración del producto de la PCR anidada	114

3.3.8.3.	Amplificación de fragmentos del gen estructural de la subunidad α de la enzima amonio-monooxigenasa (<i>amoA</i>)	114
3.3.8.3.1.	Concentración del producto de la PCR anidada	116
3.3.8.4.	Separación de las muestras mediante TGGE	116
3.3.8.5.	<i>Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE</i>	120
3.3.8.6.	<i>Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN reamplificados</i>	120
3.3.8.7.	Análisis informático de las secuencias	121
3.3.9.	Análisis estadístico	122
4.	Resultados	123
4.1.	Análisis <i>in situ</i> de la distribución espacio-temporal del LAS y de la microbiota cultivable tras vertidos controlados en parcelas experimentales. Cinética de biodegradación del LAS en el suelo	123
4.2.	Aislamiento de microorganismos a partir de suelo agrícola adicionado de LAS	129
4.2.1.	Aislamiento y caracterización de microorganismos a partir de suelo adicionado con 10 mg/l de LAS	129
4.2.2.	Aislamiento y caracterización de microorganismos a partir de suelo adicionado con 500 mg/l de LAS	130
4.2.3.	Identificación genética de microorganismos	131
4.2.4.	Árbol filogenético de las cepas aisladas en los ensayos de enriquecimiento	133
4.2.5.	Curvas de crecimiento en medio de dializado de suelo	134
4.2.5.1.	Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. LAS05, <i>Delftia tsuruhatensis</i> LAS07 y <i>Enterobacter aerogenes</i> LAS09 en medio de dializado de suelo adicionado de 50 mg/l de las incubado a 30°C durante 10 días	139
4.2.5.2.	Estudio de biotransformación de LAS por <i>Pseudomonas</i> sp. LAS05, <i>Delftia tsuhatensis</i> LAS07 y <i>Enterobacter aerogenes</i> LAS09	142
4.2.6.	Efecto de la adición de LAS sobre la disponibilidad de nutrientes en los medios de dializado de suelo	145
4.2.6.1.	<i>Determinación de nitrógeno total</i>	145
4.2.6.2.	<i>Determinación de fosfatos</i>	146

4.3.	Estudios de biotransformación e impacto del LAS mediante el empleo de microcosmos edáficos	148
4.3.1.	Ensayo 1. Determinación del tiempo necesario de tratamiento de los microcosmos con el influente adicionado de LAS para detectar la presencia del mismo en el efluente de salida	149
4.3.2.	Ensayo 2. Evolución de la concentración de LAS en los microcosmos a lo largo del periodo de estudio	150
4.3.3.	Estudio de la microbiota cultivable, actividad enzimática y perfiles de biodiversidad en microcosmos experimentales	152
4.3.3.1.	<i>Recuento de microorganismos cultivables</i>	152
4.3.3.1.1.	<i>Recuento de microorganismos cultivables bajo el efecto de un influente adicionado de 10 mg/l de LAS</i>	153
4.3.3.1.2.	<i>Recuento de microorganismos cultivables bajo el efecto de un influente adicionado de 50 mg/l de LAS</i>	155
4.3.3.2.	Actividades enzimáticas en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos	157
4.3.3.2.1.	<i>Determinación de actividades enzimáticas bajo el efecto de un influente adicionado de 10 mg/l de LAS</i>	158
4.3.3.2.2.	<i>Determinación de actividades enzimáticas bajo el efecto de un influente adicionado de 50 mg/l de LAS</i>	162
4.3.3.2.3.	Análisis estadístico de correlación lineal entre los recuentos de microorganismos cultivables y las actividad enzimáticas en los distintos ensayos realizados	165
4.3.3.2.4.	Determinación de fosfatos en el efluente de salida de los microcosmos edáficos	166
4.3.3.3.	<i>Estudio de biodiversidad en los microcosmos edáficos ensayados</i>	168
4.3.3.3.1.	Perfiles de biodiversidad de Eubacterias en las muestras de suelo	168
4.3.3.3.2.	Perfiles de biodiversidad de Beta-proteobacterias en las muestras de suelo	171
4.3.3.3.3.	Perfiles de biodiversidad de Alfa-proteobacterias en las muestras de suelo	174
4.3.3.3.4.	<i>Perfiles de biodiversidad de Bacterias Gram-positivas de alto G+C en las muestras de suelo</i>	183

Índice

4.3.3.3.5.	Perfiles de biodiversidad de Acidobacterias en las muestras de suelo	186
4.3.3.3.6.	Perfiles de biodiversidad de las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio en las muestras de suelo	190
5.	Discusión	193
6.	Conclusiones	219
7.	Referencias Bibliográficas	221



1. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la especie humana, y con especial intensidad desde la Revolución Industrial, la actividad antrópica ha generado toda una serie de productos químicos previamente inexistentes en la naturaleza y extraños para la vida (xenobióticos). Los ecosistemas actúan como receptores últimos de dichos compuestos xenobióticos, donde sufren –entre otros- procesos de transformación, degradación y/o acumulación.

La actividad del ser humano sobre la degeneración de los ecosistemas se ha convertido en la mayor amenaza actual para el equilibrio ecológico del planeta, lo cual incluye también la supervivencia de la propia especie humana. Esta inquietud fue recogida en el Informe de la Comisión Mundial sobre medio Ambiente y Desarrollo de Naciones Unidas titulado “Nuestro Futuro Común”. En este documento se advierte que la humanidad debe cambiar su modo de vida y forma de interacción con el entorno si no desea el advenimiento de una era con niveles de sufrimiento humano y de degradación ecológica inaceptables.

Nace de esta manera el concepto de “Desarrollo Sostenible” como un modelo de desarrollo en el que se satisfacen las necesidades del presente, sin comprometer la capacidad para que las futuras generaciones puedan satisfacer las suyas propias (Enkerlin, 2004). En un modelo económico (y ecológico) sostenible, las tasas de explotación de recursos deben ser iguales o inferiores a las tasa de regeneración (producción sostenible) y las tasas de emisión de residuos deben ser iguales (o inferiores) a las capacidades naturales de asimilación de los ecosistemas donde se emiten los residuos (Daly, 2004).

La dinámica ecológica de nuestro planeta puede ser descrita, a escala global, a partir de una serie de flujos (ciclos) de materia y energía. El suelo constituye un ecosistema complejo de especial relevancia en la mayor parte de los ciclos biogeoquímicos globales. A su vez, junto al agua y a la atmósfera, actúa como receptor último de ingentes cargas de contaminantes que alteran significativamente su estructura y función, limitando su capacidad de transformación de materia y energía y comprometiendo su papel en el funcionamiento global de la Biosfera.

De entre todos los componentes biológicos del suelo, el microbiano (compuesto principalmente por bacterias, hongos y protozoos) es responsable de la mayor parte de los procesos de degradación y reciclado de la materia orgánica y de los compuestos químicos, constituyendo de este modo un eslabón de especial relevancia para el correcto funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos y determinante de la capacidad de autodepuración del ecosistema (Harris and Birch, 1989; Atlas and Bartha, 2002).

Los jabones y detergentes domésticos constituyen una importante fuente de sustancias orgánicas e inorgánicas descargadas al medioambiente, normalmente a través de sistemas de evacuación de aguas residuales urbanas e industriales por lo que se produce una amplia dispersión de los mismos tanto en el entorno acuático como en el terrestre. La materia activa de los detergentes está constituida por tensioactivos entre los cuales se encuentra el Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (*LAS*).

El presente trabajo de investigación profundiza -a partir de la aplicación de técnicas químicas, microbiológicas y moleculares- en el impacto de un compuesto químico xenobiótico de amplia difusión mundial (Sulfonato de Alquilbenceno Lineal, *LAS*) sobre la estructura, función y composición de la comunidad microbiana en el ecosistema edáfico. Igualmente, analiza la capacidad de biodegradación del contaminante en el suelo por parte de dicha comunidad microbiana. Constituye, por tanto, un avance en el conocimiento del suelo como sistema receptor de compuestos contaminantes, del impacto de dichos compuestos sobre la comunidad microbiana y del papel de la microbiota edáfica en los procesos de degradación de xenobióticos.

En este apartado de *Introducción* se resumirán algunas de las principales características del suelo como ecosistema complejo, heterogéneo y diverso, prestando especial atención al papel funcional que desempeña la microbiota edáfica. Seguidamente, se analizará el origen, composición e impacto ambiental de los detergentes como agentes contaminantes xenobióticos y se relacionarán algunos de los efectos descritos sobre la composición, abundancia y biodiversidad de los microorganismos del suelo. Por último, se

procederá a la descripción de algunas técnicas procedentes de los campos de la bioquímica y la biología molecular que han sido aplicadas en este trabajo de investigación para el estudio de la biodiversidad y funcionalidad de la comunidad microbiana de un suelo agrícola tras la adición de un surfactante aniónico (LAS).

1.1. EL SUELO COMO ECOSISTEMA HETEROGENEO Y DIVERSO

El suelo constituye la parte más externa de la corteza terrestre y es resultado de la meteorización de las rocas subyacentes y de toda una serie de procesos biogeoquímicos posteriores. Puede definirse como un sistema de interacción entre varias fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida (agua) y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. La materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición y cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. El sistema complejo que constituye el suelo, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas.

Los suelos se clasifican en distintos tipos en función a la importancia relativa de cada uno de los componentes mencionados. Según el informe sobre la protección del suelo de la Comisión Europea (2001) se pueden distinguir hasta 320 tipos distintos de suelos en Europa.

La estructura física (Fig. 1.1) del suelo se constituye en capas (horizontes) que presentan distintas propiedades físico-químicas y biológicas. La estructura en horizontes es particular para cada tipo de suelo y no todos los horizontes se encuentran en todos los suelos. Cada horizonte difiere en una o más características del superior o del inferior. Usualmente se reconocen cinco tipos de horizontes (Porta *et al.*, 2003):

- Horizonte O: Constituido por los primeros centímetros del suelo.
- Horizonte A: Generalmente rico en materia orgánica.

- Horizonte B: Contiene elementos minerales finos trasladados por la acción percolante del agua. Este es de coloración más intensa que el horizonte superior.
- Horizonte C: Formado por las fragmentaciones de la roca madre.
- Finalmente se encuentra la roca madre pura, que normalmente se nombra con la letra D.

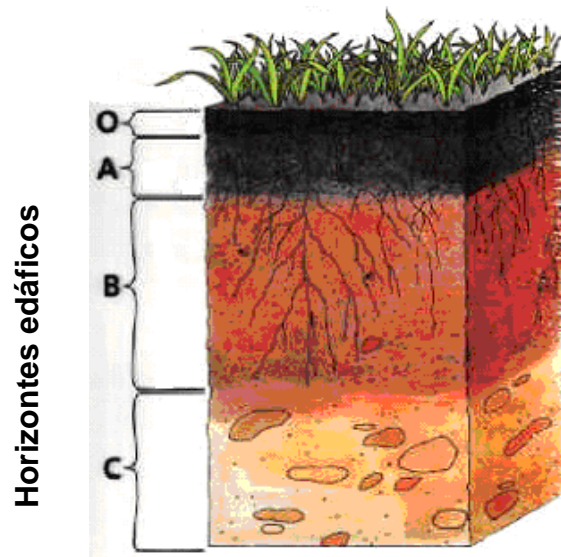


Fig 1.1. Organización del suelo en horizontes edáficos

Como ha sido comentado anteriormente, el suelo cumple un papel esencial para el sustento de la vida. Entre las principales funciones ecológicas del suelo se encuentran:

- Ser fuente de alimentos para la producción de biomasa.
- Actuar como medio filtrante y tampón
- Ser hábitat de miles de organismos
- Ser el escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos
- Ser fuente de materia prima indispensable para el ser humano, como los minerales.
- Ser el lugar donde se realizan la mayoría de las actividades humanas, como la agricultura y las actividades forestales.

Resulta especialmente relevante la capacidad del suelo para almacenar y transformar materiales de muy diverso origen y composición, entre los que se encuentran el agua, compuestos minerales, gases y algunas sustancias contaminantes (Paul, 2006). Esta función del suelo como almacén de sustancias y reactor químico muestra una relación directa con la cantidad de materia orgánica presente. Además de condicionar la capacidad de adhesión de compuestos químicos al suelo, la materia orgánica contribuye a minimizar los efectos de la erosión y a mantener la fertilidad del suelo.

El suelo es un ambiente especialmente apropiado para el desarrollo de microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). Es posible encontrar también virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas, contribuyendo notablemente a las características propias del suelo a través de su papel como modificadores de las fases sólida, líquida y gaseosa. Los microorganismos desempeñan en el suelo funciones de gran importancia en relación con los procesos de edafogénesis: ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; actúan sobre la fertilidad y producción primaria del ecosistema; protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, etc. (Nogales, 2005).

1.2. LA BIODIVERSIDAD PROCARIOTA Y SU RELEVANCIA EN EL SISTEMA EDÁFICO

El ecosistema edáfico se caracteriza por una enorme riqueza microbiana, de manera que la misma definición de suelo quedaría incompleta si en ella no se considerara la actividad de este componente. Las bacterias son los organismos que mayor riqueza en biodiversidad presentan ya que incluyen un número muy grande de especies, mientras que los hongos presentan la mayor biomasa. Los estudios sobre el componente microbiano del suelo son numerosos, aunque no existe en la actualidad ningún ejemplo en el que se haya determinado por completo la biodiversidad microbiana de un suelo problema y, aún más, tampoco se conoce cuál es la biodiversidad necesaria en cuanto a microorganismos para que un suelo agrícola funcione de manera óptima (Stewart, 1991).

Los microorganismos del suelo no se distribuyen al azar, sino que siguen patrones espaciales de agregación (distribución de contagio). Esta heterogénea distribución espacial obedece al efecto causado por diferentes factores de control y se caracteriza por un notable dinamismo en el espacio y en el tiempo (Ettema *et al.*, 2002). En este contexto, se ha demostrado que la distribución espacial de las bacterias edáficas está fuertemente estructurada, y que esta heterogeneidad desempeña un papel básico en la funcionalidad ecológica del suelo. Las bacterias se organizan en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos (Nunan *et al.*, 2003). Factores como la presencia de raíces, pequeños agregados, nutrientes y poros parecen gobernar la distribución de bacterias en microhábitats.

La complejidad del suelo como ecosistema, junto con las particularidades inherentes a los microorganismos tales como su tamaño microscópico y las dificultades para una diferenciación basada en su morfología, propiciaron una visión tradicional del mundo microbiano edáfico como una “caja negra” de la cual se intuía una importante función ecológica, aunque no se podía precisar bien su contenido (Insam, 2001).

En el hábitat edáfico podemos encontrar del orden de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de suelo. A pesar de que se registran más bacterias Gram positivas que en otros hábitats predominan en números absolutos las bacterias Gram negativas. En la Tabla 1.1. se relacionan algunas de las bacterias más representativas de un suelo tipo (Atlas, 2002).

Tabla 1.1. Composición de bacterias en el suelo (Atlas, 2002)

ESPECIE	ABUNDANCIA RELATIVA (%)
<i>Arthrobacter</i>	5-60
<i>Bacillus</i>	7-67
<i>Pseudomonas</i>	3-15
<i>Agrobacterium</i>	1-20
<i>Alcaligenes</i>	1-20
<i>Flavobacterium</i>	1-20
<i>Corynebacterium</i>	2-12
<i>Micrococcus</i>	2-10
<i>Staphylococcus</i>	<5
<i>Xanthomonas</i>	<5
<i>Mycobacterium</i>	<5

La estructura del suelo condiciona en buena medida la composición, abundancia y diversidad de las comunidades microbianas. Sessitsch *et al.* (2001), demostraron que la diversidad microbiana asociada a las partículas del suelo aumenta al disminuir el tamaño de las mismas. También se ha puesto de manifiesto que la comunidad microbiana que habita la proximidad de las raíces de las plantas presenta una menor diversidad que las muestras de suelo alejadas de las mismas, presentando una composición enriquecida en bacterias Gram negativas de la clase Proteobacteria (Marilley and Aragno, 1999; Duineveld *et al.*, 2001). Asimismo, hay una notable influencia del tipo de planta y del tipo de suelo en la composición de las comunidades de la rizosfera (Wieland *et al.*, 2001; Marschner *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que las diferentes prácticas agrícolas, el tipo de planta que se cultiva, la fertilización y los tratamientos con pesticidas y herbicidas condicionan la diversidad de las comunidades microbianas en suelos agrícolas (Buckley and Schmidt, 2003; Girvan *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004).

1.3. CONTAMINACIÓN DEL SUELO. IMPACTO SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA

A pesar de haber sido considerado tradicionalmente como un recurso ilimitado y renovable, el suelo constituye un sistema evidentemente frágil y limitado. La presión de uso y deterioro del suelo por acción humana incrementa a diario. A los problemas de pérdida de suelo por erosión derivados de usos inadecuados y/o especulativos se les une la degradación paulatina del mismo por acumulación de sustancias contaminantes procedentes de la agricultura y de la industria. Actualmente el suelo como ecosistema presenta elevadas tasas de degradación por acción humana, que contrastan con los ritmos extremadamente lentos de regeneración.

La introducción de contaminantes o material exógeno al suelo puede traducirse en el daño o pérdida de algunas o varias de sus funciones, lo cual repercute directamente en su calidad como ecosistema y como recurso. Estos procesos de contaminación no sólo afectan de forma negativa al suelo sino que también pueden impactar sobre la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, al ser arrastrados los contaminantes del suelo por medio del agua de lluvia o de infiltración. La presencia de niveles altos de contaminantes implica múltiples consecuencias negativas para el suelo como ecosistema, su red trófica y, por tanto, para la salud humana.

En el caso concreto de los suelos de labor, las prácticas agrícolas inadecuadas, el uso indiscriminado de fertilizantes, pesticidas y otros fitosanitarios, el abandono de terrenos y el mal manejo de los recursos vegetales inciden de forma negativa tanto sobre la cantidad como la calidad del recurso edáfico. En particular, la comunidad microbiana se ve afectada tanto en su composición y la densidad de sus poblaciones como en su biodiversidad y función.

La metodología usada tradicionalmente para evaluar el nivel de contaminación en suelos se basaba en la elaboración de análisis físicos y químicos. Hoy en día la aplicación de indicadores biológicos constituye una ventajosa herramienta que gana utilidad rápidamente tanto en el seno de la comunidad científica como a nivel de las

administraciones ambientales nacionales e internacionales (Duelli and Obrist, 1998; Büchs, 2003). Estos indicadores pueden estar basados en la composición y riqueza de las comunidades biológicas o bien en la presencia y/o densidad una especie determinada.

En este sentido, la evaluación del efecto que producen los contaminantes del suelo en los microorganismos naturales presentes en él ha recibido una atención considerable en los últimos años (Abbondazi *et al.*, 2003). Las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados tienden a estar dominadas por aquellas bacterias que pueden sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente, siendo capaces de utilizar el contaminante para crecer; en este sentido el contaminante induce una ruptura en el equilibrio ecológico del sistema y, como consecuencia, en todo su funcionamiento. De esta manera, según Van Beelen (1997) los microorganismos resistentes a los contaminantes presentes en su hábitat, normalmente fracasan en realizar algunas de sus funciones ecológicas específicas. Duarte *et al.* (2001) demostró que las comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de contaminantes derivados del petróleo, cambiando su estructura y composición hacia una nueva que favorezca a los organismos capaces de sobrevivir a las nuevas condiciones a expensas de otras especies que son reprimidas. Por tanto, parece claro que la composición de la comunidad microbiana y la diversidad de especies presentes en el suelo puede constituir un importante indicador de contaminación, y que cuanto más impactado se encuentre un suelo menor será su biodiversidad microbiana.

En los estudios de contaminación no basta con detectar la presencia de contaminantes en el suelo, sino que además se han de definir los máximos niveles admisibles y los posibles factores que puedan influir en la repuesta del suelo a los agentes contaminantes, entre ellos la biodisponibilidad del contaminante y su carga crítica. La primera variable corresponde a la capacidad de asimilación del contaminante por los organismos y, en consecuencia, la posibilidad de causar algún efecto, negativo o positivo. Por su parte, la carga crítica representa la cantidad máxima de un determinado compuesto contaminante que puede ser aportado a un suelo sin que se produzcan efectos nocivos.

Como apuntan Abbed *et al.* (2002) y Flynn *et al.* (2000), resulta de especial interés en ecología microbiana la elaboración de estudios que analicen la composición y biodiversidad de la microbiota edáfica como consecuencia de la ocurrencia de episodios de contaminación. En este contexto, en el presente trabajo de investigación se analiza el impacto de episodios de contaminación por un surfactante aniónico (*LAS*) sobre la composición, estructura, diversidad y función de la comunidad microbiana de un suelo agrícola. La elección del *LAS* como contaminante objeto de estudio se basa en la amplia difusión de este compuesto en los diferentes compartimentos de los ecosistemas, consecuencia de los elevados niveles globales de producción y utilización antrópica. Los surfactantes constituyen un grupo diverso de compuestos ampliamente utilizados en la fabricación de sustancias como detergentes, productos domésticos de limpieza, productos de aseo y cuidado personal, pinturas, polímeros, pesticidas, fármacos, compuestos utilizados en minería, recuperación de petróleos e industria celulosa (Ying, 2006). En los siguientes apartados de esta introducción se exponen brevemente algunas de las principales características físicas y químicas de los detergentes como compuestos contaminantes.

1.4. PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS DETERGENTES. IMPACTO AMBIENTAL

Son numerosas las definiciones que han sido propuestas para definir a los detergentes. El término detergente procede del latín “detergere” (*limpiar*, en castellano) y se define como una sustancia que tiene la propiedad, en presencia de agua, de disolver grasas y otras sustancias orgánicas. La Guía Institucional para el Uso de Antisépticos y Desinfectantes, define este tipo de productos como “agentes sintéticos, solubles en agua y efectivos para la limpieza de superficies y objetos inanimados”.

Según el Comité Internacional de Agentes de Superficie Activos, un detergente es “un producto obtenido a partir de una formulación desarrollada especialmente para promover el proceso de detergencia”. En este contexto, la norma internacional EN-ISO 862 define *detergencia* como “el proceso por el cual las suciedades se separan de su sustrato, pasando al estado de disolución o dispersión.”

La detergencia es la aplicación más extendida de los tensioactivos o agentes de superficie. Los agentes tensioactivos o surfactantes son sustancias que poseen en su estructura grupos polares (hidrofilicos) y grupos apolares (hidrofóbicos). Esta característica les permite actuar por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases (sólido-gas, líquido-gas, líquido-líquido y sólido-líquido). Su carácter polar y apolar también les otorga la posibilidad de autoasociarse para formar agregados denominados “micelas”.

Atendiendo a la diferente naturaleza que presenta la parte polar de la molécula de tensioactivo, en el mercado se encuentran cuatro tipos de surfactantes sintéticos:

a) Surfactantes aniónicos

Constituyen el tipo de surfactante más ampliamente utilizado a escala mundial debido a sus especiales características, entre las que se encuentran su coste bajo de producción y su estabilidad en aguas duras. Se diferencian del resto de surfactantes en que su zona polar está cargada negativamente. El contraión (normalmente sodio, potasio o iones amonio) ejerce una escasa influencia sobre las propiedades superficiales de estas sustancias. Hoy en día, este grupo polar negativo suele ser un grupo sulfato o sulfonato, como sucede en el caso del LAS, aunque tradicionalmente consistían en grupos carboxilato presentes en los jabones que se sintetizaban a partir de grasas animales.

El **sulfonato de alquilbenceno lineal**, también conocido como **LAS o ácido dodecibenceno sulfónico lineal** es uno de los tensioactivos aniónicos más ampliamente utilizados en el mundo, ya que comprende mas del 40% de todos los tensioactivos utilizados (Scott and Jones, 2000). Su poder tensioactivo proviene de su carácter anfipático, es decir, de la diferente solubilidad que poseen las dos partes principales de que consta la molécula: una parte hidrofílica que consiste en un grupo sulfónico polar (-SO₃) unido al benceno en posición *para* respecto a la parte lipofílica que consiste en una cadena alquílica lineal de longitud variable y a la que se une el anillo bencénico en distintas posiciones (Schönkaes,

1998; Cavalli *et al.*, 1999; Valtorta *et al.*, 2000). La mezcla comercial de LAS contiene una serie de homólogos que difieren en la longitud de la cadena alquímica, siendo los más habituales los comprendidos entre 10 y 13 átomos de carbono y a su vez cada uno de ellos es una mezcla de isómeros que difieren en la distinta posición en la que el anillo bencénico está unida a la cadena de carbonos lineal (Cavalli *et al.*, 1999). En definitiva el producto comercial contiene cuatro homólogos diferentes y hasta un total de 20 isómeros, de los cuales 18 son mezcla racémica.

La Figura 1.2. muestra uno de los compuestos del LAS. Para nombrar los diferentes compuestos se indica en primer lugar el carbono al que se une el anillo bencénico y por tanto el isómero correspondiente, seguido de la longitud total de la cadena lineal carbonada que nos identifica el homólogo.

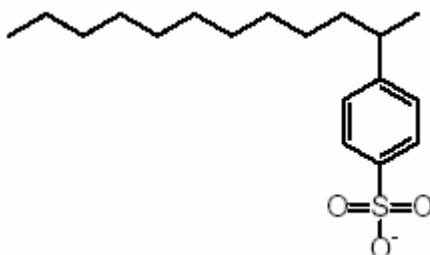


Fig 1.2. Ejemplo de sulfonato de alquibenceno lineal (sulfonato de 2-dodecylbenceno lineal)

La adsorción de los surfactantes aniónicos sobre superficies sólidas (Somasundaran and Huang, 2000) puede modificar las características de dicha superficie y la transferencia de electrones (Wang *et al.*, 2000). Además, pueden inducir la formación de agregados en la superficie similares a micelas (Luciani *et al.*, 2001) e incrementar el grosor de la película de otras moléculas adsorbidas (Churaev, 2000; Esumi *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2000). Los surfactantes aniónicos no solo cambian las características superficiales de los sólidos por adsorción, sino que también favorecen la solubilidad de compuestos escasamente solubles en agua (Harrison *et al.*, 1999).

Debido a sus favorables características fisico-químicas, los surfactantes aniónicos son ampliamente utilizados en numerosos campos de la tecnología y de la investigación. Han sido empleados con éxito para mejorar la eficacia de ingredientes activos en formulaciones farmacéuticas (Lawrence, 1994) y agrícolas (Riechers *et al.*, 1995), en biotecnología (Chang *et al.*, 1994) y otros procesos de tipo industrial (Czapla and Bart, 1999; Tong *et al.*, 2000). En la Tabla 1.2. se muestran los principales grupos de surfactantes aniónicos.

Tabla 1.2. Grupos principales de surfactantes aniónicos

	Jabones
	Alquilbenceno sulfonatos lineales
SURFACTANTES	Parafin sulfonatos
ANIÓNICOS	Alfa Olefin sulfonatos
	Dialquil sulfosuccinatos
	Alquilsulfonatos
	Alquil polietil sulfatos

b) Surfactantes catiónicos

Este tipo de sustancias se diferencian del resto de tensioactivos en que constan de una parte polar hidrófila cargada positivamente (normalmente una sal de amonio cuaternaria, amina o sal de fosonio) y de una zona hidrófoba que puede tener distinta naturaleza.

En disoluciones ácidas, los surfactantes no iónicos pueden adoptar carácter catiónico debido a la protonación del heteroátomo. Sin embargo, los surfactantes catiónicos no requieren de protonación para poseer carga positiva. Su uso está menos extendido. En la industria textil son aplicados como ablandadores de fibras (actúan sobre la fibra de algodón adhiriéndose a ella y confiriéndole cierta lubricidad y suavidad), de aquí su utilización en formulaciones de productos suavizantes. A este tipo de compuestos también se le atribuyen

propiedades antibacterianas, y por ello, se utilizan en la desinfección de heridas superficiales, en la preservación de colirios oftalmológicos, en la desinfección de lentes de contacto, y como antiséptico bucal. También forman parte de microbicidas y herbicidas. Además, se utilizan como inhibidores de la corrosión, inhibidores de procesos de oxidación, agentes dispersantes y en procesos de síntesis como agentes transferentes entre fases. En la Tabla 1.3. se pueden observar los grupos principales de surfactantes catiónicos.

Tabla 1.3. Grupos principales de surfactantes catiónicos

SURFACTANTES CATIONICOS	Aminas grasas y sales
	Sales de amonio cuaternarias
	Aminas grasas polietoxiladas

c) Surfactantes anfóteros

El uso de este tipo de surfactantes como materias primas de detergentes y productos de limpieza no está muy extendido. Sólo determinadas formulaciones líquidas los incorporan como aditivos para conferirles propiedades específicas.

d) Surfactantes no iónicos

Este tipo de surfactantes tienen una aplicación industrial algo mayor que la doméstica. Son sustancias que no están ionizadas en disolución, la polaridad del átomo de oxígeno unido covalentemente en los oligotilen glicol éteres y compuestos oligohidroxidos, o los átomos de oxígeno enlazados a heteroátomos, le confieren a estos surfactantes no iónicos su solubilidad en agua, como resultado de la hidratación de estos grupos por moléculas de agua. El grado de hidratación decrece con el aumento de la temperatura, decreciendo por tanto la solubilidad en el agua con el incremento de la misma. La parte lipofílica de la molécula debe tener una longitud que esté en consonancia con el número de grupos polares que posea el tensioactivo en cuestión, para evitar que aparezcan problemas de insolubilidad de la molécula.

Estos surfactantes forman micelas con mayor facilidad que los tensioactivos iónicos, debido principalmente a que las repulsiones electrostáticas en la superficie de éstas son menores. Este tipo de compuestos son menos sensibles a la dureza del agua que los surfactantes aniónicos. En la Tabla 1.4. se observan los principales grupos de surfactantes no iónicos.

Tabla 1.4. Grupos principales de surfactantes no iónicos

SURFACTANTES NO IÓNICOS	Alquil fenoles polietoxilados
	Alcoholes grasos polietoxilados
	Acidos grasos polietoxilados
	Alcanolaminas o condensados

Otros agentes complementarios en la formulación de detergentes

A pesar de que los tensioactivos son, sin duda, los ingredientes fundamentales de los detergentes, estos agentes son necesarios pero no suficientes, ya que además de ellos, se requirieren de una gama de componentes que ayuden a mejorar el papel de los tensioactivos y una serie de compuestos que los complementen, actuando sobre algunas suciedades para las cuales la acción físico-química no es suficiente. De estos compuestos podemos citar entre otros a los de alcalinidad coadyuvantes ó *builders*, agentes dispersantes-estabilizantes, aditivos de color y fragancia, agentes anticorrosivos, agentes redispersantes y fuentes (Fig. 1.3).

Por tanto, los detergentes de tipo comercial suelen contener ciertos aditivos que se pueden convertir en graves contaminantes. Los compuestos presentes en la formulación de un detergente comercial (sulfatos, fosforados, nitrogenados, etc.) suelen presentar efectos en la salud y riesgos ambientales en función de la cantidad empleada en su formulación específica y de su uso. En este contexto, están relacionados con problemas de eutrofización de las masas de agua, contaminación por compuestos clorados, elevación de alcalinidad/acidez de ambientes acuáticos, etc. De igual forma, pueden inducir problemas

debido a su poder corrosivo. Actualmente, se encuentran en el mercado detergentes antibacterianos (que contienen agentes bactericidas). Un uso excesivo de estos detergentes posibilita que el agente bactericida llegue al agua, impactando sobre su microbiota y disminuyendo, por tanto, su capacidad para degradar el detergente.

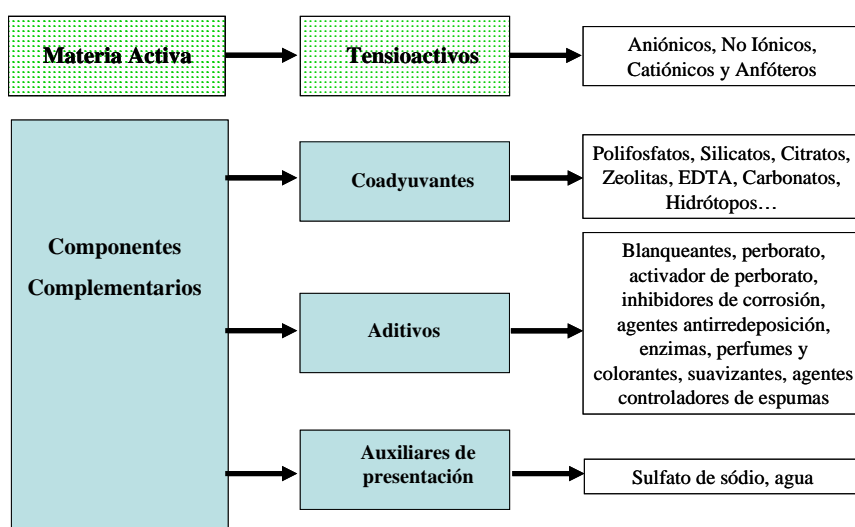


Fig 1.3. Componentes en la formulación de un detergente (modificado de Domínguez, 1986)

A continuación se exponen una serie de impactos que los detergentes pueden ocasionar sobre el medio ambiente:

- Pueden acumularse en el medio acuático causando contaminaciones de ríos, lagos y mares.
- Elevan la alcalinidad de las aguas residuales (alcanzando pH superiores a 12) causada por la sosa o potasa.
- Aportan altos niveles de fósforo. Uno de los principales aditivos de los detergentes son los "tripolifosfatos de sodio". Hasta 1970, un detergente típico de lavandería contenía un 50% de tripolifosfatos de sodio. Desde entonces, muchos fabricantes han reducido el porcentaje de éstos en su formulación. La principal problemática que tienen los tripolifosfatos es que, una vez desechado el detergente, los fosfatos pueden llegar a interactuar con el medio ambiente acuático, donde actúa como

elemento nutritivo de algas y plantas acuáticas y provoca la eutrofización de las aguas naturales.

- Formación de espumas indeseables: la producción de espuma de un detergente viene determinada por el tipo de surfactante que éste contenga. Los surfactantes aniónicos producen abundante espuma, los surfactantes catiónicos producen cantidades limitadas de espumas y los surfactantes no iónicos casi no producen espuma. Además, la formación de espuma es complementada por aditivos espumantes que se agregan a la fórmula. Es importante indicar que la formación de espuma de un detergente no tiene nada que ver con su eficacia.
- Interferencias en el poder depurador de las aguas por la disminución de la disolución de oxígeno desde la atmósfera, causando daños sobre los ecosistemas acuáticos.
- Inhibición de las oxidaciones biológicas y químicas, lo cual produce, en aguas muy contaminadas, valores bajos de DBO. Este fenómeno es debido, entre otras causas, a que en presencia de detergentes las bacterias se ven rodeadas de una película de detergente que las aísla el medio y evita su actividad.
- Interferencias en el proceso de cloración.
- Alteraciones en los suelos, modificando su permeabilidad, pH, etc.

1.4.1. El Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (LAS). Síntesis, propiedades físicas y químicas

A comienzos de los años 50 se sintetizaron químicamente los primeros productos con propiedades deterativas, como el Alquilebenceno ramificado (*BAB*), fabricado a partir de un tetrámero de propileno. El producto ramificado, una vez sulfonado (*BABS*), tenía unas propiedades deterativas muy apropiadas, aunque adolecía de un adecuado comportamiento medioambiental. Su estructura molecular abierta hacía de pantalla frente a los microorganismos que pueblan las aguas y, en consecuencia, el producto era difícil de biodegradar. Como consecuencia, comenzaron a aparecer problemas medioambientales tales como la acumulación de espumas tanto en depuradoras (Fig. 1.4), como en ríos (Fig.

1.5) e incluso en aguas subterráneas y potables. Por esta razón el *BABS* pasó a ser considerado como alquilato duro o no biodegradable.



Fig 1.4. Espumas producidas por detergentes en un reactor biológico



Fig 1.5. Espumas provocadas por el uso de detergentes en un río

Este problema propició el desarrollo del Alquilbenceno Lineal (*LAB*) a principios de la década de los 60. El producto lineal, una vez sulfonado, da lugar al Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (*LAS*) que mantiene las excelentes propiedades deterativas del *BABS* y además era mas fácilmente biodegradable por los microorganismos existentes en el ambiente. Aproximadamente el 99% del *LAB* producido es transformado en *LAS* por un proceso de sulfonación. Actualmente el Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (*LAS*) es uno de los tensioactivos aniónicos mas ampliamente utilizado en el mundo.

1.4.1.1. *Propiedades físicas y químicas del LAS*

En la Tabla 1.5. se enumeran algunas de las principales propiedades físicas y químicas del LAS, según datos proporcionados por EUCLID-base de datos de la oficina europea de productos químicos, (1994) y SIDS-screening information data set, (1999).

Tabla 1.5. Principales propiedades físicas y químicas del LAS

Variable	Valor
Nombre del compuesto y abreviatura	Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (LAS; LAS-Na)
Aspecto físico	Pasta blanca con contenido en agua
Peso molecular (g/mol)	342.4
Longitud media de la cadena alquil	11.8
Distribución de la cadena alquil	C10 (10-15%), C11 (25-35%), C12 (25-35%), C13 (15-30%), C14 (0-15%)
Presión de vapor a 25°C (Pa)	$(3-7) \cdot 10^{-13}$, valor referido al homólogo C12
Punto de fusión (°C)	277
Punto de ebullición (°C)	637
Coefficiente de partición en octanol-agua (K_{ow})	3.32
Solubilidad en agua (g/L)	250
Densidad (Kg/l)	1.06
Viscosidad (centipoises a 250 °C)	En torno a 1000

La solubilidad del LAS varía dependiendo de la longitud de la cadena alquílica y del proceso de fabricación. A medida que aumenta la longitud de la cadena carbonada unida al anillo bencénico disminuye la solubilidad en agua. Además, dentro de una misma familia de homólogos, los isómeros que poseen el anillo bencénico unido a la cadena alquílica en las posiciones más internas tienen un carácter más hidrofílico, ya que la longitud efectiva de la cadena de carbonos es menor.

Además de las características físicas y químicas de los LAS expuestas en la tabla anterior, hemos de considerar otros parámetros como:

-*Concentración micelar crítica (CMC)*. Esta es una propiedad característica de sustancias con carácter anfipático, como es el caso del LAS. Este tipo de moléculas con regiones lipofílicas e hidrofílicas poseen un comportamiento particular cuando se encuentran en disolución, ya que cada zona de la molécula con diferente solubilidad trata de distribuirse en el medio (sea acuoso o no) de manera que las colas lipofílicas se agrupan entre sí, al igual que los grupos hidrofílicos. De esta manera, a partir de una determinada concentración se genera un conglomerado de estructura definida que recibe el nombre de '*micela*' (Fig. 1.6). Estas micelas pueden tener geometría esférica (a bajas concentraciones) o elipsoidal (a altas concentraciones de surfactante o en presencia de electrolitos). Las especiales propiedades de las micelas les confieren un alto poder solubilizante de sustancias insolubles en fase acuosa, además de una importante capacidad de solubilización selectiva de diferentes especies químicas.

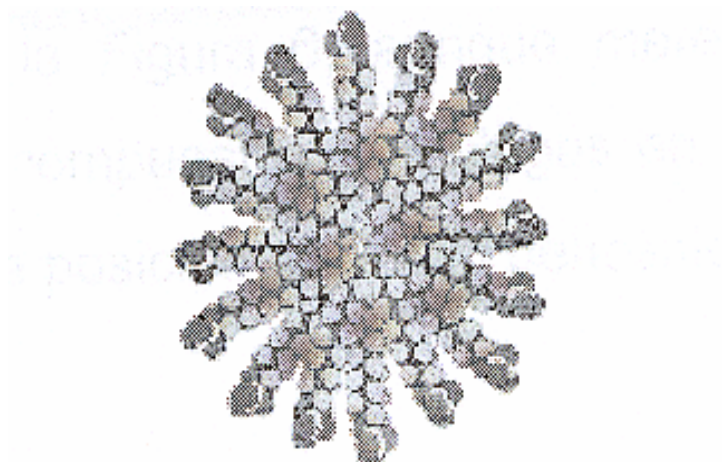


Fig 1.6. Representación de una micela

- *Capacidad detergente del LAS*: La capacidad detergente del LAS radica en su elevado poder de humectación, "rolling-up", emulsificación y dispersión, además su capacidad espumante es buena, pudiendo ser estabilizada con diferentes aditivos.

1.4.1.2. Producción y aplicaciones del LAS

El LAS ocupa cerca de 40% del total de surfactantes empleados actualmente (Scott and Jones, 2000). Según De Wolf and Feijtel, (1998) y Cavalli *et al.* (1999), el consumo de LAS a nivel global alcanza valores del orden de 2×10^6 t/año y la cantidad de LAS empleada en los detergentes puede alcanzar el 30% del peso total del producto final.

El LAS es el tensioactivo más utilizado en el mercado mundial de detergentes. En el año 2004 se estimó una producción total en Europa de 487 kton de LAS, de las cuales aproximadamente un 80% eran destinadas para usos domésticos (Comisión europea de surfactantes y sus intermediarios orgánicos, 2006). En España, la tasa de consumo es relativamente alta, en torno a 5g por habitante/día (Berna and Cavalli, 1999).

Una de las mayores ventajas del LAS es su compatibilidad con todo tipo de compuestos presentes en los detergentes. Además, es un producto químicamente estable que puede ser almacenado y transportado usando materiales estándares e instalaciones logísticas.

El sulfonato de alquilbenceno lineal es utilizado principalmente en forma de sales sódicas y ocasionalmente potásicas o aniónicas. Su utilización en una extensa gama de formulaciones está ligada a su gran poder limpiador (particularmente en el algodón), su excelente solubilidad aún a bajas temperaturas, su elevado poder espumante, elevada biodegradabilidad y bajo coste de producción. Generalmente, en productos de limpieza se utilizan formulaciones donde la cadena alquílica posee un número de carbonos comprendido entre 10 y 13. Los alquilbencenos con más de 14 carbonos son débilmente solubles en agua, aunque sí son solubles en disolventes orgánicos. Las disoluciones en aceite mineral

son ampliamente utilizadas como lubricantes en procesos industriales de corte y taladrado de metales.

El LAS, es empleado en diversos tipos de formulaciones de detergentes para lavado de ropas o lavado normal de vajillas, incluyendo polvos de densidad moderada y alta, líquidos concentrados, pastas y barras. También se encuentra en la formulación de detergentes del sector industrial e institucional, así como en pesticidas agrícolas, en la preparación de emulsiones para fluidos lubricantes, y en el procesamiento de metal y flotación de minerales.

La utilidad del LAS en procesos de biorrecuperación no está aún convenientemente documentada. En ocasiones, ha sido empleado para ayudar la desorción y solubilización de contaminantes (i.e. pesticidas, hidrocarburos...) con el objeto de mejorar su biodegradación (Cserhádi *et al.*, 2002). En los casos de tratamiento *in situ* de suelos, son aplicados en las técnicas de enjuague de suelo contaminado, barreras electrocinéticas y tratamientos biocorrectivos. La adición de agentes tensioactivos al suelo es necesaria en los casos en que se desee solubilizar sustancias contaminantes inmiscibles en agua (ej. compuestos oleosos). Son muy utilizados en la industria del petróleo como agentes dispersantes, para favorecer la remediación del subsuelo después de un derrame o tras la contaminación con líquidos no acuosos. Además, se ha demostrado que los residuos de aceites pretratados con surfactantes aniónicos presentan una mejor dispersabilidad en el suelo, y de este modo se facilita su biodegradabilidad (Rasiah and Voroney, 1993).

Los surfactantes aniónicos pueden influir tanto en la movilidad de las moléculas orgánicas como en la de las inorgánicas. En este contexto, se ha descrito que la desorción de plomo de las partículas del suelo se puede ver incrementada por la adición de surfactantes aniónicos (Huang *et al.*, 1997).

Por otro lado, los surfactantes aniónicos no sólo facilitan la disolución y la eliminación de contaminantes ambientales, sino que también pueden incrementar su adsorción bajo determinadas condiciones. Así, los surfactantes aniónicos pueden incrementar la adsorción

del tetracloruro, naftaleno y fenantreno en superficies de óxido de aluminio, lo que proporciona una mejora del control de la contaminación del agua (Park and Jaffe, 1993).

1.4.1.3. Vías de aporte del LAS al medio

Como ya se ha indicado previamente, el LAS nació debido a la necesidad de sustituir el alquilbenceno ramificado (BAB), ya que este producto posee una estructura abierta que impide que los microorganismos encargados de degradar la materia orgánica puedan actuar sobre él. Esto provocaba problemas de acumulación de espumas que, además del evidente impacto visual, impiden el adecuado intercambio de oxígeno entre la atmósfera y el medio acuático, induciendo de esta forma un empobrecimiento en la calidad del agua y, entre otros efectos, el consecuente colapso de diversas poblaciones de flora y fauna. Otro problema añadido consistía en la acumulación de espumas en plantas depuradoras, que provocaba que los microorganismos que actúan en los lodos activos bajo condiciones aerobias muriesen y, de este modo, disminuyera considerablemente la eficiencia de la planta depuradora.

El LAS no presenta este problema, ya que su cadena alquílica lineal es fácilmente accesible a este tipo de microorganismos y por tanto es fácilmente biodegradable. De hecho, el rendimiento de eliminación de LAS en una planta depuradora media suele ser bastante alto. Normalmente, la concentración de LAS en aguas residuales sin tratar se encuentra en el rango de 1-15 mg/l, siendo el rango de concentraciones a la salida de la planta de 0.008-0.27 mg/l, lo cual implica un rendimiento de la planta del 99% (HERA, 2004).

El LAS es un producto xenobiótico de amplia producción y aplicación, sobre todo en formulaciones domésticas y en menor medida en aplicaciones industriales. Como regla general, su uso doméstico genera gran cantidad de aguas residuales que normalmente son tratadas en plantas depuradoras (EDAR) previamente a su vertido a diversos ecosistemas (afluentes, mares...) o a su utilización como aguas de riego. Además, los lodos generados por los procesos de sedimentación de las sustancias en suspensión que arrastran las aguas residuales, una vez tratados y desecados (formando así el denominado compost), pueden

ser utilizados como abono en las tierras de cultivo. Este compost, por tanto, contiene cantidades elevadas de LAS. Se estima que la cantidad media aportada es de 6-13 tn/hectárea/año (Holt *et al.*, 1989; Matthijs and DeHenau, 1987; Marcomini and Giger, 1988). Es bien sabido que en el proceso de depuración de aguas residuales el 80-90 % de LAS es degradado, del 10-20 % es adsorbido a los lodos y alrededor del 1 % queda libre en la superficie del agua (Berna *et al.*, 1989; Painter and Zabel, 1989; Cavalli *et al.*, 1993; Dicorcia *et al.*, 1994).

De todo lo anteriormente expuesto, y siguiendo a Hislop *et al.* (1977), Holt *et al.* (1989) y Jensen (1999), se desprende que el LAS puede alcanzar el suelo a través de alguna de las siguientes vías: a) aplicación de lodos de depuradora como fertilizantes en suelos agrícolas, b) utilización de aguas residuales como aguas de riego, c) infiltración en el suelo de aguas residuales o aguas procedentes de ríos contaminadas y d) aplicación de formulaciones de pesticidas que contienen LAS como agentes emulsionantes o dispersantes.

El uso del lodo biológico proveniente de las estaciones de tratamiento de aguas residuales es la principal forma de introducción del LAS en los suelos. De hecho, una vez que el lodo proveniente de estas estaciones es sometido a digestión anaerobia, los surfactantes sufren una degradación escasa o nula. En la Tabla 1.6. se muestran algunas de las concentraciones medias de LAS registradas en diferentes medios:

Tabla 1.6. Concentración de LAS en diversos medios

MEDIO	CONCENTRACION DE LAS	REFERENCIAS
Entrada EDAR	1-15 mg/l	Feijtel <i>et al.</i> (1995); Matthijs <i>et al.</i> (1999); Coello <i>et al.</i> (2004); Brandt <i>et al.</i> (2004).
Salida EDAR	2-273 µg/l	Holt <i>et al.</i> (2003)
Agua de río	< 2-47 µg/l	Feijtel <i>et al.</i> (1995); Matthijs <i>et al.</i> (1999)
Agua de pozo	0-3 µg/l	Field <i>et al.</i> (1992)
Fangos	3,9-9,4 g/kg	DiCorcia <i>et al.</i> (1994); Sánchez Leal <i>et al.</i> (1994); Holt <i>et al.</i> (1995); Feijtel <i>et al.</i> (1995)
Suelos	0,7-1,4 mg/kg	Mortensen <i>et al.</i> (2001); Carlsen <i>et al.</i> (2002)
Sedimentos de río	1-5,3 mg/kg	Cavalli <i>et al.</i> (2000)

No obstante, es importante resaltar que las concentraciones promedio expresadas en la Tabla 1.6. pueden sufrir variaciones. En el caso de ríos y lagos, la concentración de surfactantes aniónicos muestra una acusada variación en función de la estación del año (Marcomini *et al.*, 2000) o de la distancia de estas masas de agua a los núcleos de población y distritos residenciales (Muramoto *et al.*, 1996). Las concentraciones en el mar pueden depender en gran medida de condiciones tales como la densidad del tráfico marítimo (Decembrini *et al.*, 1995), la intensidad de la explotación de gas y petróleo en plataformas marinas (Tkalin, 1993) y la descarga de aguas residuales (Kantin *et al.*, 1881). En suelos la concentración depende de que el sistema haya recibido o no recientemente lodos. De esta manera, según Jensen (1999) las concentraciones de LAS en suelos que no han recibido lodos recientemente, son generalmente menores de 1mg/kg y no superiores a 5 mg/kg, mientras que según de Wolf and Feijtel (1998) la cantidad de LAS en suelos derivada de la aplicación de lodos de depuradora varía entre 0 y 20 mg/de LAS/kg de suelo. Las concentraciones de LAS en lodos que han sido tratados aeróbicamente están comprendidas entre 100-500 mg/kg, mientras que los lodos tratados en condiciones de anaerobiosis presentan concentraciones del orden de 5000-15000 mg/kg (Jensen, 1999). En este contexto, la legislación danesa establece que el contenido en LAS en los lodos de

depuradora utilizados en suelos agrícolas no debe exceder los 1300 mg LAS/kg de peso seco de suelo (Jacobsen *et al.*, 2004).

1.4.1.4. Actividad biológica del LAS

El papel de los surfactantes aniónicos en el medio ambiente es ambiguo. Por una parte, pueden facilitar la descomposición o el desplazamiento de otros contaminantes inorgánicos y orgánicos (Barry and Brown, 1996). Por otro lado, se han observado efectos tóxicos en organismos vivos derivados de episodios de contaminación ambiental por este tipo de sustancias (Cserhati *et al.*, 2002).

El carácter anfótero de los surfactantes aniónicos facilita su acumulación en los organismos vivos. La parte cargada negativamente puede unirse a subestructuras moleculares cargadas positivamente por fuerzas electrostáticas, mientras que la parte hidrófoba puede unirse con las partes apolares de los órganos u organismos mediante fuerzas hidrófobas. La modificación de la estructura de las proteínas y el mal funcionamiento de las enzimas y de las membranas fosfolipídicas inducidas por los surfactantes aniónicos causan síntomas tóxicos en órganos y organismos animales y humanos. En general, los surfactantes aniónicos y catiónicos son mas tóxicos que los no iónicos.

En concreto, la presencia de LAS en el medio puede acarrear diversas consecuencias a los seres vivos, de manera que resulta un aspecto de especial importancia el estudio de su ecotoxicidad. Son abundantes los trabajos publicados en torno a la toxicidad del LAS sobre distintos tipos de organismos tales como microorganismos, protozoos, plancton, algas, peces, crustáceos, insectos o moluscos, y plantas comunes (tomate, patata, lechuga, etc).

1.4.1.4.1. Impacto del LAS sobre los microorganismos

Se han descrito diversos efectos que el LAS puede causar sobre las membranas celulares y proteínas debido a su actividad superficial (Schwuger and Bartnik, 1999). El LAS puede ser inhibidor de bacterias, hongos y otros organismos del ecosistema del suelo (Holmstrup and Krofh, 2001), por esta razón la exposición de un suelo de cultivo al LAS puede alterar su actividad biológica, repercutiendo de esta forma sobre la calidad del medio edáfico y su ciclo nutricional (Turco *et al.*, 1994).

Los surfactantes aniónicos por sí mismos presentan una marcada actividad biológica, ya sea mediante la unión con varios tipos de moléculas bioactivas como el almidón (Merta and Stenius, 1999), las proteínas (Nielsen *et al.*, 2000), los péptidos y el ADN (Marques *et al.*, 2000) o mediante su inserción en varios fragmentos celulares (i.e. la membrana de fosfolípidos) produciendo perturbaciones en su funcionamiento.

En el caso concreto de los microorganismos, altas concentraciones de LAS en el suelo pueden inducir la despolarización de la membrana celular y, como consecuencia, la reducción de la capacidad de absorción de nutrientes y de oxígeno. Además, se ha demostrado que la despolarización de la membrana celular por absorción de detergentes dificulta la eliminación hacia el medio extracelular de metabolitos tóxicos, lo cual puede llevar a los organismos al colapso (Hartmann, 1966). Según los datos de los que se dispone en la bibliografía, estos efectos empiezan a ser observados a concentraciones entre 10-50 mg LAS/kg de suelo (Jensen, 1999). A pesar de que algunos estudios (Elsgaard *et al.*, 2001c) han revelado la incidencia del LAS sobre todo tipo de bacterias (Gram positivas y Gram negativas), Hartmann (1966) describió un mayor impacto de los surfactantes aniónicos sobre las bacterias del suelo (predominantemente Gram positivas) respecto a las bacterias acuáticas (mayoritariamente Gram negativas). Sin embargo, Lee (1970) describió que las bacterias Gram positivas eran más resistentes al LAS que las Gram negativas.

Por otra parte, estudios microbiológicos en suelos han demostrado que, incluso a bajas concentraciones de LAS, este inhibe notablemente la actividad de las bacterias reductoras del hierro. Además de la interacción del LAS con las membranas celulares, su

adsorción sobre los óxidos de hierro (tanto amorfos como cristalinos) interfiere de forma negativa en el proceso de respiración bacteriana (Kristiansen *et al.*, 2003).

Recientemente se han demostrado importantes efectos inhibitorios del LAS sobre el grupo de las bacterias oxidadoras de amonio. En este contexto, las especies pertenecientes al género *Nitrosospira* parecen ser más sensibles al tensioactivo que aquellas correspondientes al género *Nitrosomonas*. Adicionalmente, las bacterias oxidadoras del amonio muestran una mayor sensibilidad al estrés inducido por la exposición al LAS que las bacterias heterotróficas y pueden ser consideradas como un adecuado indicador biológico para determinar el impacto del LAS sobre las comunidades microbianas (Brandt *et al.*, 2001). De hecho, se ha puesto de manifiesto que la oxidación autotrófica del amonio en suelos agrícolas puede estar afectada por la presencia de LAS derivada de la aplicación de fangos de depuradora como fertilizante (Elsgaard *et al.*, 2001a). Autores como Elsgaard *et al.* (2001a y 2001c), Brandt *et al.* (2002) y Brandt *et al.* (2003), han demostrado el impacto del LAS sobre las bacterias oxidadoras del amonio en el suelo a partir de concentraciones de tensioactivo comprendidas entre 8-10 mg LAS/kg, mientras que la presencia de elevadas concentraciones del surfactante no parece inducir el desarrollo de efectos tóxicos sobre los microorganismos heterotróficos del suelo. Ensayos con 150 mg LAS/kg mostraron una intensa inhibición (50%) de las bacterias oxidadoras del amonio. No obstante, estos microorganismos parecen capaces de recuperar sus poblaciones de forma rápida una vez eliminado el LAS del suelo. La presencia de amonio en el sistema facilita notablemente esta recuperación (Nielsen *et al.*, 2004).

A pesar de todo lo expuesto, según Vinther *et al.* (2003) la adición de LAS (174 mg/Kg) al suelo induce un incremento en el número total de bacterias debido a dos tipos de mecanismos: 1) el LAS puede actuar como fuente de sustrato causando la proliferación de bacterias. 2) el LAS puede producir una separación de las bacterias de la propia matriz del suelo. Normalmente, el incremento observado en el número de bacterias es debido a la acción combinada de los dos mecanismos expuestos.

1.4.1.4.2. Impacto del LAS sobre otros organismos vivos. Toxicidad y bioacumulación en la red trófica

En general, el LAS produce efectos tóxicos sobre los invertebrados del suelo cuando la concentración excede de 40-60 mg/kg (Holmstrup and Krogh, 2001). La sensibilidad de los invertebrados acuáticos muestra importantes variaciones de acuerdo con la especie considerada y el tipo de surfactante. *Daphnia magna* es el crustáceo más sensible a los surfactantes.

Numerosos estudios han sido realizados con el objetivo de investigar el efecto de los surfactantes en las plantas. Marcshner (1992) apunta que la exposición de una planta al LAS puede ocasionar la destrucción de la membrana de las células presentes en la raíz así como cambios en la permeabilidad celular y alteraciones en procesos fisiológicos como la fotosíntesis. Varios investigadores señalan también el impacto del LAS en la germinación y crecimiento de algunas plantas terrestres (como el girasol) sometidos a concentraciones superiores a los 10 mg/l. No obstante, los efectos ocasionados por el LAS en la flora comienzan a ser observados a partir de concentraciones de 90 mg de LAS/kg de suelo (Jensen, 1999).

No sólo las bacterias, los invertebrados y las plantas son sensibles a los surfactantes aniónicos, sino que también los vertebrados pueden mostrar síntomas tóxicos típicos. El LAS produce efectos tóxicos para los juveniles de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Buhl and Hamilton, 2000) y a determinados tejidos del pez *Rita rita*, (Roy, 1988 a,b,c).

Algunos estudios han demostrado el impacto de los surfactantes aniónicos sobre la actividad de ciertas enzimas, debido a la unión de estos compuestos a su proteína. Swisher (1987) demostró que el LAS a altas concentraciones puede afectar la actividad de las enzimas. Es conocido que el LAS puede acumularse en los liposomas hepáticos de ratas pudiendo inhibir la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina (Bragadin *et al.*, 1996). En este contexto, la concentración y la longitud de la cadena alquílica de los surfactantes son

factores responsables de la actividad o de la inhibición de ciertas enzimas (Housaindokh *et al.*, 1993).

Cabe destacar que la toxicidad de los homólogos e isómeros que conforman la mezcla comercial del LAS es diferente en cada caso, y conforme aumenta la longitud de la cadena alquílica lineal, aumenta la toxicidad del compuesto (BKH Consulting Engineers, 1993). El extendido uso doméstico que se hace del LAS incrementa el riesgo de exposición a piel, ojos, mucosas, etc. hecho que debe ser evaluado a la hora de estudiar la toxicidad del producto. La concentración a la que se encuentra el LAS en las distintas formulaciones depende del uso al que se destine, variando entre un 1% y un 50%. El LAS puro es irritante para ojos y piel, y dependiendo de la concentración, las distintas disoluciones pueden o no poseer carácter tóxico: disoluciones con una concentración de más del 65% se consideran "tóxicas por ingestión" (Comisión europea de surfactantes y sus intermediarios orgánicos, 2000).

Pese a todo lo anteriormente expuesto, ciertos estudios (HERA, 2004) parecen apuntar a una escasa incidencia del LAS sobre los distintos compartimentos ambientales, como queda puesto de manifiesto en la Tabla 1.7. por los reducidos valores del índice PEC/PNEC (un parámetro que evalúa el riesgo de que una cierta sustancia presente en el medio represente una amenaza para los seres vivos que habitan en él) definido como la relación entre la concentración previsible en el medio (predicted environmental concentration - PEC) y la concentración máxima que se espera no produzca efecto alguno (predicted no-effect concentration - PNEC), siempre inferiores a la unidad.

Tabla 1.7. Relación PEC/PNEC para el LAS en diferentes medios (HERA, 2004)

MEDIOS	PEC	PNEC	PEC/PNEC
Medio acuático (mg/l)	0,047	0,27	0,17
Medio terrestre (mg/l)	1,4	4,6	0,30
Sedimentos (mg/l)	5,3	8,1	0,65
EDAR (mg/l)	0,14	3,5	0,04

1.4.1.5 Biodegradación del LAS

Bajo el término de biodegradación se engloban todos aquellos procesos realizados por agentes microbiológicos medioambientales que transforman la materia orgánica compleja en compuestos más simples capaces de ser utilizados como alimento y generar energía, además de ser transformados en material inorgánico después de sufrir diferentes procesos químicos. Del concepto de biodegradación se deduce el de la biodegradabilidad, que se puede definir como “la susceptibilidad de una sustancia a la degradación biológica” Estos procesos se pueden llevar a cabo bajo diferentes tensiones de oxígeno:

- Condiciones aerobias, donde el flujo de oxígeno excede a la demanda de este gas que la actividad bacteriológica puede requerir.
- Condiciones anaerobias, de las que se distinguen dos tipos:
 - 1) Aquellas donde la velocidad de consumo de oxígeno excede a la velocidad de difusión.
 - 2) Aquellas donde el oxígeno es totalmente excluido, esto es en condiciones estrictamente anaerobias.

En el caso de los surfactantes, resulta preciso diferenciar entre biodegradación primaria y biodegradación última. La biodegradación primaria se define como el proceso que ocurre en la estructura de la molécula que implica la pérdida de las propiedades surfactantes, es decir, la estructura de la molécula original es alterada por la acción bacteriana (Hrsak, 1996). Esta pérdida de las propiedades tensioactivas o surfactantes, es una secuencia de pasos y no un cambio brusco. El concepto de biodegradación primaria es importante, por su relación con problemas visibles, como el de espumación que puede aparecer en los ríos. La biodegradación última es aquella en que la molécula del surfactante es convertida en gases (CO_2 y CH_4), agua, sales minerales y biomasa, es decir, es la destrucción de la molécula del compuesto químico (Taylor and Nickless, 1979; Federle and Schwab, 1992; Karsa and Porter, 1995).

El conocimiento del proceso degradativo del LAS es aún escaso. Es sin embargo bien conocido que la acción de la comunidad microbiana resulta esencial para su degradación (Jiménez *et al.*, 1991; Sigoillot and Nguyen, 1992; Hrsák and Begonia, 1998, 2000; Schleheck *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2000).

El LAS es comúnmente referido como un surfactante con elevada capacidad de ser biodegradado en condiciones aeróbicas (95% por degradación primaria) (Berna *et al.*, 1989). Sin embargo, bajo condiciones anaerobias, su biodegradabilidad es mínima y se realiza mediante un sistema de mecanismos que aún no se conocen en profundidad, aunque este es un tema que actualmente sigue siendo motivo de numerosas investigaciones y discusiones científicas.

Son muchos los factores a tener en cuenta a la hora de estudiar la biodegradabilidad del LAS, entre ellos podemos citar: la concentración de oxígeno disuelto, presencia de surfactantes catiónicos, sales o contaminantes orgánicos y pH, entre otros. Bajo condiciones anaerobias, los procesos de biodegradación se dan con mayor dificultad. McEvoy and Giger (1985) midieron las concentraciones de LAS en lodos antes y después de su digestión anaerobia y sugieren que no ocurre degradación del LAS durante esta digestión. Según Matthijs and De Henao (1987) las concentraciones de LAS en lodos anaerobios son significativamente más elevadas que en lodos aerobios. Por todo lo expuesto hasta el momento, el LAS se ha considerado como una sustancia no degradable en medios anaeróbicos (Giger *et al.*, 1989; Painter and Mosey, 1992; Denger *et al.*, 1996). No obstante, hay presencia de ácidos sulfonilcarboxílicos (SPCs) en sedimentos marinos anaeróbicos (González-Mazo *et al.*, 1997) y además, se ha descrito que el LAS puede ser usado como fuente de azufre por una bacteria anaeróbica (Denger and Cook, 1999). Estudios recientes muestran que la resistencia del LAS a la biodegradación en condiciones anaeróbicas es debido en parte a su falta de biodisponibilidad (Mogesen *et al.*, 2003; García *et al.*, 2006). El empleo de reactores que permitan una mayor biodisponibilidad del LAS incrementa considerablemente la biodegradabilidad del homólogo C-12 en anaerobiosis (Mogesen *et al.*, 2003). Según Leon *et al.* (2001), el LAS puede iniciar su biodegradación en condiciones aerobias y continuar en condiciones anaerobias.

El LAS sufre degradación primaria inducida por microorganismos en condiciones aerobias, generándose ácidos sulfofenil carboxilatos (SPC_s) como intermediarios de biodegradación. El proceso de biodegradación comienza mediante una ω -oxidación y seguidamente β -oxidación, seguida de la apertura del anillo y la desulfonación (Schöberl, 1989; Cook, 1998; Yadav *et al.*, 2001). Estos compuestos intermedios poseen una toxicidad mucho menor que la molécula madre, además de no presentar propiedades deterativas. La biodegradación completa del LAS concluye con la rotura del anillo bencénico y la total mineralización del compuesto transformándose en CO₂, H₂O, NaSO₄, que se incorporan a la biomasa del ecosistema (Heinze *et al.*, 1993) (Fig. 1.7). En este contexto, *Parvivaculum lavamentivorans*, una bacteria heterotrófica, utiliza 3-C12-LAS como única fuente de carbono y energía, y excreta 4-C6-SPC (Schleheck *et al.*, 2000, 2003). Seguidamente otra bacteria, *Delftia acidovorans*, lleva a cabo una mayor degradación de este SPC (que se degrada completamente en cultivos puros) mediante la ruptura del anillo (Schulz *et al.*, 2000). Algunos autores hablan de rutas de degradación alternativas que implican una desulfonación inicial del LAS (Campos-Garcia *et al.*, 1999).

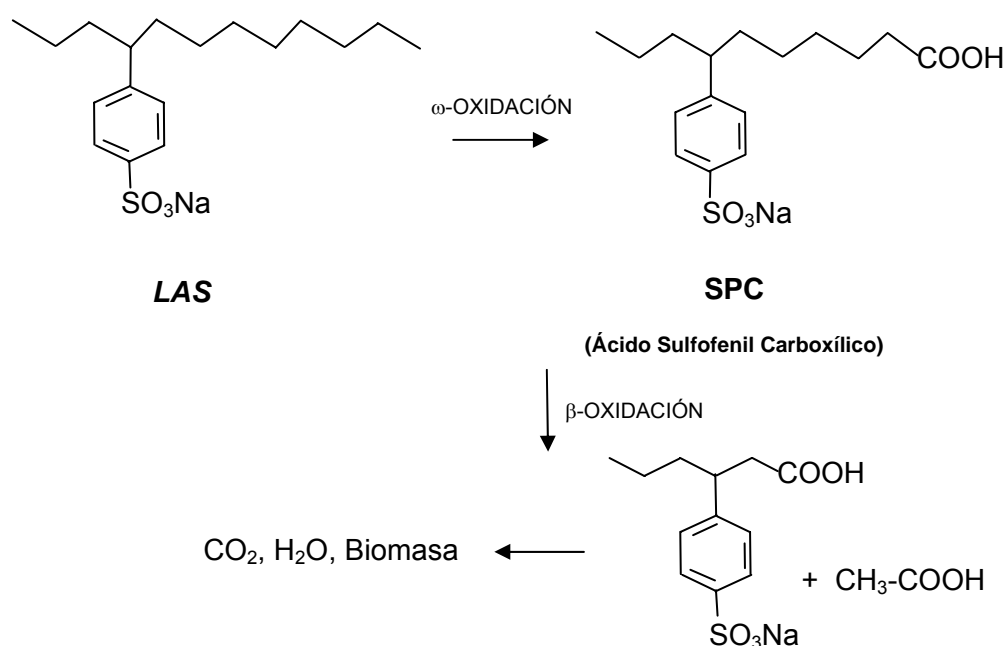


Fig 1.7. Biodegradación completa del LAS (Redibujado de Heinze and Brittonm, 1993)

En general la completa degradación de los surfactantes requiere de la intervención de un consorcio microbiano. De esta manera, la degradación del LAS precisa la acción de 4 miembros del consorcio, 3 para degradar de forma sinérgica la cadena lateral y uno más para la mineralización del anillo aromático (Van Ginkel, 1996; Hrsak and Grbic-Galic, 1995; Hrsak, 1996; Jiménez *et al.*, 1991; Yadav *et al.*, 2001). Esta hipótesis es reforzada con el descubrimiento de SPCs α,β -insaturados en cultivos mixtos (Eichhorn and Knepper, 2002). Según Jiménez *et al.* (1991), el LAS es mineralizado bajo condiciones aerobias por un consorcio, compuesto por cuatro miembros bacterianos Gram negativos, tres de los cuales poseen propiedades bioquímicas características de *Pseudomonas* sp., y el cuarto características de *Aeromonas* sp. Además, algunos estudios elaborados usando cultivos puros han demostrado que muchas especies de bacterias degradan parcialmente LAS pero no mineralizan completamente el surfactante (Sigoillot and Nguyen, 1990; Swisher, 1987). Khaled and Khleifat (2006) observaron que un consorcio bacteriano constituido por dos miembros (*Pantoea agglomerans* y *Serratia odorifera*) eran capaces de degradar LAS si se les hacía crecer en un medio mínimo y en otro suplementado con fuentes de carbono y nitrógeno. Por lo anteriormente expuesto, la completa degradación biológica de los surfactantes parece requerir la actividad de distintos consorcios microbianos, y es por ello que en numerosas ocasiones el intento de conseguir la completa degradación de estos productos mediante la utilización de un único microorganismo ha fracasado de forma reiterada hasta el momento actual. Según Swisher (1987) entre las especies que más comúnmente se encuentran en el medio ambiente y son capaces de degradar tensioactivos se encuentran *Pseudomonas* y *Aerobacterias*. Yoshimura (1984) aisló bacterias de lodo activos procedentes de ríos y encontró entre ellas especies como *Pseudomonas*, *Necromonas* y *Moraxella*, capaces de degradar la cadena alquílica del LAS pero no el anillo bencénico, mientras otras especies Gram negativas no podían degradar el LAS pero si el anillo, por lo que una mezcla binaria de estos dos tipos de organismos serían capaces de degradar el 100 % de LAS.

Los diferentes homólogos e isómeros del LAS son atacados a través de diversas rutas; de acuerdo con el “principio de distancia” (Enciclopedia of Industrial Chemistry, 1994;

Roberts, 1991; Swisher, 1963; 1987), la velocidad de degradación aumenta cuando se incrementa la distancia del grupo metilo terminal al lugar donde se acopla el grupo sulfonilo o cuando se incrementa la longitud de la cadena alquílica. Según un estudio desarrollado por Coello *et al.* (2004) en el que se comparan los distintos tiempos de biodegradación para cada uno de los homólogos del LAS individualmente en un reactor biológico a escala de laboratorio, los mayores tiempos son observados en aquellos homólogos de mayor longitud de cadena alquílica.

La vida media del LAS varía sensiblemente en función del medio donde este se encuentra, fluctuando entre las 3-4 horas en plantas depuradoras a los varios días en el caso de lodos, suelos o sedimentos aerobios. No obstante, en todos los casos la tasa de biodegradabilidad es cercana al 100%. Numerosos estudios han demostrado que el LAS en condiciones aeróbicas es rápidamente degradado (Jensen, 1999; Kùchler and Schnaak, 1997).

La vida media del LAS en suelos agrícolas es de entre 1 y 4 semanas, debido en gran medida a la intensa biodegradación ejercida por los microorganismos del suelo (Kanaebel *et al.*, 1990; Brandt *et al.*, 2003). Debido a este proceso, su acumulación en el medio edáfico se ve fuertemente disminuida presentando una reducida vida media (Kùchler and Schnaak, 1997). En la Tabla 1.8. se muestra la vida media del LAS en suelos según diferentes autores.

Tabla 1.8. Vida media del LAS en suelo (días, según diferentes autores)

AUTOR	VIDA MEDIA (DÍAS)
De Henau <i>et al.</i> (1986)	8-27
Litz <i>et al.</i> (1987)	7-10
Figge and Schöberl (1989)	13-26
Holt <i>et al.</i> (1989)	22
Kuchler and Schnaak (1997)	3-7
Jensen <i>et al.</i> (1999)	7-21
Scott and Jones (2000)	1-87
Elsgaard <i>et al.</i> (2001b)	14
Elsgaard <i>et al.</i> (2003)	1-4,1
Jacobsen <i>et al.</i> (2004)	20
Ying (2006)	7-33

De la Tabla 1.8. se desprende que el LAS presenta en todos los casos una reducida vida media, lo cual parece indicar que los microorganismos del suelo se adaptan a la biodegradación de este compuesto.

A pesar de que tradicionalmente se consideraba que el tipo de suelo no afecta la biodegradación del LAS (Larson *et al.*, 1989), estudios más recientes (Knaebel, 1994; 1996) revelan una importante incidencia de las características edáficas sobre el proceso de biodegradación del tensioactivo. De esta manera, la biodisponibilidad y biodegradabilidad del LAS no sólo depende del porcentaje de LAS aportado y de sus características moleculares (Litz *et al.*, 1987; Schöberl *et al.*, 1988; Knaebel *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 2004) sino también de factores físicos y químicos del suelo tales como temperatura, pH, oxígeno, contenido en materia orgánica y contenido de agua. De esta manera, el pH y el contenido de materia orgánica del suelo presentan una relación directa con la adsorción del LAS (Kristiansen *et al.*, 2003) mientras que la humedad del suelo se relaciona positivamente con la biodisponibilidad del LAS y, por tanto, con su toxicidad para los microorganismos edáficos (Nielsen *et al.*, 2004). La adsorción del LAS al suelo depende también de las

características químicas particulares de los diferentes homólogos del LAS. Según Hand and Williams (1987), los homólogos del LAS con cadenas más largas pueden ser adsorbidos con más intensidad por las partículas del suelo y lo mismo ocurre conforme aumenta la distancia del grupo sulfonilo al final de la cadena alquílica. Jacobsen *et al.* (2004), observaron en microcosmos edáficos que la vida media del homólogo C13 era mayor que la vida media de los homólogos con cadenas más cortas, debido a la mayor adsorción de este homólogo en el suelo y su menor biodisponibilidad. Knaebel *et al.* (1996) demostraron que la gran afinidad del LAS por la matriz del suelo, disminuye su biodisponibilidad para la biodegradación. Muchos autores indican que el coeficiente de adsorción del LAS al suelo está probablemente correlacionado con su contenido en materia orgánica y en arcilla (Matthijs and DeHenau, 1985; Litz *et al.*, 1987; McAvoy *et al.*, 1994; Di Toro *et al.*, 1990; Bintein and Devillers, 1994).

Un problema adicional que puede afectar a la biodegradación del LAS y, como consecuencia, potenciar su efecto tóxico en el medio ambiente terrestre y acuático, es su precipitación con sales de calcio y magnesio. Una vez precipitado el LAS disminuye su disponibilidad para ser biodegradado (Berna *et al.*, 1989; De Wolf and Feijtel, 1998; Verge *et al.*, 2001, García *et al.*, 2006).

1.5. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS AL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DEL SUELO

El estudio del impacto de compuestos contaminantes xenobióticos sobre la composición, estructura, diversidad y función de la comunidad microbiana en el suelo se ha enriquecido considerablemente en las últimas décadas como consecuencia de la incorporación a la ecología microbiana de nuevas técnicas de estudio derivadas de los campos de la biología molecular y de la bioquímica. A continuación se procede a la descripción de estas nuevas metodologías, las cuales han sido utilizadas en las distintas etapas de esta investigación.

1.5.1. Técnicas bioquímicas aplicadas al estudio de la función de la comunidad microbiana en el suelo. Actividades enzimáticas

La comunidad microbiana del suelo desempeña una función básica en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos y es, en buena medida, responsable del desarrollo de la estructura y función del ecosistema edáfico (Smith *et al.*, 1993). Los microorganismos del suelo, gracias a su gran versatilidad bioquímica, desempeñan una gran variedad de funciones en el ecosistema, todas ellas basadas en su capacidad para participar en una amplia diversidad de reacciones biogeoquímicas, tales como reacciones de oxidación, reducción y precipitación (García *et al.*, 2003).

En este sentido, el estudio de las actividades enzimáticas en el suelo constituye un adecuado indicador que puede proporcionar una visión generalizada del estado biológico y bioquímico del sistema, ya que es un parámetro sensible y útil en la monitorización de los cambios que puedan darse en el suelo tras ser sometido a procesos de contaminación. De esta manera, el análisis de la actividad enzimática del suelo permite evaluar la incidencia de acciones diversas sobre él, y su influencia en la calidad biológica y bioquímica del ecosistema. Jensen *et al.* (2001), demostraron que el LAS puede causar la inhibición de la actividad biológica en el suelo, afectando de forma decisiva a su fertilidad y a los ciclos de los nutrientes.

Las reacciones bioquímicas del suelo son mediadas por enzimas, que son proteínas con propiedades catalíticas específicas para los tipos de reacciones en las que participan. Esta especificidad es impuesta por la naturaleza de los grupos radicales ligados a las cadenas de las sustancias susceptibles. Así, las principales propiedades de las enzimas son su especificidad y su eficiencia catalítica.

Las enzimas son difíciles de extraer del suelo, por lo que se estudian indirectamente a través de su actividad. A excepción de la enzima deshidrogenasa, la cual sólo se encuentra en células viables, la mayor parte de las enzimas pueden existir de forma libre en la matriz edáfica, bien secretadas por microorganismos, bien originadas a partir de desechos microbianos y/o residuos vegetales. Cuando se inmovilizan en coloides minerales (arcillas) u

orgánicos (moléculas húmicas) resultan especialmente adecuadas como indicador, ya que son más resistentes a la degradación y permanecen activas en el suelo por más tiempo.

Es importante considerar que los valores de las actividades enzimáticas susceptibles de ser medidas deben ser considerados como potenciales, ya que corresponden a condiciones "in vitro" donde la temperatura, pH, oxígeno y otras variables que afectan la actividad microbiana son optimizados.

Como ha sido comentado previamente, la actividad deshidrogenasa se produce de manera intracelular y esta asociada a procesos respiratorios de los microorganismos. Por tanto, se considera que esta actividad enzimática es más dependiente del estado metabólico y de la actividad biológica en general que cualquiera de las demás actividades presentes en el suelo. La actividad deshidrogenasa se utiliza con frecuencia como un indicador de la biomasa y de la actividad microbiana. Numerosos estudios (Malkomes and Wöhler, 1983; Kowalczyk, 1992; Elsgaard *et al.*, 2001a) han demostrado que la actividad deshidrogenasa disminuye progresivamente ante valores crecientes de concentración de LAS en el suelo.

El fósforo, junto con el nitrógeno, constituye un importante factor limitante para las plantas y microorganismos del suelo. Los vegetales deben absorberlo en su forma reactiva soluble a través de su sistema radicular. La concentración de esta forma de fósforo en el suelo es reducida, y normalmente muestra rangos de concentración que varían entre 5 y 30 mg/kg. Estos reducidos valores de concentración son, en parte, consecuencia de los procesos de precipitación del fósforo reactivo soluble tras reaccionar con iones de calcio, hierro y aluminio, lo que disminuye de forma notable la biodisponibilidad del fosfato. Estos procesos de inmovilización también afectan a los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos (Peix *et al.*, 2001). Por tanto, la solubilización del nutriente desde las distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico derivada de la actividad de los microorganismos del suelo resulta una vía fundamental que garantiza el aporte de fósforo al sistema. Las enzimas fosfatasas (tanto ácida como alcalina) hidrolizan el fósforo no disponible para los productores primarios del suelo hasta formas inorgánicas bioasimilables. La mayoría de los estudios atribuyen un origen microbiano a la actividad

fosfatasa en el suelo, aunque en muchas ocasiones esta actividad es temporal y se pierde con rapidez (Dick and Tabatabai, 1993). La actividad de las enzimas fosfatasas es inhibida (retroinhibida) por el producto final de su reacción enzimática, el fósforo inorgánico. De esta manera, sólo se produce la activación de la actividad fosfatasa microbiana si existen deficiencias en la concentración de fósforo inorgánico soluble disponible (Nannipieri *et al.*, 1979).

La arilsulfatasa juega un importante papel en los procesos en los que el azufre orgánico del suelo es mineralizado y transformado para quedar biodisponible para los productores primarios. (Freney, 1961; Tabatabai and Bremner, 1972; Neptun *et al.*, 1975). Esta capacidad enzimática, una de las más comunes en los suelos (Speir, 1978), permite a las plantas (Freney *et al.*, 1975), bacterias y hongos del suelo (Dodgson *et al.*, 1982) no sólo satisfacer su necesidad en ión sulfato, sino también degradar ciertos compuestos xenobióticos (Kertesz *et al.*, 1994) cuya presencia puede ser negativa para ellos. Todo ello justifica la necesidad de conocer y evaluar su capacidad hidrolítica en cada medio concreto (González *et al.*, 2003).

1.5.2. Técnicas moleculares de determinación de la biodiversidad microbiana en el suelo

Tradicionalmente, la visión acerca de la diversidad de microorganismos edáficos estaba basada en la obtención de cultivos de laboratorio en medios especialmente formulados para ello. Sin embargo, algunos autores estiman que sólo el 1% de los microorganismos del suelo crecen en medios de cultivo en el laboratorio y no se conoce con exactitud si este porcentaje es representativo de la densidad que realmente habita en el sistema (Torsvik *et al.*, 1990; Torsvik *et al.*, 1998). Debido a esto, resulta imposible elaborar una clasificación de los microorganismos en función de sus propiedades fisiológicas y bioquímicas, dado que aproximadamente un 99% de la totalidad de microorganismos que existen en la naturaleza no ha sido jamás aislado ni cultivado en condiciones de laboratorio (Muyzer, 1999). Esta situación es consecuencia en gran medida de la falta de conocimientos sobre los requerimientos reales de los mismos en condiciones naturales, que impide emular

con precisión tales condiciones en el laboratorio, así como al aún insuficiente conocimiento de las posibles interdependencias entre los microorganismos en sus hábitats naturales (Muyzer and Smalla, 1998). Por tanto, la diversidad procariota conocida representa solo la punta del iceberg, y en las últimas décadas se ha hecho manifiesta la necesidad de introducir nuevas técnicas que proporcionen el complemento necesario a los métodos microbiológicos tradicionales y que permitan obtener una información más precisa sobre la importancia de la diversidad bacteriana en el mantenimiento de los ecosistemas.

En este contexto, a partir de la década de los ochenta se produjo una revolución espectacular en el conocimiento de la biodiversidad microbiana en suelos debido a la incorporación de novedosas y potentes técnicas de estudio que no requieren del cultivo previo de los microorganismos (Insam, 2001; Kirk *et al.*, 2004). Estas técnicas se basan en el análisis de ácidos nucleicos (DNA y RNA) que pueden extraerse directamente de muestras de suelo sin necesidad de realizar cultivos previos y que permiten diferenciar de forma precisa los distintos grupos de microorganismos presentes en el mismo. La descripción de los microorganismos presentes en muestras de suelo experimentó un gran avance gracias a la utilización de la información que proporcionan los genes que codifican el RNA ribosómico, y en particular el gen que codifica la subunidad menor del ribosoma bacteriano 16S rRNA (ADNr 16S) (Macrae, 2000) (Fig. 1.8). La utilización de este marcador molecular presenta una serie de ventajas: 1) esta presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos; 2) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; 3) Su transmisión es principalmente vertical ya que se considera que no está sujeto a transferencia génica horizontal entre microorganismos; 4) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado como para proporcionar suficiente información y 5) el análisis de su secuencia permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos. Por todo ello, este gen cumple los requisitos para actuar como una apropiada sonda evolutiva, al tratarse de un gen de distribución universal que posee una función constante, que cambia con suficiente lentitud como para permitir detectar relaciones muy antiguas, y de un tamaño relativamente pequeño (aproximadamente 1,5 Kb) que ha facilitado su secuenciación. La secuencia del ADNr 16S

presenta una estructura de mosaico caracterizada por la alternancia de regiones altamente conservadas en el reino procariota y de regiones hipervariables que sólo están conservadas entre los individuos evolutivamente muy próximos. Esa estructura ha permitido el diseño de cebadores universales para la aplicación de estrategias de PCR (Weisburgh *et al.*, 1991), que posibilitan la clonación de fragmentos de los ADNr 16S de microorganismos a partir de ADN total extraído de muestras naturales y, de este modo, profundizar en el conocimiento de la diversidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas naturales (Muyzer and Smalla, 1998).

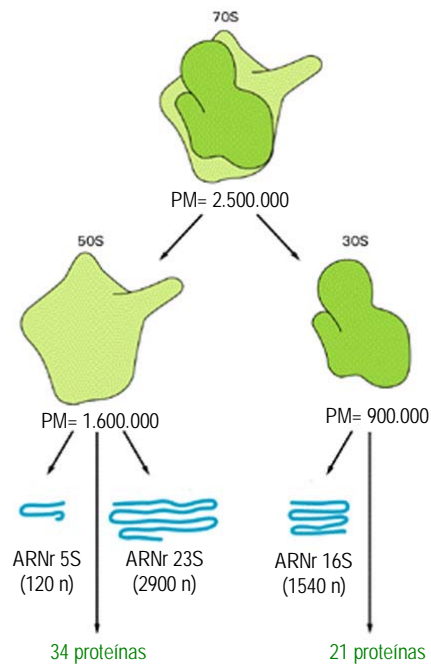


Fig 1.8. Estructura y componentes del ribosoma procariota

A pesar de que estos estudios proporcionan una exploración de la diversidad microbiana superior a la que se vislumbraba a partir de los métodos tradicionales dependientes de cultivo de los microorganismos, presentan dos claros inconvenientes: la clonación es un método laborioso y poco práctico para múltiples muestras, y por lo tanto es difícil de aplicar en el estudio de la dinámica de poblaciones, constantemente influenciadas por las fluctuaciones naturales de los parámetros ambientales o las perturbaciones

introducidas por la actividad humana sobre el medio ambiente. Por ello más recientemente se han desarrollado otras técnicas de huella genética más apropiadas para estos propósitos. En este contexto, Muyzer (1999) introdujo la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) en el campo de la ecología microbiana. Esta técnica, junto con su homóloga TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura), fue inicialmente diseñada para distinguir mutaciones genéticas, y permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño pero de distinta secuencia de nucleótidos.

El fundamento de la técnica se basa en la disminución de la velocidad electroforética que sufren las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturadas, debido a cambios de la forma física que afectan a su movilidad cuando migran en la matriz de un gel que contiene un gradiente lineal de agentes desnaturantes del ADN. El gradiente desnaturante se puede crear bien a partir de sustancias químicas (DGGE) o bien mediante un rango de temperaturas (TGGE) que es más fácilmente reproducible, y por tanto proporciona resultados más comparativos (Riesner *et al.*, 1989). Cuando la electroforesis de una mezcla de fragmentos amplificados de ADN a partir de ADN total extraído de una muestra ambiental se realiza en condiciones adecuadas en geles de poliacrilamida bajo un gradiente lineal de desnaturantes, las moléculas con distinta secuencia se desnaturizan parcialmente a distintas alturas del gradiente, y como consecuencia se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer and Smalla, 1998; Muyzer, 1999). De esta forma, resulta posible obtener perfiles de la composición de la población en la muestra de partida. Una vez separadas, las bandas correspondientes a distintas secuencias de ADN pueden reamplificarse con los mismos cebadores y ser secuenciadas, permitiendo la comparación de las nuevas secuencias con las ya conocidas y depositadas en los bancos de datos, estableciendo finalmente su afiliación taxonómica (Fig. 1.9).

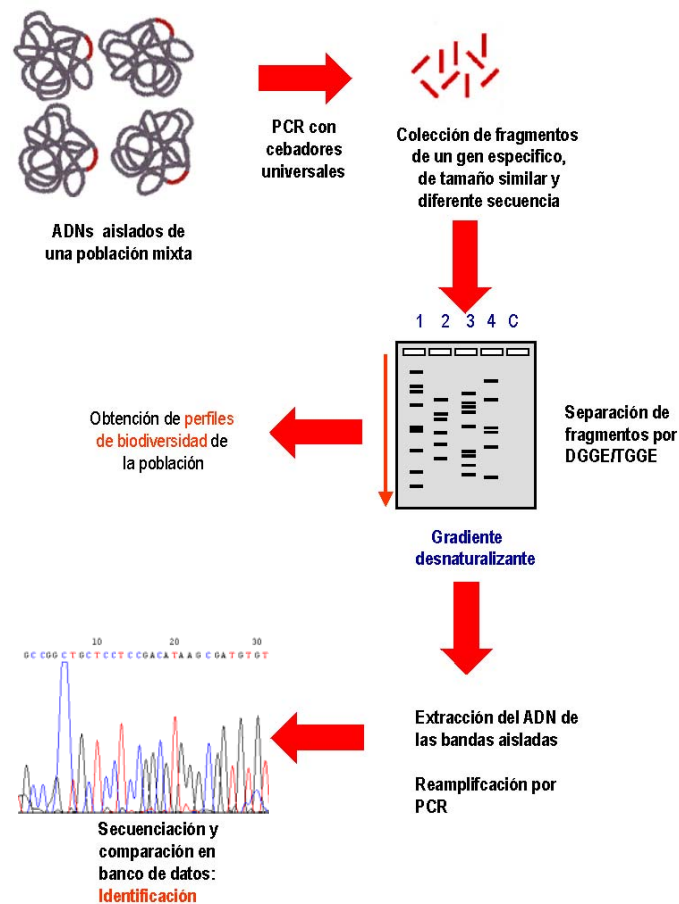


Fig 1.9. Esquema de la aplicación de la técnica de DGGE/TGGE a estudios de la biodiversidad microbiana de los ecosistemas

Las ventajas de esta técnica son múltiples: permite investigar la diversidad de una población microbiana natural sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes, posibilita la identificación de los microorganismos hasta nivel de especie, es apta para el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, y permite comparar los perfiles de biodiversidad de la población evaluando diferencias espaciales y temporales en un determinado nicho ecológico, así como el impacto producido por la introducción de agentes externos (Kirk *et al.*, 2004). Hoy en día se considera una técnica especialmente apropiada para la caracterización de poblaciones naturales, en las que, como se expuso

anteriormente, un porcentaje elevado de microorganismos presentes pueden ser no cultivables.

Las técnicas de DGGE/TGGE son de una gran versatilidad y admiten numerosas variantes en su aplicación, siendo su principal limitación el tamaño máximo de los fragmentos a separar (<500pb). La opción inicial y más utilizada se basa en la amplificación de fragmentos del ADNr 16S de los integrantes de la población objeto de estudio, aunque existen numerosas variaciones de la técnica puestas a punto por diferentes laboratorios a lo largo de la última década. Las regiones hipervariables escogidas con más frecuencia para estos estudios son la V3 y la V6, para las cuales se han diseñado parejas de cebadores universales (Muyzer and De Vaal, 1994; Heuer *et al.*, 1997).

La desventaja de emplear cebadores universales para el ADNr 16S radica en la limitación física para separar un elevado número de fragmentos en la superficie del gel, lo cual conduce a patrones de poblaciones muy complejos, que dificultan el aislamiento de bandas individuales para su reamplificación y secuenciación, y que tan sólo aportan información acerca de los microorganismos predominantes en una comunidad determinada (Muyzer and Smalla, 1998). Por este motivo, en el presente trabajo de investigación se han seleccionado parejas de cebadores que permiten la amplificación selectiva de fragmentos del ADNr 16S de distintos grupos bacterianos. En concreto, esta técnica ha permitido el estudio de los grupos bacterianos más representativos del suelo agrícola problema:

- Actinomicetos (Heuer *et al.*, 1997).
- Alfa-proteobacterias (Gomes *et al.*, 2001)
- Beta-proteobacterias (Gomes *et al.*, 2001)
- Acidobacterias (Barns *et al.*, 1999)

Para cada uno de los grupos bacterianos se han aplicado estrategias de PCR anidada, empleando un primer par de cebadores específico de grupo, seguido de un segundo par de cebadores universales, para obtener finalmente amplicones de un grupo de

población determinado que reúnen los requisitos para ser susceptibles de separación DGGE/TGGE (Muyzer and Smalla, 1998; Gomes *et al.*, 2001).

Recientemente, este tipo de investigaciones han dado un nuevo giro, enfocándose hacia el estudio de la biodiversidad de grupos microbianos con papeles ecológicos concretos (grupos funcionales) y empleando genes funcionales como base del estudio. Esta aproximación proporciona patrones de la diversidad genética para el gen funcional del que se trate, y permite el estudio de actividades específicas de determinadas poblaciones facilitando tanto la discriminación entre microorganismos filogenéticamente cercanos pero con diferentes papeles ecológicos, como de grupos funcionales constituidos por microorganismos filogenéticamente heterogéneos. Un ejemplo de esta aplicación es el estudio del grupo bacteriano de oxidadoras de amonio, mediante amplificación del gen *amoA*, estructural para la subunidad α de la enzima amonio-monooxigenasa (Rotthauwe *et al.*, 1997; Nicolaisen and Ramsing, 2002). Como se ha comentado en el apartado 1.4.1.4.1., las bacterias oxidadoras de amonio son un grupo especialmente sensible al LAS. La especie oxidadora de amonio por excelencia es *Nitrosomonas europaea*. Por otra parte, las bacterias del género *Nitrospira* sp. son encontradas en muy pocos casos.

El suelo, debido a sus especiales características y a su estabilidad, constituye un tipo de ecosistema en el que la diversidad de microorganismos se hace especialmente evidente. En términos de abundancia, los aportes de materia orgánica e inorgánica que el suelo recibe mantienen una inmensa cantidad de microorganismos que apenas aún se está comenzando a descubrir. Por este motivo, las técnicas DGGE/TGGE resultan de especial utilidad para poder establecer con rigor científico la importancia de la diversidad bacteriana (total o correspondiente a determinados grupos funcionales) así como la dinámica característica de sus poblaciones en el suelo (Gomes *et al.*, 2001; Nicolaisen and Ramsing, 2002; Cheung and Krinkle, 2001). De esta manera, la utilización de técnicas moleculares basadas en la secuenciación del ADNr 16S revolucionó en buena medida el campo de la microbiología edáfica a través del descubrimiento de nuevos grupos bacterianos, desconocidos hasta el momento. El ejemplo más apasionante lo constituye la constatación de la importancia de un nuevo Filum bacteriano, denominado Acidobacteria (Kuske *et al.*,

1997; Ludwig *et al.*, 1997), detectado en todos los suelos estudiados con técnicas moleculares. Desde el punto de vista filogenético se trata de un grupo extremadamente diverso, pero se dispone tan solo de tres géneros (con una especie cada uno) en cultivo de laboratorio y caracterizados taxonómicamente (*Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentans* y *Holophaga foetida*) (Janssen *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2002; Quaiser *et al.*, 2003), aunque muy recientemente ha sido aislado y caracterizado un nuevo género perteneciente al Filum Acidobacteria denominado *Terriglobus*, cuya especie tipo es denominada *Terriglobus roseus* (Stephanie *et al.*, 2007). Las capacidades metabólicas de estas especies son muy diferentes con lo que es difícil inferir el posible papel de las bacterias del Filum Acidobacteria en suelos. Algunos autores, basándose en el análisis filogenético del ARNr 16S proponen que las acidobacterias, se dividen en seis grupos que difieren hasta un 22% en sus genes ARNr 16S (Quaiser *et al.*, 2003; Barns *et al.*, 1999). A pesar de lo mencionado, la información genética y fisiológica acerca de las Acidobacterias es aún muy escasa.

Los Actinomicetos, que comprenden aproximadamente el 20-60% de la población microbiana del suelo, representan probablemente el grupo de bacterias más amplio y diverso en este ecosistema. Se encuentran distribuidos en diferentes hábitats, sin embargo su ambiente natural es el suelo, en el cual desempeñan su función ecológica principal de descomposición de la materia orgánica, incluyendo lignina y otros polímeros recalcitrantes.

Según Hugenholtz *et al.* (1998), de entre todos los grupos bacterianos presentes de forma habitual en muestras de suelo los más frecuentemente encontrados pertenecen a la subclase α de la clase proteobacteria, actinobacterias, y a los dos nuevos filum Acidobacteria y Verrucomicrobia.

Los métodos de identificación basados en técnicas moleculares han supuesto también un avance sin precedentes en el conocimiento de la ecología de las bacterias nitrificantes. Este grupo microbiano se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y parece tolerar un amplio espectro de condiciones ambientales. Según Atlas and Bartha (2001) se han aislado bacterias nitrificantes de suelos evidentemente ácidos (pH 4) y de sistemas donde la temperatura es extrema, como las profundidades del océano ($T < 5^{\circ}\text{C}$) y

desiertos ($T > 60^{\circ}\text{C}$). Aunque son aerobias, han sido aisladas en sistemas hipóxicos tales como redes de alcantarillado urbano o sedimentos marinos. Las bacterias nitrificantes son, además, de crecimiento extremadamente lento y muy difíciles de cultivar en condiciones de laboratorio. Debido a todas estas singulares características, el estudio de este grupo bacteriano resultaba especialmente complicado cuando sólo se basaba en la aplicación de técnicas microbiológicas clásicas. Este especial grupo comprende tanto las bacterias oxidadoras de amonio (fase I) como a las oxidadoras de nitrito (fase II).

De todo lo expuesto puede deducirse que el análisis de la biodiversidad microbiana supone una adecuada aproximación a la evaluación de la estabilidad y riqueza de los ecosistemas. Sin duda, una importante aplicación de este tipo de estudios consiste en la cuantificación del impacto antrópico sobre un ecosistema determinado. En principio, se podría partir de la hipótesis de que existe una relación inversa entre el grado de intervención o forzamiento del ecosistema y su biodiversidad microbiana. Además, este conocimiento podría ayudar a definir sistemas de reforestación o rehabilitación de zonas perturbadas, puesto que los microorganismos ayudan directamente al desarrollo de las plantas (Odalde and Aguilera, 1998). Es por ello que los efectos de prácticas agrícolas así como los producidos por fertilizantes, pueden ser evaluados a partir de las determinaciones de la biomasa microbiana, de su actividad metabólica y mediante el recuento de las poblaciones microbianas presentes en el suelo (Acuña *et al.*, 2006).

Aunque, como ha quedado expuesto en este capítulo de Introducción, existe actualmente un amplio conocimiento en torno a la biodegradación e impacto del LAS sobre la microbiota, la mayor parte de los estudios hasta ahora publicados abordan estas cuestiones desde posiciones sectoriales y/o monodisciplinarias, con las consiguientes limitaciones metodológicas y técnicas que esto conlleva. En este contexto, y como aportación a esta línea de investigación, en el presente trabajo se combinan técnicas correspondientes a distintas áreas de conocimiento como la microbiología, la química y la biología molecular, para determinar y cuantificar el impacto de un contaminante xenobiótico (LAS) sobre la composición, diversidad y función de la comunidad microbiana en el ecosistema edáfico.



2. OBJETIVOS

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

Hoy en día es innegable la crucial importancia que los detergentes representan en la calidad de vida de las personas. Su elevada producción mundial, la necesidad de su empleo y la toxicidad que pueden presentar tanto sus formas iniciales como algunos de sus productos de degradación, determinan la necesidad de su control en los diferentes compartimentos medioambientales. El Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (*LAS*) constituye el principio activo de la mayoría de estos detergentes y el uso de lodos biológicos junto con la marcada demanda de agua para el terreno de labor determina su presencia en el suelo. La microbiota edáfica resulta esencial para el correcto funcionamiento de este ecosistema, de manera que la presencia de *LAS* en los suelos agrícolas puede alterar tanto su biodiversidad como la densidad de sus poblaciones, lo cual se puede traducir a largo plazo en la pérdida de fertilidad del suelo.

En este contexto, y como objetivo principal de esta investigación, se pretende estudiar la capacidad de biotransformación del Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (*LAS*) por parte de la microbiota presente en un suelo agrícola de la Vega de Granada, así como detectar los posibles efectos que el tensioactivo pueda inducir sobre la composición y biodiversidad microbiana de dicho sistema edáfico.

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1) Analizar *in situ* la dinámica espacial y temporal del proceso de biotransformación del *LAS* mediante el seguimiento de la concentración del tensioactivo y del recuento de microorganismos cultivables heterótrofos tras adiciones controladas de *LAS* sobre una parcela experimental de la Vega de Granada.

2) Determinar la respuesta de la microbiota edáfica existente frente a la presencia del *LAS* en el suelo, así como su capacidad para biotransformarlo, mediante el aislamiento e

2. Objetivos

identificación de cepas bacterianas con capacidad de crecimiento en medios suplementados con diferentes concentraciones del surfactante.

3) Llevar a cabo ensayos de biotransformación y estudios de perfiles de biodiversidad en sistemas de microcosmos edáficos controlados adicionados de *LAS*, utilizando la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y empleando cebadores de PCR específicos para los grupos bacterianos más representativos presentes en el suelo (Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Acidobacterias, Bacterias Gram positivas de alto G+C y Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio). Estos ensayos permitirán describir el comportamiento diferencial de estos grupos frente a la presencia del contaminante.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. TRATAMIENTOS CON LAS EN PARCELAS EXPERIMENTALES

Con el objetivo de determinar *in situ* el efecto del LAS sobre la microbiota cultivable presente en suelos agrícolas, así como la biotransformación del tensioactivo, se llevaron a cabo una serie de ensayos consistentes en la adición del surfactante sobre el suelo de una parcela agrícola experimental localizada en la Vega de Granada (Fig. 3.1). La parcela objeto de estudio, de unos 36 m² de superficie, pertenece a la finca Santa María localizada en el municipio de Belicena a 5 km de Granada (coordenadas: 37° 11' 09,50" N; 3° 31' 39,85" O). La concentración inicial de LAS en el suelo de la parcela, previa al desarrollo de las adiciones, era de 0.3-0.4 mg/kg.

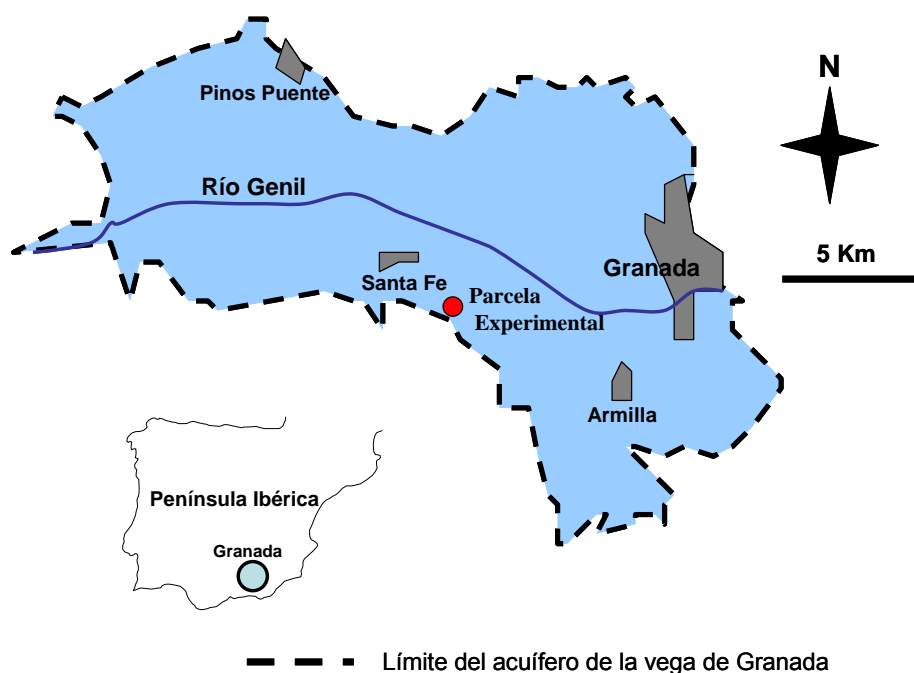


Fig 3.1. Plano de la Vega de Granada donde se muestra la localización de la parcela experimental en la que se realizaron los tratamientos *in situ*

En total se llevaron a cabo 4 ensayos, correspondientes a cada una de las estaciones del año (verano 2005, otoño 2005, invierno 2006 y primavera 2006). En todos los casos, la cantidad de LAS añadida a la parcela fue idéntica (5.5 g/m²), de manera que la variabilidad

registrada fuera sólo atribuible a las distintas condiciones meteorológicas y de riego. Para conseguir una concentración de *LAS* en la parcela de 5.5 g/m^2 , se pesaron y aplicaron al suelo 449.5 g de la mezcla comercial de *LAS* (44.05% materia activa) y se llevaron a un bidón que contenía 100 litros de agua de pozo. Tras agitar intensamente, la disolución lograda se vertía sobre el suelo experimental (Fig. 3.2).

Previamente a la adición del tensioactivo, el suelo objeto de estudio era humedecido mediante un riego superficial con agua de pozo, con objeto de evitar un exceso de infiltración de la solución acuosa de *LAS* a través de canales preferentes generados por desecación. Además, el suelo era sometido a riegos periódicos a lo largo de cada ensayo (frecuencia aproximada de riego: 6 días) con el objetivo de simular las condiciones naturales de un suelo de labor agrícola.

Además, a lo largo de todo el ensayo se controlaron una serie de variables ambientales tales como precipitación, evaporación, humedad relativa, velocidad del viento, temperatura del aire (máxima, mínima y media) y temperatura del suelo a 10, 25 y 50 cm de profundidad.



Fig 3.2. Parcela experimental donde se llevaron a cabo los experimentos de adición de LAS. En la imagen se puede apreciar el aspecto del suelo tras realizar una adición de LAS

Las variables meteorológicas consideradas consistían en valores medios diarios registrados por la estación meteorológica 84190 del Aeropuerto de Granada-Jaén “Federico García Lorca” (Lat. 37.18; Long. -3.78; Alt. 567 m.s.n.m).

La temperatura del suelo se determinó *in situ* mediante la utilización de tres sondas, las cuales permanecieron enterradas bajo el suelo durante cada uno de los tratamientos.

La Tabla 3.1. resume los valores de las principales variables meteorológicas y de temperatura del suelo registradas durante el periodo de estudio.

Tabla 3.1. Resumen de condiciones experimentales: Variables físicas del suelo y meteorológicas registradas durante cada tratamiento

Variables físicas	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Temperatura ambiente (°C) Max, Med, Min.	Max 35.5 Med 27.2 Min 16.6	Max 21.4 Med 14.6 Min 6.9	Max 14.0 Med 7.2 Min 1.5	Max 26.6 Med 17.4 Min 10.1
Temperatura a 10 cm de profundidad (°C)	23.4	16.5	8.7	18,9
Temperatura 25 cm de profundidad (°C)	23.0	16.3	8.6	20,4
Temperatura a 50 cm de profundidad (°C)	24.1	18.3	9.4	21,8
Humedad ambiente (%)	37.7	63.7	77.4	68.3
Precipitación (mm)	0	0.9	1.6	1.9
Evaporación (mm/día)	6.8	2.1	1.5	4.6
Velocidad del viento (m/s)	9.8	6.9	7.6	7.2

La toma de muestras a diferentes profundidades para la cuantificación de la microbiota cultivable y para la determinación de *LAS* se llevó a cabo mediante el uso de un muestreador tipo barrena (Fig. 3.3). En la determinación de la microbiota cultivable, las muestras fueron recogidas a 2, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 cm de profundidad en los tratamientos de primavera, otoño e invierno y a 1, 10, 20, 30, 40 y 50 cm de profundidad en el verano y esta toma fue realizada durante varios días en cada uno de los ensayos. Además, aproximadamente una semana antes de la adición de *LAS* en cada uno de los tratamientos, eran tomadas muestras de suelo a las profundidades antes mencionadas para determinar el estado de la microbiota cultivable previo a las adiciones (control). En el caso de la toma de muestras para la determinación de *LAS*, las muestras fueron recogidas a 1, 10, 20, 30, 40, y 50 cm de profundidad en el tratamiento de verano y a 2, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 cm de profundidad en los tratamientos de otoño, invierno y primavera y la toma de muestras también fue realizada durante varios días a lo largo de cada una de los ensayos. Igual que en el caso anterior, antes de realizar cada tratamiento eran recogidas muestras de suelo para cuantificar el *LAS* presente

en el suelo de partida (control).



Fig 3.3. Toma de muestras para la determinación de *LAS* en el suelo y de su microbiota cultivable

El tratamiento de verano se realizó entre los días 11 y 29 de julio de 2005. La dotación total de riego (utilizando agua de pozo) fue de 131.75 l/m² y se aplicó en dos ocasiones (días 17 y 24 de julio). Las condiciones meteorológicas durante este ensayo se caracterizaron por la elevada temperatura del aire, ausencia de precipitaciones, elevados valores de evaporación y reducida humedad relativa. La temperatura del suelo fue también elevada y de distribución relativamente uniforme a lo largo de los 50 cm muestreados.

El tratamiento de otoño se llevó a cabo entre los días 18 de octubre y 10 de noviembre de 2005. En este caso, la dotación total de riego fue de 133.31 l/m² y se aplicó en tres ocasiones. Además, se registraron episodios de precipitación que sumaron un total de 22.5 mm de lluvia acumulada. Las suaves temperaturas y la reducida velocidad del viento favorecieron el descenso de las tasas de evaporación. Análogamente al tratamiento estival, la temperatura del suelo a distintas profundidades era relativamente constante.

El tratamiento de invierno corresponde al periodo de tiempo comprendido entre los días 7 de febrero y 8 de marzo de 2006. La dotación de riego se aplicó en cuatro episodios y sumo un total de 133.31 l/m². Además, se registraron frecuentes eventos de precipitación en forma de agua y nieve, con una lluvia total acumulada de 46.6 mm. La elevada humedad relativa y reducida temperatura del aire favorecieron el desarrollo de bajas tasas de evaporación. En cuanto a la temperatura del suelo, se registraron los valores más bajos de todo el periodo de estudio, con un valor promedio de 8.9°C.

Finalmente, el ensayo de primavera se realizó entre los días 25 de abril y 15 de mayo de 2006. La dotación total de riego suministrado fue de 133.31 l/m² y se aplicó en 3 dosis sucesivas. Las frecuentes lluvias produjeron valores de precipitación acumulada de 38.9 mm y la tasa de evaporación creció debido al incremento de temperatura y reducción de la humedad relativa del aire. La temperatura del suelo fue alta y de distribución relativamente uniforme a lo largo de los 50 cm muestreados.

En la Tabla 3.2. se detallan las fechas en las que se llevó a cabo la colecta de muestras edáficas para determinación química de LAS y para cuantificación de la microbiota cultivable para cada uno de los distintos tratamientos. Igualmente, se detallan los momentos en los cuales se aplicó riego sobre el suelo experimental.

Tabla 3.2. Fechas de muestreo durante los tratamientos de verano, otoño, invierno y primavera. Se detallan las fechas de colecta de muestras para la determinación de LAS, para análisis microbiológico y el momento en que se aplicaron riegos

Tratamiento	Fechas de muestreo	Determinación de LAS	Determinación microbiológica	Riego
Verano	30/06/2005		*	
	12/07/2005	*		
	13/07/2005	*	*	
	15/07/2005	*	*	
	17/07/2005			*
	18/07/2005	*		
	20/07/2005	*		
	22/07/2005	*	*	
	24/07/2005			*
	25/07/2005	*		
	27/07/2005	*		
	29/07/2005	*	*	
Otoño	11/10/2005		*	
	19/10/2005	*	*	
	20/10/2005	*		
	21/10/2005	*	*	
	23/10/2005			*
	24/10/2005	*		
	23/10/2005	*		
	24/10/2005	*		
	26/10/2005	*	*	
	28/10/2005	*		
	30/10/2005			*
	31/10/2005	*		
	02/11/2005	*		
	04/11/2005	*	*	
	06/11/2005			*
10/11/2005	*	*		

Tabla 3.2. (cont). Fechas de muestreo durante los tratamientos de verano, otoño, invierno y primavera. Se detallan las fechas de colecta de muestras para la determinación de *LAS*, para análisis microbiológico y el momento en que se aplicaron riegos

Tratamiento	Fechas de muestreo	Determinación de <i>LAS</i>	Determinación microbiológica	Riego
Invierno	31/01/2006		*	
	08/02/2006	*	*	
	09/02/2006	*		
	10/02/2006	*	*	
	12/02/2006			*
	13/02/2006	*		
	15/02/2006	*	*	
	17/02/2006	*		
	19/02/2006			*
	20/02/2006	*		
	22/02/2006	*	*	
	24/02/2006	*		
	26/02/2006			*
	01/03/2006	*	*	
	05/03/2006			*
08/03/2006	*	*		
Primavera	16/04/2006		*	
	26/04/2006	*	*	
	27/04/2006	*		
	28/04/2006	*	*	
	30/04/2006			*
	01/05/2006	*		
	03/05/2006	*	*	
	05/05/2006	*		
	07/05/2006			*
	08/05/2006	*		
	10/05/2006	*	*	
	12/05/2006	*		
14/05/2006			*	
15/05/2006	*	*		

3.1.1. Determinación microbiológica. Tratamiento y siembra de las muestras procedentes de la parcela

Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo recolectadas durante los distintos tratamientos se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad.

Posteriormente se hicieron pasar a través de un tamiz de 1 mm de diámetro de poro. Una vez tamizadas, se procedió a la siembra de las muestras en placas que contenían medio TSA (Agar Trypticosa Soja, Oxoid®) diluido al 10% (Avidano *et al.*, 2005). La siembra se realizó a partir de 1 g de suelo, realizándose diluciones seriadas 1/10 de cada muestra en tubos de solución salina (CINa 0.9%). Para el aislamiento se tomaron volúmenes de 0.1 ml de cada dilución. Su extensión en la placa se llevó a cabo con espátulas de vidrio. Se realizaron tres repeticiones de cada una de las diluciones.

Una vez sembradas, las placas procedentes de cada dilución se dejaron incubar durante 48 horas a 30°C. Posteriormente, una vez se habían obtenido colonias bien diferenciadas, se procedía a su recuento. Los datos son expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g suelo).

3.1.2. Determinación de LAS en las muestras de suelo recolectadas durante los tratamientos (Nimer *et al.*, 2007)

Colecta y preparación de las muestras

Una vez tomadas las muestras de suelo, se procedió a la homogeneización de las mismas y a la inmediata adición de 3 % (v/v) de formaldehído, como agente conservante para evitar la actividad microbiológica. Alícuotas de aproximadamente 200 g de estas muestras fueron secadas a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez secas, las muestras fueron disgregadas y pasadas por un tamiz de 0.6 mm de tamaño de poro con el

objetivo de reducir el tamaño de las partículas de suelo y de este modo aumentar la extracción de los analitos de la matriz. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su análisis.

Preparación de las muestras de suelos dopadas

Las muestras de suelo fueron cuidadosamente pesadas y colocadas en frascos de acero inoxidable. En estos frascos se realizó el dopaje de las muestras mediante la adición del volumen adecuado de la disolución metanólica de LAS a 5 g de suelo. Un volumen adicional de metanol fue añadido hasta cubrir completamente las partículas del suelo. Esta suspensión fue agitada durante 1 minuto mediante un agitador mecánico para proporcionar una adecuada distribución del analito en el suelo. La cantidad de disolvente empleada fue lentamente evaporada a temperatura ambiente durante 15-17 horas.

Procedimiento de Extracción de LAS por ultrasonido

Cada extracción fue realizada usando dos cápsulas metálicas de extracción (frascos de acero inoxidable). En cada cápsula se introdujeron 5 g de suelo y se añadieron 100 ml de metanol como agente extractante. Las cápsulas fueron distribuidas en el baño de manera que entre ellas quedase una distancia de 2 cm y de otros 2 cm entre ellas y la sonda ultrasónica, formando un triángulo equilátero. Posteriormente, las cápsulas fueron tapadas con una película de parafilm para evitar la posible alteración en sus volúmenes. La temperatura del baño se mantenía a 25°C durante todo el proceso. Seguidamente, las muestras fueron sonicadas durante 10 minutos para, posteriormente, ser centrifugadas durante 10 minutos a 4000 r.p.m. Una vez separadas las fases, al suelo residual se le adicionaron 30 ml de metanol con la finalidad de lavarlo. Seguidamente, las muestras se volvieron a centrifugar y finalmente, los extractos metabólicos fueron mezclados.

Procedimiento de Extracción en fase sólida (SPE)

Los extractos metabólicos fueron purificados por SPE en dos etapas, empleando para esto el uso consecutivo de dos tipos de cartuchos distintos: SAX – adsorbente de intercambio aniónico de amina cuaternaria y C₁₈ – adsorbente de fase inversa de octadecilsilano. Ambos cartuchos están compuestos de 500 mg de fase sólida. En la primera etapa, los cartuchos de SAX fueron previamente activados pasando n-hexano (3 ml) y acondicionados con metanol (5 ml). El extracto metabólico (aproximadamente unos 130 ml) se pasó a través del cartucho con un flujo de 2-3 ml/min. La limpieza del cartucho fue realizada usando metanol (5 ml) y los analitos fueron seguidamente eluidos con 2 ml de una disolución hidrometanólica de HCl de concentración 4 M preparada respetando la porción metanol/agua (3:2) y transferidos a un matraz volumétrico con capacidad de 10 ml. Inmediatamente, el eluato fue neutralizado con una disolución acuosa de NaOH de 4 M de concentración utilizando fenolftaleína como indicador y finalmente, fue añadida agua Milli Q hasta completar el matraz. Estos 10 ml fueron pasados a través de un cartucho C₁₈ realizándose así la segunda etapa de purificación. Inicialmente, este cartucho fue activado con metanol (5ml) seguido de una fase de acondicionamiento con agua (5ml). Posteriormente se llevó a cabo la carga con los 10 ml obtenidos, que fueron pasados a través del cartucho con un flujo de 2-3 ml/min. La limpieza fue realizada usando una disolución hidrometanólica (proporción metanol/agua 35:65) y la elusión con metanol (3 ml), siendo el eluato recibido en un matraz volumétrico con capacidad de 5 ml. A este eluato metanólico le fue añadido 1 ml de una disolución acuosa de patrón interno (2ΦC₈-LAS) y enrasado con agua Milli Q, respetando en la disolución final, la proporción de metanol/agua (3:2).

Condiciones cromatográficas

Una alícuota (100µl) del eluato final fue inyectada en el cromatógrafo usando las condiciones experimentales e instrumentales siguientes:

- *Determinación de LAS total:* La cuantificación de LAS total fue realizada asumiendo que el valor encontrado para el LAS total era la suma de sus respectivos homólogos.

- *Determinación de Homólogos:* Una columna LiChrospher-100 RP-8 (125 mm x 4 mm de diámetro interno 5 µm de tamaño de partícula) y una precolumna LiChrospher-100 RP-8 (15 mm) fueron usadas para la separación analítica de los diferentes homólogos con una fase móvil empleando un gradiente de elusión compuesto de metanol (componente A) y una disolución acuosa de SDS a 30 mM (componente B). Los compuestos fueron separados utilizando la siguiente condición de elución: inicialmente, se partió de un 55 % de A y un 45 % de B, el porcentaje de A fue aumentando linealmente hasta un 70 % durante 15 minutos y seguidamente, disminuyó a un 55 % durante un minuto más. Finalmente, A se mantuvo al 55 % durante 5 minutos más con la finalidad de reacondicionar la columna volviendo a la situación inicial de separación. El tiempo total de la separación fue de 16 minutos con un tiempo de reacondicionamiento de 5 minutos más. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min. La columna estaba termostatzada a 40°C y las mediciones fluorimétricas fueron realizadas a 230 nm y 290 nm para la excitación y emisión, respectivamente, con una ganancia seleccionada a nivel 13. (Del Olmo *et al.*, 2004).

3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACERIANAS DE MUESTRAS DE SUELO ADICIONADAS DE LAS

3.2.1. Toma de muestras de suelo

La toma de muestras se llevó a cabo en una parcela de la Vega de Granada destinada para uso agrícola, que no había estado en contacto anteriormente con Sulfonatos de Alquibenceno Lineales (LAS).

Se seleccionaron 5 puntos diferentes de la parcela para tener una muestra lo más homogénea posible. La toma de las muestras se realizó con una barrena a una profundidad aproximada de 10 cm de la superficie.

Las muestras se introdujeron en botes de plástico estériles y fueron llevadas al laboratorio para proceder a su tratamiento.

En la Figura 3.4. se muestra la parcela perteneciente a la Vega de Granada donde se llevó a cabo la toma de muestras.



Fig 3.4. Fotografía de la parcela en la que se tomaron las muestras de suelo

3.2.2. Tratamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio, las muestras se dejaron secar durante 48 horas a temperatura ambiente, tamizándose posteriormente mediante un tamiz con un tamaño de malla de 1mm de diámetro. Una vez tamizadas, las 5 muestras se mezclaron en iguales proporciones para obtener una óptima homogeneización.

3.2.3. Ensayos de enriquecimiento realizados a las muestras de suelo

Se realizaron dos ensayos de enriquecimiento con diferentes concentraciones de *LAS*, uno con 10 mg/l y otro con 500 mg/l. Se usó medio BH (Bushell-Hass) (Toledo *et al.*, 2006) y adicionado de *LAS*.

En el primer ensayo de enriquecimiento, se optó por utilizar una concentración de *LAS* de 10 mg/l con el fin de poder aislar microorganismos capaces de crecer en presencia de

este tensioactivo. El segundo ensayo de enriquecimiento fue diseñado con el fin de enriquecer las muestras del suelo en aquellos microorganismos que fuesen capaces de crecer a altas concentraciones de LAS. Por éste motivo se usó una concentración de LAS de 500 mg/l.

Composición en g/l del medio BH

- Sulfato de magnesio: 0.2
- Cloruro cálcico: 0.02
- Fosfato monopotásico: 1
- Fosfato dipotásico: 1
- Nitrato amónico: 1
- Cloruro férrico: 0.05
- Agua destilada: 1000 ml
- pH 7.0

La cantidad de calcio y magnesio que se añadió fue el 50% de la concentración usada en el medio BH, para evitar así una posible precipitación del LAS con estos elementos.

Composición del LAS utilizado

El LAS utilizado fue suministrado por la casa comercial PETRESA, presentando un 31% de materia activa con la siguiente composición: Parafinas (0.10 %), 5 Fenil C10 (0.8%), Fenil C10 (9.8%), Fenil C11 (33.9%), Fenil C12 (32.5%), Fenil C13 (22.6%), Fenil C14 (0.3%), Tetra/Ind (0.10%). El resto del porcentaje es agua.

Metodología

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad a los que se le adicionaron 50 ml de medio BH, 10 ó 500 mg/l de LAS según el ensayo del que se tratase y 1g de suelo. Los matraces se incubaron a 30°C, en agitación continua de 100 r.p.m. durante 72 horas.

Transcurrido este tiempo, sirvieron de preinóculos ya que se tomaron 5 ml de estos matraces para inocular a otros matraces que contenían 50 ml de medio BH adicionado de 10 ó 500 mg/l de LAS, incubándose en iguales condiciones que los anteriores durante un tiempo de 48 horas. Esta operación se repitió una vez más. Estos últimos matraces se dejaron durante 24 horas en las mismas condiciones antes mencionadas y transcurridas las cuales se procedió al aislamiento de las cepas. En la Figura 3.5. se muestra un esquema de los ensayos de enriquecimiento realizados.

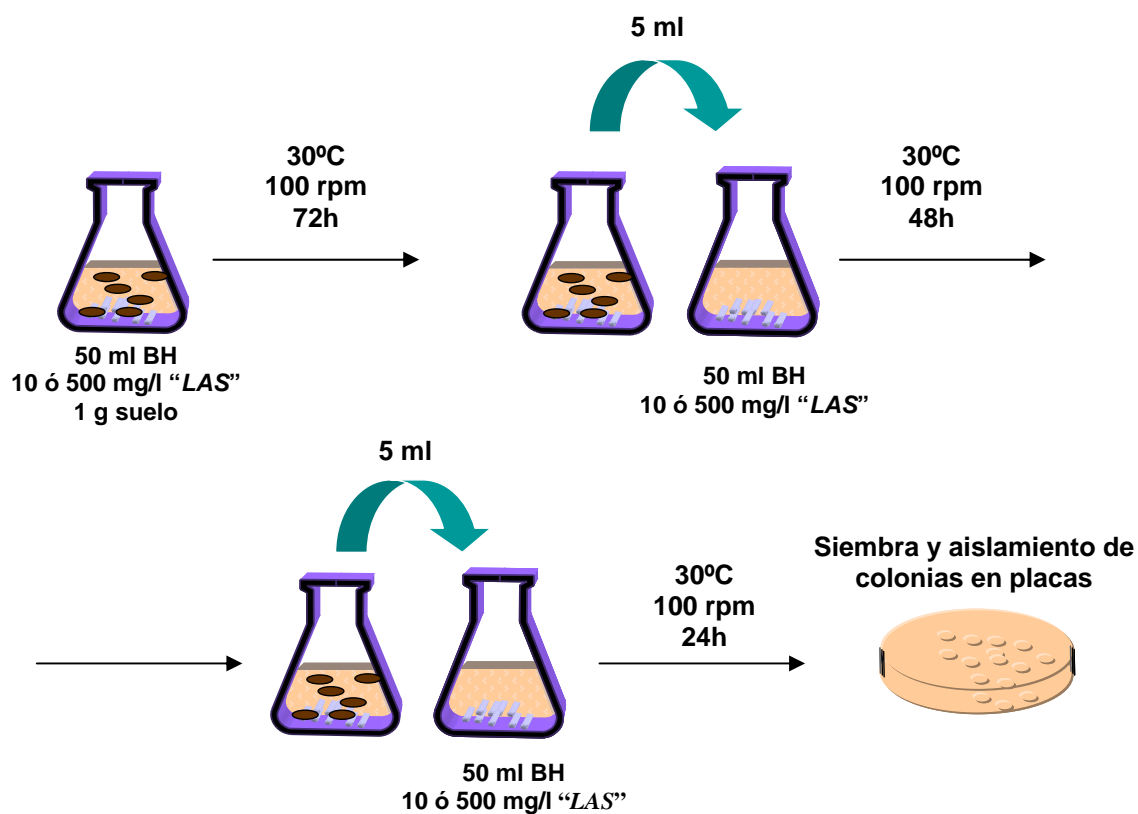


Fig 3.5. Esquema del ensayo de enriquecimiento

3.2.4. Aislamiento de cepas

3.2.4.1. Aislamiento de las cepas obtenidas en el ensayo de enriquecimiento con 10 mg/l de LAS

Tras finalizar la fase de enriquecimiento, se procedió a la siembra de alícuotas (0.1 ml), mediante espátula de vidrio, de diferentes diluciones seriadas en placas que contenían medio TSA diluido al 10% (Avidano *et al.*, 2005).

Las placas sembradas se incubaron durante 48 horas a 30°C. Transcurrido dicho periodo de tiempo, las placas se inspeccionaron para detectar colonias bien diferenciadas. Cada tipo colonial se aisló en placas con medio TSA diluido al 10% y posteriormente se resembraron en tubos de TSA de Agar inclinado para su conservación.

3.2.4.2. Aislamiento de las cepas obtenidas en el ensayo de enriquecimiento con 500 mg/l de LAS

Transcurrido el periodo de enriquecimiento se procedió al aislamiento de colonias en placas de medio TSA diluido al 10% utilizando la metodología descrita en el apartado anterior.

Cada tipo colonial seleccionado se resembró en placas que contenían medio TSA diluido al 10% y posteriormente se sembraron en tubos de TSA (Agar inclinado) para su conservación.

3.2.5. Pruebas identificativas realizadas a las cepas

Estas pruebas se realizaron a las cepas aisladas del ensayo de enriquecimiento de 500 mg/l de LAS.

3.2.5.1. Pruebas morfológicas

Las pruebas morfológicas realizadas fueron la **tinción de Gram** y la **movilidad**. En este último caso se utilizó el método de la gota pendiente en cultivos jóvenes (18h).

3.2.5.2. Pruebas fisiológicas

3.2.5.2.1 Crecimiento aeróbico - anaeróbico

Preparación del medio

El medio utilizado es un Agar semisólido, constituido por TSB (Trypticase Soja Broth, Difco®) adicionado de un 0.3 % de Agar.

Metodología

Repartir el medio en tubos y esterilizarlos en autoclave 30 minutos a 112°C. Una vez sacados los tubos del autoclave se dejan enfriar y posteriormente se procede a regenerar el tubo. Para ello se ponen a hervir los tubos que contienen el medio de agar semisólido dentro de un vaso de precipitados con agua. Una vez que comienza a hervir se sacan los tubos del vaso y se introducen en agua fría para que se solidifiquen rápidamente antes de que vuelva a disolverse el oxígeno.

Una vez que los tubos han solidificado, con el hilo de platino estéril se siembra en picadura cada una de las cepas a ensayar. Seguidamente se le añade una capa de parafina previamente esterilizada en tubos de 15 ml en el horno Pasteur a 110°C durante 24 horas. La parafina se añade para mantener la anaerobiosis en el interior del tubo durante las 24 horas incubación a una temperatura de 30°C. Transcurrido este tiempo se procede a la observación del crecimiento.

3.2.5.3. Pruebas bioquímicas

3.2.5.3.1. Catalasa

La determinación de la actividad catalasa, se determina sumergiendo la punta de un asa con una pequeña cantidad de cultivo bacteriano (obtenido en medio sólido, de 24 ó 48 horas de edad) en una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 %. Si aparecen burbujas sobre la mezcla indica que se está liberando O₂, y por tanto la presencia de catalasa.

3.2.5.3.2. Citocromo oxidasa

Para la presencia de la enzima citocromo oxidasa, responsables de los procesos oxidativos de las bacterias, se siguió el método descrito por Kovacs (1956).

Esta prueba y consiste en tomar en la punta de un asa una pequeña cantidad de cultivo bacteriano de 24 – 48 horas de y transferirlo a un trozo de papel de filtro previamente embebido en N-dimetil *p*-fenilendiamina. Si contiene ésta enzima, es rápidamente transformada (en unos 30 segundos) a un producto oxidado de color púrpura.

3.2.5.3.3. Prueba de desnitrificación

Ésta prueba se realiza con el fin de determinar si la bacteria es capaz de reducir los nitratos hasta nitrógeno gas. Para ello se utiliza el medio para desnitrificantes.

Preparación del medio desnitrificante (g):

- NaNO₃: 2
- K₂HPO₄: 1
- MgSO₄· 7H₂O: 0.5
- KCl : 0.5
- FeSO₄· 7H₂O: 0.01

- Extracto de levadura: 1
- Sacarosa: 30
- Agar : 6.0
- Agua destilada: 1000 ml
- PH: 7.2

Metodología

Repartir el medio en tubos. Esterilizar en el autoclave 30 minutos a 112°C. Una vez sacados los tubos del autoclave se dejan enfriar y posteriormente se procede a regenerar el tubo. Para ello se ponen a hervir los tubos que contienen el medio desnitrificante dentro de un vaso de precipitados con agua. Una vez que comienza a hervir se sacan los tubos del vaso y se introducen en agua fría para que se solidifiquen rápidamente antes de que vuelva a disolverse el oxígeno.

Una vez que los tubos han solidificado, con el hilo de platino estéril se siembra en picadura cada una de las cepas a ensayar. Seguidamente se le añade una capa de parafina previamente esterilizada en tubos de 15 ml en el horno Pasteur a 110°C durante 24 horas. La parafina se añade para mantener la anaerobiosis en el interior del tubo durante las 24 horas incubación a una temperatura de 30°C.

Pasado éste tiempo, se comprueba si el medio está roto o no. Si el medio aparece roto se debe a que se ha producido la reducción hasta las formas gaseosas NO, N₂O o N₂, y las burbujas que forman éste hacen que el medio se rompa cuando se libera el gas.

3.2.5.3.4. API 20 E

El API 20 E es un sistema para la identificación de las Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos y no exigentes, mediante la utilización de 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados. La galería API 20 E consta de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los tests se inoculan con una suspensión bacteriana que

rehidrata los medios.

La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación mediante la tabla de identificación API 20 E Index o el programa informático para identificación.

1. Material

- Medio de suspensión, 5 ml
- Caja de reactivos o reactivos individuales
- Reactivo Zn
- Aceite de parafina
- Pipetas Pasteur estériles
- API 20 E o programa informático para identificación
- Estufa a 35-37°C
- Nevera
- Mechero Bunsen

2. Composición de los medios y reactivos

- Medio de suspensión: agua desmineralizada
- Reactivo para la determinación de la triptófano desaminasa
- Percloruro férrico: 3.4 g
- Agua desmineralizada: 100 ml
- Reactivo para la determinación del indol
- Paradimetilaminobenzaldehído: 5 g
- Alcohol isoamílico: 75 ml
- HCl 37%: 25 ml
- Reactivos de Voges Proskauer para la detección de acetoina:

1)

- Hidróxido potásico: 40 g
- Agua desmineralizada: 100 ml

2)

- α Naftol: 6 g
- Etanol: 100 ml

- Reactivo de Griess para los nitratos:

1)

- Ácido sulfanílico: 0.8 g
- Ácido acético 5N: 100 ml

2)

- N-N-dimetil--naftilamina: 0.6 g
- Ácido acético 5N: 100 ml

- OX para detectar oxidasa
- Tetradimetil-p-fenilendiamina: 1g
- Alcohol isoamílico: 100 ml

3. Preparación de la galería

Preparar una cámara de incubación con su tapa correspondiente y repartir 5ml de agua en los alveolos para proporcionar una atmósfera húmeda.

4. Preparación del inóculo

Con un asa flameada se recoge el microorganismo de una placa incubada durante 24 horas. Se resuspende en un tubo de solución salina estéril de 5 ml y se agita.

5. Inoculación de la galería

- Llenar el tubo y la cúpula de los tests CIT, VP y GEL, con la suspensión del inóculo anterior.

- Llenar los tubos pero no la cúpula de los demás tests.

- Llenar la cúpula de los tests ADH, LDC, ODC, URE, H₂S con aceite de parafina para obtener anaerobiosis. Cerrar la cámara de incubación e incubar a 35 - 37°C, durante 18 - 24 horas.

3.2.6. Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S mediante PCR, a partir de lisados celulares de las cepas aisladas en los ensayos de enriquecimiento

La amplificación del ADN se puede llevar a cabo a partir de ADN o de un lisado celular. En este caso, se realizó a partir de un lisado celular (Pozo *et al.*, 2002).

Metodología

- Recoger células de un cultivo puro en placa (una colonia, por ejemplo), con un palillo de dientes estéril y resuspenderlas en 20 µl de una solución de lisis (NaOH 0.05 M + SDS 0.25%) en un tubo eppendorf. Para que la resuspensión sea buena, agitar en vórtex.

- Hervir las células en un baño de agua a punto de ebullición durante 15 minutos.

- Adicionar 200 µl de agua bidestilada estéril (calidad MilliQ).

- Centrifugar a máxima velocidad (12000 g en una centrifuga Minispin plus Eppendorf®) durante 5 minutos.

- Tomar de 4 a 8 µl de lisado para la amplificación.

Para la amplificación de regiones hipervariables del ARNr 16S, se ha empleado la pareja de cebadores fD1, rD1 (ver Tabla 3.3), descritos previamente como adecuados para amplificación de casi la totalidad de la longitud este gen en la mayoría de las Eubacterias

(Weisburg *et al.*, 1991). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosis. Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen (aproximadamente 1.5-1.6Kb). En la Figura 3.6. se muestran dos modelos de estructura secundaria del ARNr 16S procariótico.

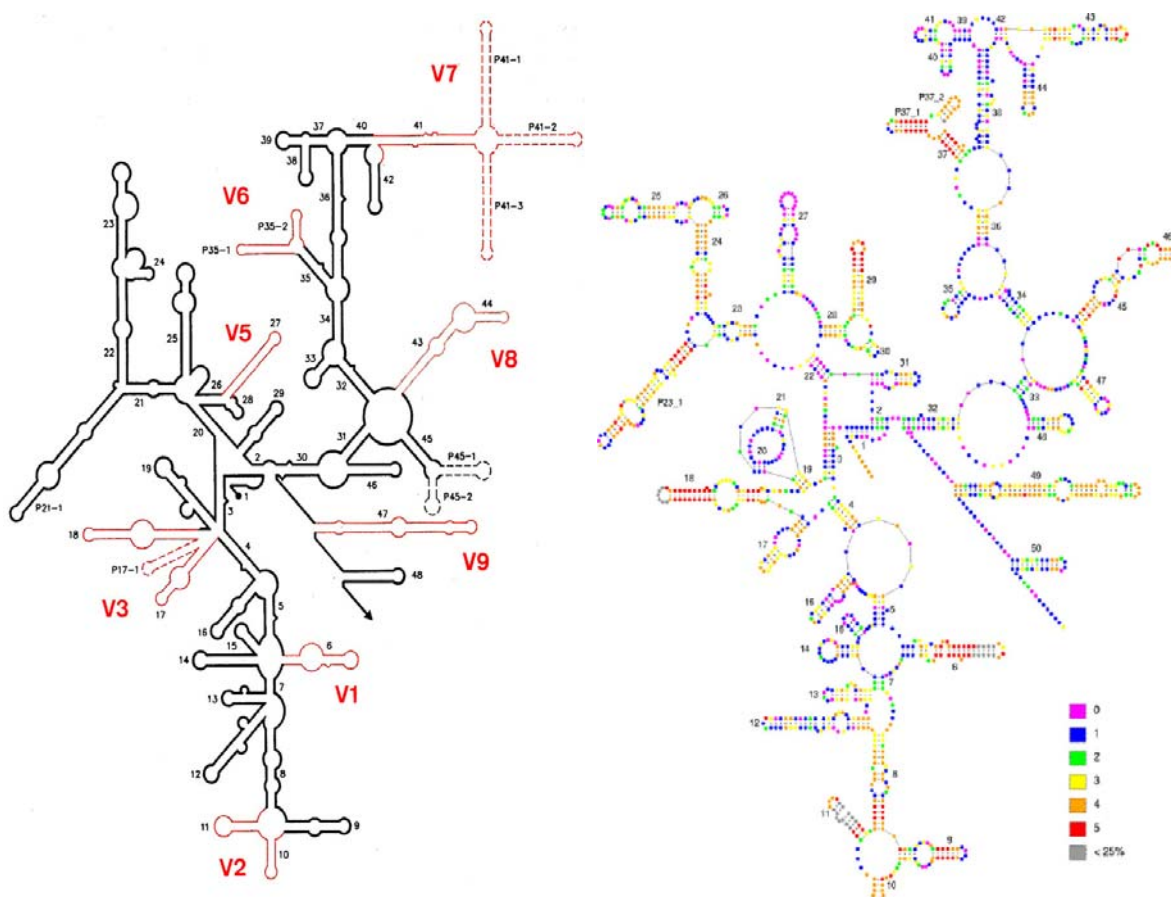


Fig 3.6. Modelos de la estructura secundaria del ARNr 16S procariótico. La figura de la izquierda está tomada de Neefs *et al.* (1990). Las regiones hipervariables están resaltadas en rojo y numeradas de la V1 a la V9. La figura de la derecha corresponde a la estructura actualizada, tomada de la *Base de Datos Europea del ARN* (<http://rna.uia.ac.be/ssu/>, Wuyts *et al.*, 2002), que utiliza como base para el alineamiento la secuencia correspondiente a *Escherichia coli*. La escala de colores del 1 al 5 representa un grado creciente de variabilidad de la secuencia consenso para cada una de las bases, siendo las bases representadas en color púrpura posiciones universalmente conservadas, y las bases representadas en color gris las menos conservadas (menos del 25% de las secuencias existentes en la base de datos en 2002). Se puede observar la abundancia de bases poco conservadas en las zonas correspondientes a las regiones hipervariables.

Tabla 3.3. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR

CEBADOR	SECUENCIA (DE 5' A 3')
fD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron los descritos por Vinuesa *et al.* (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos siguientes:

- PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems): 5 μ l
- $MgCl_2$ 25 mM (Applied Biosystems): 3 μ l
- Mezcla de desoxiribonucleótidos-trifosfato: 1 μ l
- Cebador fD1: 0.2 μ l
- Cebador rD1: 0.2 μ l.
- Ampli Taq Gold polimerasa: 0.2 μ l
- Dimetil sulfóxido (DMS): 2.5 μ l
- Seroalbúmina bovina: 1 μ l
- Lisado celular: 4 a 8 μ l
- Agua bidestilada estéril (calidad MilliQ) hasta un volumen de 50 μ l

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 3 minutos 30 segundos.
2. 35 ciclos que constan de:
 - 2.1. Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto 10 segundos.
 - 2.2. Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, *Annealing*: 56°C durante 40 segundos.

2.3. Extensión: 72°C durante 2 minutos.

3. Extensión final: 72°C durante 6 minutos 10 segundos.

4. Mantenimiento a 4°C.

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 2 μ l que se examinaron en gel de agarosa para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado.

3.2.6.1. Separación del ADN de las muestras mediante electroforesis

Para la electroforesis se empleó buffer TAE (1X). La separación de los distintos fragmentos se realizó mediante gel de agarosa al 0.8% preparado en 50 ml de buffer TAE. A los 50 μ l de muestra procedente de la PCR le añadimos 5 μ l de tampón de carga. El tampón de carga contiene la siguiente composición: TAE (6x), Azul de Bromofenol al 0.25% y Glicerol al 30%. Las condiciones de la electroforesis fueron en un voltaje constante de 80 V y durante 25 minutos.

Tras la electroforesis, los geles se sumergieron en bromuro de etidio (2 μ g/ml) para teñir el ADN. Transcurridos 15 minutos, se visualizaron los perfiles de bandas con luz ultravioleta empleando el sistema de documentación de geles GelDoc-2000 (BioRad).

Las bandas individuales visualizadas, se escindieron de los geles en su parte central con una espátula estéril, y el fragmento así extraído se introdujo en tubos eppendorf estériles.

3.2.6.2. Extracción del ADN del gel de agarosa

La extracción del ADN se realizó mediante el kit de extracción Quiaex II (QUIAGEN). El procedimiento a seguir fué el siguiente:

- Pesar las muestras (que contienen ADN y gel).
- Añadir 3 volúmenes de QXI (Yoduro sódico 6M, capaz de desestabilizar la estructura del gel de agarosa a bajas temperaturas).
- Añadir 10 μ l de QUIAEX II. Mezclar y mezclar agitando en un vortex. Previamente el Quiaex II también debe ser agitado en un vortex durante 30 segundos.
- Incubar a 50°C durante 10 minutos agitando brevemente cada 2 minutos.
- Centrifugar 30 segundos.
- Quitar el sobrenadante con una pipeta estéril.
- Lavar con 500 μ l de buffer QXI para eliminar los contaminantes residuales de agarosa. Mezclar en un vortex, centrifugar 30 segundos y eliminar el sobrenadante con una pipeta.
- Lavar 2 veces con 500 μ l con buffer PE para eliminar las sales residuales. Mezclar en un vortex, centrifugar 30 segundos y eliminar el sobrenadante con una pipeta.
- Dejar secar el pellet colocando los tubos en posición invertida durante 10 o 15 minutos hasta que presente un color blanco.
- Eluir el ADN con 20 μ l de agua filtrada y esterilizada en autoclave. Mezclar en un vortex e incubar a temperatura ambiente 5 minutos, después separar el ADN suspendido en el agua mediante centrifugación 1 minuto a 12.000 g. El ADN se conserva a -20°C.

Para comprobar la eficiencia de la extracción anterior, una alícuota del producto final fue sometida a una nueva electroforesis.

El fragmento de ADN correspondiente al gen codificante del ARN ribosómico 16S fue secuenciado parcialmente empleando 3 oligonucleótidos: fD1, fD2 (5' 3') y rD2 (5' 3') (ver Tabla 3.4). Estos tres oligonucleótidos permiten obtener un fragmento secuenciado de aproximadamente 650-700 nucleótidos, que abarca las regiones hipervariables V1, V2 y V3 (Neefs *et al.*, 1990). En tres tubos eppendorf (uno para cada uno de los oligonucleótidos) se preparó una solución con 1 μ l de ADN, 0,62 μ l del oligonucleótido correspondiente en cada caso, y 6,38 μ l de agua para PCR (agua filtrada y esterilizada en autoclave).

Tabla 3.4. Secuencia de los cebadores empleados para la secuenciación

CEBADOR	SECUENCIA (DE 5' A 3')
fD2	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
rD2	GACTACCAGGGTATCTAATCC

La secuenciación de ADN fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López neyra (CSIC, Granada). Esta secuenciación automática se realizó en un secuenciador Applied Biosystems (“ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer”), utilizando el kit comercial “ABI PRISM Big Dye terminador Cycle Sequencing Ready Reaction” (PERKIN-ELMER). Se utilizaron aproximadamente 10 ng de ADN molde y 5 pmoles de oligonucleótido como cebador (rD1 o fD1) en cada reacción de secuenciación. Las muestras se amplificaron por PCR en un termociclador PE 9600 (Perkin-Elmer®) y se pasaron por columnas de Sephadex G-50 para eliminar el exceso de terminadores no incorporados.

Las secuencias obtenidas para cada uno de los dos cebadores se visualizaron con el software Chromas lite v. 2.0. y se editaron manualmente con el programa GeneRunner v. 3.0. con objeto de cribar los errores de la secuenciación automática. Una vez corregidas y ensambladas, las secuencias se enviaron para su comparación con las existentes en los bancos de datos, empleando el software BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) a través de servidor de Internet gratuito EMBL-FASTA del EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>). El programa *Clustal X* v. 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) fue utilizado para la generación de alineamientos de las secuencias, empleando los parámetros por defecto. Para el cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y generación de los árboles filogenéticos mediante el método Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987) se empleó el programa Mega v. 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Los árboles se calcularon tomando como criterio la no inclusión de los huecos (gaps) del alineamiento. Los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo por reemplazamiento (*Bootstrap*) (Felsenstein., 1985) y los porcentajes superiores al 50% aparecen reflejados en los árboles correspondientes.

3.2.7. Crecimiento de las cepas aisladas en medios de dializado de suelo

Se realizaron curvas de crecimiento para cada una de las cepas aisladas utilizando medio de dializado de suelo (ver Fig.3.7). La utilización de este medio de cultivo se realizó con el objetivo de reproducir unas condiciones lo más parecidas posibles a las existentes en los suelos de forma natural ya que en dicho medio el aporte nutricional procede exclusivamente del suelo introducido en la membrana de diálisis. Las membranas actúan como un medio de difusión seleccionando los nutrientes esenciales de la fracción soluble del suelo. Se siguieron pautas similares en todas las curvas realizándose medidas sobre el crecimiento del microorganismo a estudiar. Las curvas se realizaron, para determinar el crecimiento de los microorganismos aislados de suelo agrícola (ensayos de enriquecimiento adionados con 10 y 500 mg/l de LAS) en presencia o en ausencia de LAS. La concentración de LAS utilizada para la realización de estas curvas fue de 50 mg/l. El estudio del crecimiento se realizó desde las 0 horas hasta las 48 horas. El tiempo cero horas se realizó tras la inoculación de los matraces.

Preparación del inóculo

Se inocularon matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio TSB diluido (10%) y estéril, con las cepas obtenidas en los aislamientos anteriores, y se incubaron durante 48 horas en condiciones controladas de agitación y temperatura (100 r.p.m, 30°C). Transcurrido dicho periodo de tiempo se procedió a la inoculación (0.5 ml) de nuevos matraces en idénticas condiciones, siendo ahora el tiempo de incubación de 24 horas. Estos inóculos así preparados sirvieron para la construcción de las curvas de crecimiento.

Preparación del medio de dializado de suelo

A matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de agua destilada con una concentración de LAS de 50 mg/l se les adicionó una membrana de diálisis que contenía 10 gramos de suelo. Los medios de dializado de suelo, se esterilizaron en autoclave durante 30 minutos a 112°C y después se inocularon.

El recuento de los microorganismos viables se realizó mediante el método estándar de dilución en serie y recuento en placa (medio TSA diluido al 10%). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h.



Fig. 3.7. Fotografía del medio con membrana de diálisis

3.2.8. Determinación cuantitativa de LAS mediante HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido extensamente empleada en el análisis de LAS, utilizándose distintos sistemas de detección (Del Olmo *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2004).

Preconcentración de las muestras para la determinación de homólogos del LAS mediante HPLC

Este proceso se lleva a cabo utilizando una cámara de vacío que posee una serie de canales mediante los cuales se controla el flujo del proceso de extracción. Esta cámara se describe en la Figura 3.8.

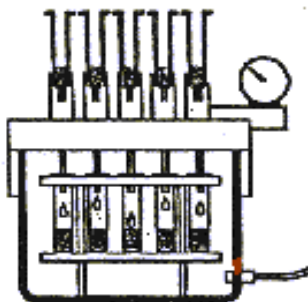


Fig. 3.8. Cámara de vacío múltiple utilizada en el proceso de extracción

Una alícuota (30 ml) se pasó a través de un cartucho de extracción en fase sólida C18, previamente acondicionado con 5 ml de metanol y a continuación con 5 ml de agua destilada, quedando retenidos los analitos por procesos de adsorción hidrofóbica. El cartucho se lavó con una mezcla hidroalcohólica (3 ml de metanol al 35%, agua 65%) que elimina los interferentes más polares sin arrastrar el *LAS*, el cual se eluye con 3 ml de metanol que se recoge en un matraz aforado de 5 ml. A continuación se añadió 1 ml de patrón interno (2ΦC8-*LAS*) enrasándose a 5 ml con agua destilada para que la composición de la fase líquida sea metanol:agua 3:2 v/v, asegurando de esta forma la mayor resolución de los picos en el proceso de separación cromatográfica.

Mediante esta etapa se eliminan los posibles interferentes que pueden acompañar al *LAS* en las muestras acuosas a las que se les va a aplicar el método, aquellas sustancias que posean un carácter más polar que el *LAS* no serán retenidas por el absorbente que contiene el cartucho de extracción en fase sólida, y aquellas que tengan una naturaleza más hidrofóbica quedaran retenidas en el cartucho después del proceso de elución. Además de eliminar los interferentes, esta etapa desempeña una función de preconcentración del analito.

Una alícuota de la disolución concentrada de *LAS* resultante se introduce en un vial de 2 ml de capacidad y se procede a su análisis cromatográfico.

Características del HPLC utilizado

Modelo: Hewlett Packard HP 1050

Columna: Lichrospher RP-C8

Fase móvil:

- Metanol HPLC
- Dodecyl sulfato sódico (SDS)

Gradiente : De 55% a 70% de metanol en 15 minutos

Flujo: 1ml /minuto

Temperatura: 40°C

Volumen: 50 ó 100 µl.

Detector de fluorescencia (HP 1049 A):

- $\lambda_{\text{excitación}}$: 230 nm
- $\lambda_{\text{emisión}}$: 290 nm
- Fotomultiplicador :6
- PMT Gam: 6
- Lámpara: 1.25 W/55 Hz

Interfase HP 35900

3.2.8.1. Biotransformación de LAS por la microbiota seleccionada

Antes de estudiar la posible biotransformación del *LAS* por las cepas bacterianas previamente seleccionadas, se determinó la posible degradación abiótica a lo largo de un determinado periodo de tiempo y bajo las condiciones de temperatura y agitación utilizadas en nuestras experiencias (30°C y 100 r.p.m.). Para ello matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de agua destilada y 50 mg/l de *LAS*, se esterilizaron en autoclave durante 30 minutos a 112°C. Posteriormente se mantuvieron en agitación a 100 r.p.m. y 30°C determinándose por HPLC la concentración de *LAS* tras 24, 48, 72 h y 10 días de incubación.

Los estudios de biotransformación del surfactante se realizaron en medio de dializado de suelo. Una vez seleccionados los microorganismos que mejor crecieron en medio de dializado de suelo en presencia de 50 mg/l de LAS, se propuso realizar una curva de crecimiento y establecer la concentración de LAS en el medio de cultivo. Se realizó una curva por cada microorganismo seleccionado. Para éste estudio se diseñaron cinco ensayos. Para cada medida se realizaron tres repeticiones.

En todos los casos las curvas se mantuvieron hasta los 10 días, realizándoles medidas a las 0, 24, 48, 72 horas y 10 días tanto del número de microorganismos presentes en dichos tiempos (expresado como log UFC/ml) como de la concentración residual de LAS en el sobrenadante del medio utilizado.

Para la determinación de la concentración residual de LAS mediante HPLC, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 r.p.m. y a 4°C, tras lo cual se empleó el sobrenadante para la cuantificación.

Realización de ensayos

Los estudios en medios de dializado de suelo, incluyeron cinco modelos experimentales:

1. Membrana de diálisis con 10 gramos de suelo y 50 ml de agua destilada. Éste primer ensayo se realizó para determinar la posible presencia de LAS en el suelo ensayado.

2. Membrana de diálisis con 10 gramos de suelo, 50 ml de agua y 50 mg/l de LAS. Éste ensayo se realizó para establecer la posible degradación abiótica del surfactante.

3. Membrana de diálisis con 10 gramos de suelo, 50 ml de agua y 1ml de inóculo del microorganismo. El objetivo era realizar una curva de crecimiento del microorganismo utilizando los nutrientes aportados exclusivamente por los 10 g de suelo contenidos en la membrana de diálisis.

4. Membrana de diálisis con 10 gramos de suelo, 50 ml de agua, 50 mg/l de *LAS* y 1 ml de inóculo del microorganismo. El objetivo era establecer el crecimiento del microorganismo en presencia de *LAS* y determinar la concentración de *LAS* residual en el sobrenadante.

5. Membrana de diálisis con 10 gramos de suelo, 50 ml de agua, 50 mg /l de *LAS* y 1ml de inóculo muerto por calor. Tras la inoculación se procedió a esterilizar los matraces en el autoclave con la finalidad de determinar la concentración de *LAS* que había en el sobrenadante y establecer si podría existir adsorción de *LAS* a los microorganismos muertos.

En los tres últimos ensayos el inóculo se preparó a partir de matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio TSB diluido al 1/10 y estéril, que se inocularon con microorganismos seleccionados y se incubaron a 30°C en agitación continua a 100 r.p.m. durante 48 horas. A partir de éste preinóculo se inoculó un segundo matraz de idénticas características con 0.5 ml del primero, dejándolo en incubación durante 24 horas a 30°C en agitación continua de 100 r.p.m. sirviendo de inoculante para establecer las curvas. En los tres ensayos los matraces se adicionaron de 1 ml de inóculo.

El recuento de los microorganismos viables se realizó mediante el método estándar de dilución en serie y recuento en placa (TSA 10%). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h.

En todos los ensayos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml y se esterilizaron en autoclave durante 30 minutos a 112°C. Posteriormente los matraces se incubaron a 30°C con agitación continua de 100 r.p.m. hasta la realización de las medidas.

3.2.9. Determinación de nitrógeno total y fosfatos en los medios de dializado de suelo

Al objeto de evaluar el efecto del surfactante sobre la evolución del nitrógeno y el fósforo (como fosfatos) en los medios de dializado de suelo, se realizó un ensayo con matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad a los que se les añadió 50 ml de agua destilada y una membrana de diálisis con 10 g de suelo, así como 50 mg/l de LAS. La evolución de los nutrientes bajo estas condiciones se comparó con la evolución de los mismos en muestras sin adicionar LAS.

Todos los matraces se esterilizaron en el autoclave durante 30 minutos a 112°C. Después se incubaron a 30°C en un agitador orbital con agitación continua de 100 r.p.m. hasta la realización de las medidas, que se hicieron tras 0, 24, 48 y 72 horas.

3.2.9.1. Determinación de nitrógeno total (Nt)

Los compuestos disueltos de nitrógeno incluyen amonio, nitrito, nitrato, nitrógeno molecular disuelto y una gran variedad de compuestos orgánicos (aminoácidos, proteínas, nucleótidos, compuestos húmicos refractarios con bajo contenido en nitrógeno, etc.). El cálculo del valor del nitrógeno total puede obtenerse tras conocer el valor de nitrógeno orgánico, amoniacal, de nitrato y nitrito presente en una muestra de agua y sumar sus cantidades. La determinación de nitrógeno total pretende simplificar todas las determinaciones anteriores en una sola analítica, para lo cual debemos transformar los diferentes compuestos de nitrógeno en uno sólo. La forma más sencilla es mediante una oxidación que los transforme todos en nitrato, realizando una determinación final del N-NO_3^- . El proceso consiste en una determinación del nitrato de una muestra tras una oxidación previa de la muestra con persulfato y ácido bórico que oxida todas las formas de nitrógeno hasta nitrato. La metodología utilizada para la determinación del Nt es la descrita en APHA (2001).

1. Reactivos para la determinación del Nt

- Mezcla oxidante:

A 500ml de agua destilada en agitación se le añadieron 50g de persulfato potásico (calidad p.a. Merck®), 30g de ácido bórico y 14g de hidróxido sódico. Se agitó hasta disolución y a continuación se enrasó hasta 1000ml con agua destilada. Esta solución se conserva a temperatura ambiente y en oscuridad.

- Ácido sulfúrico concentrado (98%).

2. Procedimiento

50 ml de la muestra a analizar se colocaron en un frasco de autoclavado de 100 ml. Se añadió 7ml de la solución oxidante y se agitó. Se autoclavó la muestra durante 30 minutos (121°C a 1 atm). Una vez que se hubo enfriado, se le adicionaron 0.85 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agitaron y se determinó la concentración de nitrato mediante espectrofotometría ($\lambda = 220$).

3. Preparación de la curva de calibrado

Se preparó una solución madre de 100 mg/l de nitrógeno utilizando NaNO_3 como reactivo. La recta se hizo con valores desde 1 a 10 mg/l (1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/l) de solución madre en un volumen final de 50 ml (enrasar con agua bidestilada hasta 50 ml).

3.2.9.2. Determinación de fosfatos

La única forma mineral en que se presenta el fósforo es el ión fosfato, cuya concentración en el agua guarda relación con la posible actividad biológica de ésta. El fosfato en solución diluida reacciona con molibdato amónico en medio ácido para dar ácido fosfomolibdico que, a su vez se reduce, con ácido ascórbico a azul de molibdeno, cuya

intensidad de color es medida por espectrofotometría. El tartrato de antimonio y potasio se añade para acomplejar a otros posibles aniones presentes, tales como SiO_3 que pueden interferir en la reacción, así como para fijar el color azul. El método usado en la determinación de fosfatos es el descrito por Rodier, (1989).

1. Reactivos

- Molibdato amónico: Disolver 15 g de $\text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada y guardar en botella de plástico.
- Ácido sulfúrico: Disolver 140 ml de ácido sulfúrico concentrado en 900 ml de agua destilada.
- Ácido ascórbico: Disolver 27 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ en 700 ml de agua destilada. Éste reactivo requiere una preparación extemporánea.
- Tartrato de antimonio y potasio: Disolver 0.34 g de $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6 \text{ SbK}$ en 250 ml de agua destilada.

Con éstos reactivos se forma un **Reactivo especial mixto** (de obligada preparación extemporánea):

- 20 ml de molibdato amónico.
- 50 ml de ácido sulfúrico.
- 20 ml de ácido ascórbico.
- 10 ml de tartrato.

Estos volúmenes valen para 10 mediciones de fósforo. Para un resultado satisfactorio es preciso agitar bien el reactivo especial mixto.

2. Procedimiento

A 25 ml de muestra se le añaden 10 ml de reactivo especial mixto. Se mantiene a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos y se mide en el espectrofotómetro a 882 nm.

4. Preparación de la curva de calibrado

Se preparó una solución madre, pesando 0.816 g de H_2PO_4K y aforando con agua destilada a 1000 ml. Se toman 10 ml de ésta disolución y se enrasa con agua destilada a 1000 ml. Con esta solución se prepararon los diferentes puntos de la recta: 5, 10, 20, 40, 80, 100 200 y 400 $\mu g/l$ (ó ppb).

3.3. ESTUDIOS DE BIOTRANSFORMACIÓN E IMPACTO DEL LAS MEDIANTE EL EMPLEO DE MICROCOSMOS EDÁFICOS

3.3.1. Diseño y construcción de microcosmos edáficos

Con el objetivo de analizar los posibles procesos de biotransformación del *LAS* en el suelo así como el potencial impacto del surfactante sobre la microbiota edáfica, se procedió al diseño y a la construcción de columnas experimentales (microcosmos edáficos) que contenían muestras de suelo procedentes de una parcela también localizada en la Vega de Granada. Las muestras de de suelo fueron recogidas de una parcela experimental en barbecho que no había estado en contacto con *LAS* en los últimos cinco años. Para alcanzar el diseño final de los microcosmos que a continuación se describen, se llevaron a cabo previamente varios ensayos preliminares con columnas de diferentes dimensiones.

El material elegido para la elaboración de las columnas fue el vidrio, puesto que el *LAS* no sufre procesos de adsorción sobre su superficie, hecho que sí sucede sobre algunos materiales plásticos. Además, las gomas utilizadas tanto para la entrada del influente en las columnas como para la salida del efluente eran de polietileno, material sobre el que tampoco se produce la adsorción del *LAS*.

Con el propósito de evitar pérdidas de material edáfico y de garantizar la ausencia de sólidos en suspensión en el líquido efluente, se dotó a cada una de las columnas experimentales de una placa porosa de vidrio en su extremo inferior, que permite el paso del

agua pero no del material particulado.

Además, en el caso concreto de las columnas que contenían suelo esterilizado (microcosmos esterilizado), la columna estaba provista de un cierre hermético que evitaba el contacto de la muestra de suelo con el aire. La circulación del aire en el interior de esta columna quedaba garantizada mediante una perforación en dicho cierre que permitía el paso de aire ultrafiltrado (filtro de acetato de celulosa de tamaño de poro de $0.22\ \mu\text{m}$). Otro orificio en el cierre permitía la inserción del tubo de entrada de influente en la columna.

En todos los casos, se utilizó una bomba peristáltica (Watson Marlon 505S) para conducir el influente contenido en botellas de vidrio esterilizadas hasta cada una de las columnas experimentales.

El efluente procedente de la salida de las columnas era recogido en botellas de vidrio, que previamente habían sido esterilizadas en el caso del microcosmos esterilizado. En la Figura 3.9. se puede observar el diseño y montaje de las columnas ensayadas.

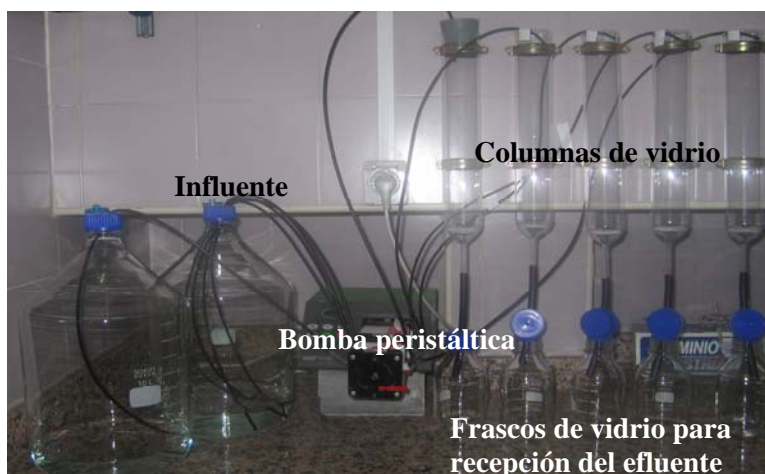


Fig 3.9. Diseño y construcción de los microcosmos edáficos

A continuación se detallan las principales características físicas de las columnas experimentales utilizadas:

- Altura de la columna: 35 cm
- Diámetro de la columna: 6 cm
- Diámetro de la goma de polietileno de salida del efluente: 10 mm
- Placa porosa de vidrio en la parte inferior de la columna

Previamente a ser introducidas en las columnas de vidrio, las muestras de suelo procedentes de la parcela experimental se dejaron secar a temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, se sometieron a un proceso de homogenización y se eliminaron manualmente las gravas de mayor tamaño y los restos vegetales. Las muestras de suelo no fueron tamizadas, con el fin de evitar un tamaño de grano excesivamente pequeño y, como consecuencia, un posterior encharcamiento de los microcosmos edáficos. Cada columna contenía aproximadamente 0.8 kg de tierra.

3.3.2. Características edafológicas de las muestra de suelo contenidas en los microcosmos

Con el objetivo de poder caracterizar las muestras de suelo recolectadas en la parcela, una parte de estas fue analizada por el laboratorio agroalimentario de Atarfe, Granada (Consejería de agricultura y pesca, Junta de Andalucía) para determinar los principales parámetros edafológicos. En la Tabla 3.7. se detallan las principales características edafológicas de las muestras de suelo recolectadas en la parcela experimental y utilizadas en la construcción de las distintas columnas experimentales (microcosmos edáficos experimentales).

Tabla 3.7. Características edafológicas de las muestras de suelo

DETERMINACIÓN	RESULTADO
Clasificación del suelo	fr-li (franco-limoso)
% Textura arcilla	14.02
% Textura arena	20.10
% Textura limo	65.88
% Caliza activa	3.9
% Carbonatos	10.8
% Materia orgánica oxidable	1.39
% Nitrógeno total	0.139
Fósforo asimilable (mg/kg)	25
Potasio asimilable (mg/kg)	240
Prueba previa salinidad (mmhos/cm)	0.43
pH	7.8

3.3.3. Microcosmos experimentales

En primer lugar, se diseñaron tres tipos de microcosmos edáficos para la determinación y cuantificación de la biotransformación del *LAS* en el suelo, así como de los posibles cambios inducidos sobre su biodiversidad microbiana (Fig. 3.10).

- A. Microcosmos esterilizado (autoclavado), a través del cual se hizo pasar agua adicionada de distintas concentraciones de *LAS*. Este tipo de microcosmos resulta esencial para la determinación de procesos físicos de adsorción del *LAS* al suelo.
- B. Microcosmos no esterilizado, a través del cual se hizo pasar agua adicionada de distintas concentraciones de *LAS* (10 y 50 mg/l). Este microcosmos permite estudiar la capacidad de biotransformación del *LAS* por parte de la microbiota presente en el suelo, así como el análisis de la microbiota cultivable, de las actividades enzimáticas, y de los perfiles de biodiversidad de grupos bacterianos

representativos en el suelo (Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Acidobacterias, Bacterias Gram positivas de alto G+C, y Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio), obtenidos mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

- C. Microcosmos no esterilizado, a través del cual se hizo pasar agua sin LAS (control). El estudio de la microbiota cultivable, actividades enzimáticas y los perfiles de biodiversidad de este microcosmos (igualmente determinados mediante TGGE) permite establecer análisis comparativos con los resultados obtenidos en el microcosmos B.



Fig 3.10. Fotografía que muestra los tres tipos de microcosmos ensayados una vez montados en laboratorio

A continuación se describen los distintos ensayos que se llevaron a cabo sobre los microcosmos experimentales A, B y C.

3.3.3.1. Ensayo 1. Determinación del tiempo necesario de tratamiento de los microcosmos edáficos para detectar LAS en el efluente

En una primera aproximación experimental, se utilizaron los tres tipos de microcosmos descritos (A, B y C) para la determinación del periodo de tiempo de funcionamiento necesario para detectar la presencia de LAS en el efluente de salida. La presencia de LAS en los efluentes de los microcosmos era determinada mediante HPLC. Por su parte, el microcosmos de tipo C se utilizó como tratamiento control, con el objetivo de comprobar la no presencia de LAS en las muestras de suelo de partida.

En la Figura 3.11. se muestra un cromatograma en el que se pueden observar representados los cuatro homólogos del LAS. El experimento completo se llevó a cabo bajo dos condiciones distintas. En la primera de ellas, la concentración de LAS en el agua influente era de 10 mg/l, mientras que en la segunda la concentración de LAS fue de 50 mg/l. Jensen (1999), puso de manifiesto efectos adversos del LAS sobre la microbiota del suelo en este rango de concentraciones. Además, las concentraciones contempladas en nuestro estudio corresponden con aquellas esperables en suelos agrícolas tras la aplicación de lodos (Elsgaard *et al.*, 2001a) y han sido previamente detectadas en suelos contaminados con LAS (Waters *et al.*, 1989; K uchler and Schnaak, 1997; De Wolfe and Feijtel, 1998; Jensen, 1999; Vinther *et al.*, 2003; Ying, 2006).

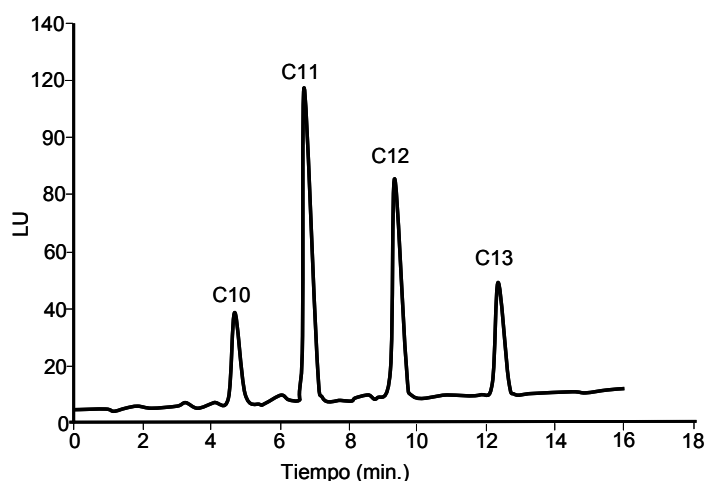


Fig 3.11. Ejemplo de cromatograma en el que se pueden observar los cuatro homólogos que integran la mezcla comercial de LAS

Con el objeto de impedir procesos de biotransformación del tensioactivo previos a su entrada en las columnas, el líquido influente era siempre esterilizado en autoclave (30 minutos a 112°C) antes de ser bombeado.

El caudal externo medio de entrada a los microcosmos era aproximadamente de 200 ml/día. Este caudal fue determinado tras varios ensayos experimentales y fue optimizado para que el influente circulase a través de los microcosmos y saliese por su parte inferior sin alcanzar el punto de saturación del suelo.

En el ensayo con 10 mg/l de LAS fueron necesarios 21 días de funcionamiento para comenzar a detectar presencia de LAS (homólogo C10) en el efluente de salida procedente del microcosmos esterilizado (A). Además, transcurrido dicho plazo no se detectó LAS en los efluentes de los microcosmos B Y C. En el caso del ensayo con 50 mg/l de LAS, transcurridos 7 días se detectó LAS (homólogo C10) por vez primera en el microcosmos autoclavado (A). Igualmente, no fue detectada su salida en los microcosmos B y C.

3.3.3.2. Ensayo 2. Cuantificación de LAS en las muestras de suelo de los distintos microcosmos y estudio de su microbiota cultivable, actividad enzimática y perfiles de biodiversidad

Se dispusieron tres réplicas de cada uno de los tipos de microcosmos (A, B y C) a través de las cuales se hizo pasar agua destilada (en el caso del tipo C) y con 10 mg/l de LAS disuelto en los tipos A y B. Sobre estos microcosmos se llevó a cabo un proceso de apertura secuencial en base a los periodos temporales establecidos en el ensayo 1. De esta manera, a los 7 días se procedió a la apertura y muestreo de una réplica de cada tipo de microcosmos, proceso que se repetía a los 14 y a los 21 días. Este experimento se llevó a cabo en idénticas condiciones utilizando concentraciones de 50 mg/l de LAS en agua. En este caso, se procedió a la apertura secuencial de microcosmos transcurridos 3 días de su puesta en funcionamiento, a los 7 días y, por último, a los 21 días. Previamente al inicio de los ensayos experimentales con 10 y 50 mg/l de LAS, se llevó a cabo el recuento de microorganismos cultivables, análisis de actividades enzimáticas y estudio de biodiversidad

del suelo experimental, una vez seco y antes de ser introducido en las columnas de vidrio. La información obtenida de estos análisis se consideró como el tiempo 0 (T0) de cada experimento.

Con el objetivo de determinar el posible efecto emulsionante del LAS, cada 72 horas aproximadamente se realizaron medidas de fosfatos sobre los efluentes de los microcosmos ensayados a lo largo de todo el experimento.

Una vez concluidos los ensayos experimentales en los microcosmos (ensayos 10 y 50 mg/l de LAS), se procedía a la ruptura de las columnas en condiciones asépticas (ver Fig. 3.12) y al estudio de la microbiota cultivable, actividades enzimáticas (fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, arilsulfatasa y deshidrogenasa) y perfiles de biodiversidad presentes en los distintos tipos de microcosmos ensayados (excepto en el microcosmo estéril A).



Fig 3.12. Apertura de uno de los microcosmos edáficos

Una vez extraída la muestra de la columna y despreciadas las secciones de la misma que estuvieron en contacto con la atmósfera y con la placa porosa de vidrio (2-3 cm desde la superficie y 2-3 cm desde el fondo), se procedió a la división del material edáfico en dos zonas bien diferenciadas (zona superior-ZS y zona inferior-ZI). De cada zona se tomó una muestra integrada de suelo para su posterior análisis (Fig. 3.13).

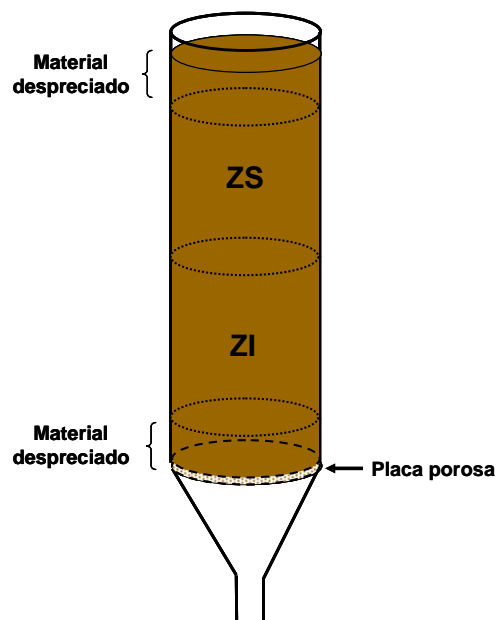


Fig 3.13. Esquema de un microcosmos donde se muestra las diferentes secciones consideradas en el ensayo. ZS: Zona superior. ZI: Zona inferior

3.3.4. Cálculo del tiempo de retención del influente en los microcosmos ensayados

Cuando el agua de lluvia llega al suelo y se infiltra termina por llenar todos sus poros y desalojar a la totalidad del aire. Cuando esto sucede, se dice que el suelo se encuentra a su “*capacidad máxima*”. Esta situación constituye un estado pasajero, pues los poros gruesos, sobre todo los mayores de 30 μm , permiten una rápida circulación descendente. A medida que se van vaciando los poros más gruesos la velocidad de circulación del agua disminuye. Finalmente sólo queda el agua capilar, aquella que se encuentra adherida a las partículas del suelo por fuerzas electrostáticas.

La fuerza de unión entre la fase sólida del suelo y la líquida se conoce como “*potencial matricial*”. Cuando el suelo se encuentra en su capacidad máxima, la mayor parte del agua se encuentra muy retirada de la fase sólida y por tanto su potencial matricial es nulo. A medida que va desapareciendo el agua de los poros más gruesos y sólo va

quedando en los de menor tamaño, el potencial matricial va creciendo pues la distancia máxima de las moléculas de agua que llenan un poro es la del radio de ese poro. Cuando el potencial matricial es igual a la presión atmosférica, las fuerzas de empuje y de sujeción de las moléculas de agua se anulan por tener el mismo valor y signo opuesto, de modo que ese agua permanecería retenida de modo indefinido. En este punto se dice que el suelo ha llegado a su “*capacidad de retención*”. Se considera que el tiempo de retención del agua es el periodo de tiempo que tarda el suelo en pasar de su capacidad de retención a su capacidad máxima. La expresión matemática empleada para el cálculo del tiempo de retención del agua en los microcosmos edáficos ensayados es la siguiente:

$$T_R = V_{\text{efectivo}}/Q$$

donde T_R es el tiempo de retención del líquido influente en el microcosmos, V_{efectivo} es el volumen efectivo de la muestra de suelo (volumen total de poros y canales) y Q es el caudal externo de entrada a los microcosmos.

Por su parte, V_{efectivo} se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$V_{\text{efectivo}} = \varepsilon V_t$$

donde, V_t es el volumen total de las columnas empleadas y ε es la porosidad de las muestras de suelo que vamos a utilizar.

La ecuación empleada para el cálculo del volumen total es la siguiente:

$$V_T = \pi r^2 h$$

donde, h es la altura de la columna utilizada y r el radio de la misma.

El cálculo de la porosidad de las muestras de suelo empleadas en nuestro ensayo se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\varepsilon = \text{m}^3 \text{ agua} / \text{m}^3 \text{ tierra}$$

Para determinar la porosidad del suelo de estudio se tomó 1 dm³ de suelo problema y se introdujo en un vaso de precipitados de 1L de capacidad. A continuación, se vertió agua contenida en una probeta de 1L sobre la muestra hasta alcanzar el punto de saturación de la misma, hecho que se observa cuando aparece una fina capa de agua sobre la superficie de la tierra. La porosidad de la muestra fue determinada a partir de la relación entre el volumen de agua añadido al vaso de precipitados y el volumen de tierra considerado (Fig. 3.14).



Fig 3.14. Vaso de precipitados y probeta empleadas en la determinación de la porosidad de las muestras de suelo utilizadas.

De acuerdo con las expresiones descritas, el tiempo de retención estimado de los distintos microcosmos edáficos fue de 2.12 días y la porosidad del suelo utilizado del 43%.

3.3.5. Análisis de la microbiota cultivable en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos ensayados

Una vez extraídas las muestras de suelo contenidas en los microcosmos, se llevó a cabo el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables. Como se ha comentado anteriormente, las muestras de suelo procedían de la zona superior e inferior de los microcosmos edáficos B y C, que fueron abiertos a los 7, 14 y 21 días en el caso del ensayo

3. Material y Métodos

con 10 mg/l de *LAS* y a los 3, 7 y 21 días en el caso del ensayo con 50 mg/l de *LAS*. El objetivo de estos recuentos era el de establecer el posible efecto de *LAS* sobre el crecimiento de la microbiota cultivable en los distintos ensayos.

Estos recuentos se llevaron a cabo en dos tipos de medios de cultivo a partir de 1 g de muestra (peso seco):

- a) Medio TSA diluido (10%)
- b) Medio de Burk's + NH_4^+ . La preparación de este medio requiere de la elaboración de tres soluciones (A, B y C) cuya composición es la siguiente (g/l):

Solución A: K_2HPO_4 : 6.4

KH_2PO_4 : 1.6

Solución B: NaCl : 2.0

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2.0

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.5

Solución C: $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.01

FeSO_4 : 0.03

Las tres soluciones se esterilizan por separado. Un litro de medio de Burk's se obtiene mediante la adición de 100 ml de la solución A, 100 ml de la solución B, 100 ml de la solución C, 5g de glucosa, 3 g de cloruro amónico, 16 g de agar y 700 ml de agua destilada.

La siembra se realizó añadiendo 0.1 ml de las diluciones correspondientes a cada placa. Las placas se incubaron en la estufa a una temperatura de 30°C y tras 48 horas se realizaron los recuentos.

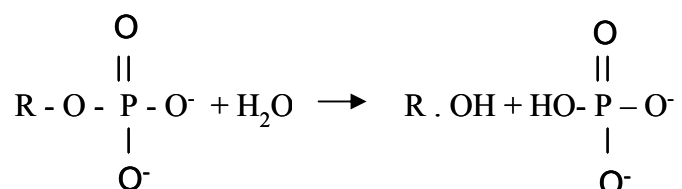
3.3.6. Determinación de actividades enzimáticas en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos

Se realizaron medidas de las siguientes actividades enzimáticas sobre las muestras de suelo correspondientes a la zona superior e inferior de los microcosmos edáficos B y C, abiertos a los 7, 14 y 21 días en el caso del ensayo en el que se utilizó 10 mg/l de LAS y a los 3, 7 y 21 días en el caso del ensayo con 50 mg/l de LAS. El método empleado para la determinación de las actividades enzimáticas estudiadas ha sido el descrito por Page *et al.* (1982).

3.3.6.1. Actividad enzimática fosfatasa

Las fosfatasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los ésteres y los anhídridos del ácido fosfórico (Schmidt and Laskowski, 1961). Estas enzimas se clasifican como ácidas ó alcalinas según muestren su actividad óptima en rango ácido ó alcalino, respectivamente. Su importancia radica en su papel en la mineralización del fósforo orgánico en suelos y en la nutrición de las plantas.

La ecuación general que describe la reacción catalizada por las fosfatasas ácidas y alcalinas es la siguiente:



El procedimiento empleado para la identificación y cuantificación de la actividad fosfatasa está basado en un método colorimétrico en el que se usa como indicador el *p*-Nitrofenol, el cual genera una coloración amarilla en medio alcalino. (Tabatabai and Bremner, 1969; Eivazi and Tabatabai, 1977).

Reactivos

- *p*-Nitrofenil fosfato tetrahidrato (sustrato)
- *p*- Nitrofenol (indicador)
- Tolueno
- CaCl₂
- Tampón Universal Modificado (MUB), cuya composición es la siguiente: 12.1 g/l de Trihidroximetil Aminometano (THAM), 11.6 g/l de Ácido Maleico, 14 g/l de Ácido cítrico, 6.3 g/l de H₂ BO₄, y 488 ml de NaOH 1 N

Para la determinación de la actividad fosfatasa ácida se prepara el tampón modificado a pH 6.5. Para ello, se toman 200 ml de MUB y se ajusta el pH a 6.5 añadiendo ácido clorhídrico 0,1 N hasta alcanzar un volumen de un litro. Para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina se prepara el tampón modificado a pH 11. Para ello, se toman 200 ml de MUB y se ajusta el pH a 11 añadiendo NaOH 0.1 N hasta alcanzar un volumen de un litro.

El *p*-Nitrofenil fosfato se prepara disolviendo 0,42 g de *p*-Nitrofenil fosfato tetrahidrato en 40 ml de MUB a pH 6.5 (para la determinación de la actividad fosfatasa ácida) o pH 11 (para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina), una vez disuelto se diluye hasta un volumen de 50 ml con MUB del mismo pH.

La solución *p*-Nitrofenol fosfato (PNP) se prepara disolviendo 1 g de *p*-Nitrofenol en 70 ml de agua y una vez disuelto se diluye hasta un volumen de 1 litro.

Procedimiento

Se toma 1 g de suelo (peso seco) y se mezcla con 0,2 ml de tolueno, 1 ml de solución *p*-Nitrofenol fosfato y 4 ml de tampón universal modificado (MUB) a pH 6.5 para la determinación de la actividad enzimática fosfatasa ácida o 4 ml de MUB a pH 11 para la determinación de la actividad enzimática fosfatasa alcalina. Una vez mezclado, se incuba a 37° C durante 1 hora. La incubación se detiene por la adición de 1 ml de CaCl₂ 0.5 M y 4 ml

de NaOH 0.5 N. A continuación las muestras son centrifugadas durante 10 minutos a 1.300 g en una centrifuga Kokusan 4103N. Finalmente se mide la absorbancia en el espectrofotómetro (410 nm) del sobrenadante resultante.

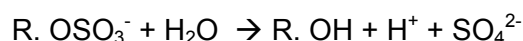
Procedimiento para la obtención de la curva patrón

Para la construcción de una curva patrón que permita determinar correctamente las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y alcalina, se prepara una solución madre de *p*-Nitrofenol, diluyendo 1 ml de solución *p*-Nitrofenol en 100 ml de agua destilada. A continuación, se toman alícuotas de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de esta solución, y se llevan hasta un volumen final de 5 ml mediante la adición de agua destilada, consiguiéndose de esta manera concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml de *p*-nitrofenol. Seguidamente, los distintos tubos se introducen en la estufa a 37°C durante 1 hora y posteriormente, se añade 1 ml de CaCl₂ 0.5 M y 4 ml de NaOH 0.5 M a cada tubo. Por último, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 410 nm.

3.3.6.2. Actividad enzimática Arilsulfatasa

Las arilsulfatasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de un anión arilsulfato por rotura del enlace O - S (Spencer, 1958).

La reacción que describe la actividad arilsulfatasa es la siguiente:



Esta reacción es irreversible y no hay evidencias de que algún aceptor del sulfato excepto el agua, pueda ser utilizado, o que algún ión metálico sea necesario para esta función catalítica.

Reactivos (Tabatabai and Bremner, 1970)

- *p*-Nitrofenil sulfato tetrahidrato 0.025 M (sustrato)
- *p*- nitrofenol (indicador)
- Tolueno
- Tampón acetato 0.5 M, pH 5.8
- CaCl₂ 0.5 M
- NaOH
- HCl

El tampón acetato 0,5 M se prepara disolviendo 68 g de acetato sódico trihidrato en 700 ml de agua. A continuación se añaden 1.7 ml de ácido acético glacial (99%) y finalmente se completa la mezcla con agua hasta alcanzar un volumen de 1 L.

El *p*-Nitrofenil sulfato tetrahidrato (sustrato) se prepara disolviendo 0.312 g de *p*-Nitrofenil sulfato de potasio en 50 ml de tampón acetato.

Procedimiento

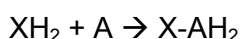
Se toma 1 g (peso seco) de suelo húmedo y se mezcla con 0.25 ml de tolueno, 4 ml de tampón acetato 0.5 M a pH 5.8 y 1 ml de *p*-Nitrofenil sulfato (PNS). Dicha mezcla se incuba a 37°C durante 1 hora. La incubación se detiene por la adición de 1 ml de CaCl₂ 0.5 M y 4 ml de NaOH 0.5 M. A continuación se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 1300 g en una centrífuga KoKusan 4103N. Finalmente, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a (410 nm) del sobrenadante obtenido.

Procedimiento para la obtención de la curva patrón

El procedimiento para la determinación de la curva patrón de la actividad enzimática arilsulfatasa es el mismo que el descrito con anterioridad para la obtención de la curva patrón de la actividad enzimática fosfatasa ácida y alcalina.

3.3.6.3. Actividad enzimática deshidrogenasa

Generalmente, la oxidación biológica de compuestos orgánicos es un proceso de deshidrogenación. Los sistemas enzimáticos de deshidrogenasas juegan un papel importante en la oxidación de la materia orgánica del suelo así como en la transferencia de hidrógeno procedente del sustrato a los aceptores. Los sistemas de deshidrogenasa relacionados con la actividad deshidrogenasa son muy numerosos, así como variados, estos sistemas son una parte integral de los microorganismos. De este modo, el resultado del estudio de la actividad deshidrogenasa muestra la actividad media de la población microbiana (Skujins, 1976).



Donde XH_2 es un compuesto orgánico (donador de H) y A es un aceptor de H.

Reactivos (Casida *et al.*, 1964)

- 2,3,5- Trifenil tetrazolio cloruro (TTC) (sustrato)
- Trifenil formazan (TPF) (indicador)
- Metanol reagent-grade
- CaCO_3

El 2,3,5- Trifenil tetrazolio cloruro (TTC) se prepara disolviendo 3 g de TTC en 100 ml de agua destilada. El Trifenil formazan (TPF) se prepara disolviendo 100 mg de TPF en 100 ml de metanol.

Procedimiento

Se toman 20 g de suelo seco y tamizado (diámetro de malla de 2 mm) y se mezclan con 0.2 g de CaCO_3 . De dicha mezcla se toman 3 porciones de 6 g cada una, a las que se le añaden 1ml de 2,3,5- Trifenil tetrazolium cloruro y 2.5 ml de agua destilada. Posteriormente, las muestras se incuban a 37°C durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, las porciones

se mezclan con 10 ml de metanol y se filtran cuantitativamente a través de un algodón absorbente. El color rojo resultado de la actuación de la deshidrogenasa del suelo sobre el TPF, se elimina del algodón mediante metanol llegando hasta un volumen final de 100 ml con metanol adicional. La absorbancia del TPF se determina por espectrofotometría a 485 nm.

Procedimiento para la obtención de la curva patrón

Para la determinación de la actividad enzimática deshidrogenasa se prepara una solución madre de TPF diluyendo 10 ml de TPF en 100 ml de metanol (100 µg de TPF/ml). A continuación, se toman alícuotas de 0, 5, 10, 15 y 20 ml de esta solución y se llevan hasta un volumen final de 100 ml con metanol obteniéndose concentraciones de 0, 500, 1000, 1500 y 2000 µg de TPF/100 ml. Finalmente se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 485 nm.

3.3.7. Determinación de LAS en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos

Una vez extraídas las muestras de suelo contenidas en los microcosmos se cuantificó la concentración de LAS, presente en cada una de ellas. Las muestras de suelo integradas correspondían a la zona superior e inferior de los microcosmos edáficos A y B abiertos a los 7, 14 y 21 días en el caso del ensayo en el que se utilizó 10 mg/l de LAS y a los abiertos a los 3, 7 y 21 días en el caso del ensayo con 50 mg/l de LAS.

En procedimiento empleado para la determinación de LAS en las muestras de suelo es el descrito en el apartado de Material y Métodos 3.1.2.

3.3.8. Estudio de los perfiles de biodiversidad de las comunidades bacterianas en los microcosmos edáficos

Tradicionalmente, la visión acerca de la diversidad de los microorganismos edáficos estaba basada en la obtención de cultivos de laboratorio en medios especialmente formulados para ello. Sin embargo, la comparación de recuentos microscópicos directos de

células con los obtenidos en placas de cultivo puso de manifiesto que al menos el 99% de los procariotas presentes en el suelo eran incapaces de crecer en medios de cultivo (Ritchie *et al.*, 2000; Muyzer, 1999). Por este motivo, se requiere el empleo de técnicas moleculares independientes de cultivo para completar el estudio de las comunidades microbianas del suelo.

Para el estudio de las comunidades microbianas de las muestras de suelo se eligieron 2 genes: el gen codificante del ARN ribosómico 16S, que permitió el estudio de las poblaciones bacterianas totales de las muestras de suelo, y el gen *amoA* (gen estructural de la amonio monooxigenasa, una de las enzimas funcionales para la fase I de la nitrificación), con el fin de estudiar específicamente las poblaciones de las bacterias oxidadoras de amonio. Para la obtención de perfiles de las comunidades microbianas en las distintas muestras de suelo procedentes de los microcosmos ensayados, se utilizó la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). Las muestras de suelo correspondían a la zona superior e inferior de los microcosmos B y C, tanto en los abiertos tras 7,14 y 21 días en el caso del ensayo en el que se utilizó 10 mg/l de LAS, como en los abiertos tras 3,7 y 21 días en el caso del ensayo con 50 mg/l de LAS. Para la realización de esta técnica fueron necesarios una serie de pasos los cuales consistieron en:

- 1) Extracción del ADN bacteriano total de las muestras de suelo procedentes de los microcosmos.
- 2) Amplificación de los fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S de Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Bacterias Gram positivas de alto G+C y Acidobacterias, y del gen estructural de la subunidad alfa de la enzima amonio monooxigenasa (*amo A*) para el estudio de las β -proteobacterias oxidadoras de amonio (nitrificantes de fase I), mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 3) Separación de los fragmentos de distinta secuencia de ADN mediante TGGE.
- 4) Reamplificación por PCR de los fragmentos separados e identificación de las poblaciones mediante secuenciación de ADN.

3.3.8.1. Extracción del ADN bacteriano de las muestras de suelo

Para la extracción del ADN de las muestras de suelo, se utilizó un kit comercial desarrollado específicamente para suelos, sedimentos y fangos (UltraClean Soil DNA Isolation Kit, MoBio[®], USA).

Los pasos seguidos para la extracción fueron los recomendados por el fabricante del kit:

- Se añadió 1 g de suelo (peso seco) a un tubo de 2ml, que contenía un buffer de suspensión adicionado con perlas de vidrio, y se agitó hasta conseguir su mezcla completa.
- Se añadió 60 µl de solución S1 y se mezcló todo homogéneamente.
- Se añadieron 200 µl de la solución IRS (solución para retirar inhibidores de las ADN polimerasas presentes en las muestras) y se agitaron los tubos en un vortex provisto de un adaptador de tarima plana para acoplar los tubos horizontalmente, durante 10 min. En este paso, la combinación de la solución S1 y la acción mecánica de las perlas de vidrio permite la disgregación correcta de la muestra y la adecuada extracción del ADN de la misma.
- Se centrifugaron los tubos a 10.000 g durante 30 seg en una centrifuga Minispin plus Eppendorf[®].
- El sobrenadante se recuperó y se dispuso en tubos limpios. Seguidamente se añadió a cada tubo 250 µl de la solución S2, se agitó durante 5 seg, y se mantuvo a 4°C durante 5 min.
- Se centrifugaron los tubos a 10.000 g durante 10 min.
- El sobrenadante se volvió a recuperar y se dispuso en tubos limpios, a los que se añadieron 1.3 ml de la solución S3, y se agitó durante 5 seg.
- Alrededor de 700 µl se transfirieron a unidades de filtración acopladas a un tubo eppendorf, y se centrifugaron a 10.000 g durante 1 min. Este paso se repitió hasta agotar la totalidad del volumen. La membrana de las unidades de filtración tiene afinidad por el ADN, bajo las condiciones de extracción.
- Se añadieron a las unidades de filtración 300 µl de la solución S4. Se centrifugó durante

30 seg a 10.000 g y se desechó el líquido que había pasado por el filtro.

- Se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 1 min para eliminar restos de la solución S4, y la unidad de filtración se llevó a otro tubo limpio. Se añadieron después a la unidad de filtración 50 µl de la solución S5, con el fin de fluir el ADN unido a la membrana de la unidad de filtración.

- Se centrifugó de nuevo durante 30 seg y se recuperó el líquido filtrado conteniendo el ADN purificado.

Tras este último paso, se comprobó el ADN extraído mediante electroforesis en un gel de azarosa al 0.8 %, y se conservó a -20°C.

3.3.8.2. Amplificación selectiva de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S de Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Bacterias Gram positivas de alto G+C y Acidobacterias

Las muestras de ADN se sometieron a una estrategia de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación. En la primera de ellas se amplificó una región correspondiente a un fragmento del gen codificante del ARNr 16S utilizando como cebadores oligonucleóticos de secuencia específica para los distintos grupos microbianos estudiados. El producto de esta PCR fue de diferente tamaño dependiendo del grupo bacteriano estudiado (Tabla 3.5). En la segunda PCR, se utilizaron como molde los productos de la primera PCR para amplificar una región interna de menor tamaño (aproximadamente 0,2 Kb) correspondiente a la región hipervariable V3 (nucleótidos 341 al 534, numeración de *Escherichia coli*, Muyzer *et al.*, 1993). Se empleó la estrategia de PCR anidada con la finalidad de obtener un mayor rendimiento en la amplificación, ya que evita la unión inespecífica de los cebadores, mejora la amplificación de poblaciones presentes en bajo número, y permite obtener patrones de bandas más completos (Nicolaisen and Ramsing, 2002; Ward and O'Mullan, 2002).

Tabla 3.5. Tamaños amplificados del gen ADNr 16S en la primera PCR

GRUPO BACTERIANO	TAMAÑO (pares de bases)
Eubacterias	1500
Alfa-proteobacterias	1199
Beta-proteobacterias	941
Bacterias Gram positivas de alto G+C	1159
Acidobacterias	1510

Para la primera PCR se emplearon las siguientes parejas de cebadores: fD1 y rD1 para Eubacterias, F203alfa y R1401 para Alfa-proteobacterias, R948beta y fD1 para Beta-proteobacterias, F243hgc y R1401 para Actinomicetales, y 31F y rD1-sc para Acidobacterias.

Para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer *et al.*, 1993). La secuenciación del cebador GC-P1 está basada en una región conservada del gen, a la que se añade una cola de 40 pares de bases ricas en GC necesarias para la separación correcta mediante TGGE (Muyzer *et al.*, 1993). En la Figura 3.15 se muestra un esquema del procedimiento completo seguido. La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada

OLIGOS	SECUENCIA (DE 5 A 3)	REFERENCIAS
fD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
rD1	CCC GGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
F203alfa	CCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTAT	Gomes <i>et al.</i> (2001)
R-1401	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA	Gomes <i>et al.</i> (2001); Heuer <i>et al.</i> (1997)
R948-beta	TCATCCACCGCTTGTGCG	Gomes <i>et al.</i> (2001)
F243hgc	GGATGAGCCCGCGGCCTTA	Heuer <i>et al.</i> (1997)
31F	GATCCTGGCTCAGAATC	Barns <i>et al.</i> (1999)
rD1-sc	TAAGGAGGTGATCCAGCC	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
GC-P1 ^A	CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG GCCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
P ₂	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)

^A En negrita se indica la cola rica en G

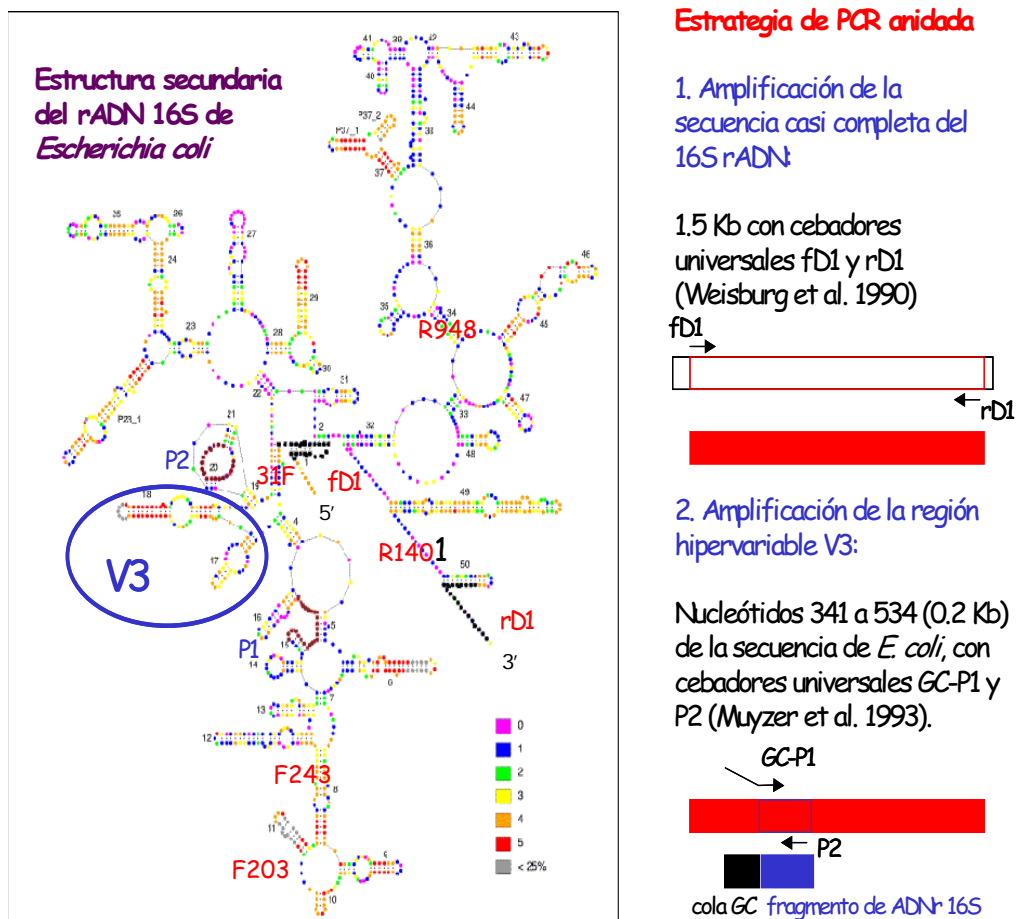


Fig. 3.14. Ejemplo de esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región de mayor tamaño de acuerdo con los cebadores utilizados y en la segunda una región interna de menor tamaño. En el dibujo correspondiente a la estructura secundaria del ARNr 16S de *Escherichia coli* aparecen dibujados todos los cebadores empleados en cada una de las PCR anidadas llevadas a cabo.

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 μ l. En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 3.7.

Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos para **Eubacterias** fueron una modificación de los descritos por Vinuesa *et al.* (1998). El programa de PCR para se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 7 min
2. 20 ciclos que constan de:
 - A: Desnaturalización: 94°C durante 1 min y 10s.
 - B: Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, (*Annealing*): 56 °C durante 40s
 - C: Extensión: 72°C durante 2 min.
3. Extensión final: 72°C durante 6 min y 10 seg.
4. Mantenimiento a 4°C

Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos para **Alfa-proteobacterias** fueron una modificación de los descritos por Gomes *et al.* (2001). El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 min
2. 20 ciclos que constan de:
 - A: Desnaturalización: 94°C durante 1 min.
 - B: Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, (*Annealing*): 56 °C durante 1 minuto.
 - C: Extensión: 72°C durante 2 min.
3. Extensión final: 72°C durante 10 minutos.
4. Mantenimiento a 4°C

Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos para **Beta-proteobacterias** fueron una modificación de los descritos por Gomes *et al.* (2001). El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (PERKIN-ELMER) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 minutos.
2. 4 ciclos que constan de:

- A: Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto.
 - B: *Annealing*: 56°C durante 1 minuto.
 - C: Extensión: 72°C durante 2 minutos.
3. 20 ciclos que constan de:
- A: Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto.
 - B: *Annealing*: 61°C durante 1 minuto.
 - C: Extensión: 72°C durante 2 minutos.
4. Extensión final: 72°C durante 10 minutos.
5. Mantenimiento a 4°C.

Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos para **Bacterias Gram positivas de alto G+C** fueron una modificación de los descritos por Heuer *et al.* (1997). El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (PERKIN-ELMER) y consistió en los siguientes pasos:

- 1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 minutos.
- 2. 30 ciclos que constan de:
 - A: Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto.
 - B: *Annealing*: 63°C durante 1 minuto.
 - C: Extensión: 72°C durante 2 minutos.
- 3. Extensión final: 72°C durante 10 minutos.
- 4. Mantenimiento a 4°C.

Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos para **Acidobacterias** fueron una modificación de los descritos por Barns *et al.* (1999). El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

- 1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 minutos.
- 2. 30 ciclos que constan de:

A: Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos.

B: *Annealing*: 42°C durante 30 segundos.

C: Extensión: 72°C durante 2 minutos.

3. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.

4. Mantenimiento a 4°C.

Tabla 3.7. Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada efectuada en un volumen final de 50 μ l

REACTIVO	VOLUMEN μ L
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	5
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	3
Seroalbúmina bovina 10 mg/mL (N E Biolabs)	1
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	1
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	2,5
Primer Cebador 100 μ M (Sigma)	0,2
Segundo Cebador 100 μ M (Sigma)	0,2
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0,2
ADN molde	1(2-5 ng)
Agua bidestilada grado PCR	36

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 5 μ l y se comprobaron en gel de agarosa al 0,8 %, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado. Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar la región V3. Para la realización de la segunda reacción PCR el contenido de la primera PCR de Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Bacterias de alto contenido en G+C y Acidobacterias fue diluido 1/30 (Gomes *et al.*, 2001). La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de la técnica *touch down* descrita por Watanabe *et al.* (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Reactivos empleados en la segunda reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 μ l

REACTIVO	VOLUMEN μ L
PCR Buffer Gold 10X (Applied Biosystems)	5
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	3
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	1
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	1
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	2,5
Cebador GC-P1 100 μ M, purificado mediante HPLC (Sigma)	0,2
Cebador P2 100 μ M, purificado mediante HPLC (Sigma)	0,2
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0,2
ADN molde (producto de la primera PCR diluido (1/30))	1
Agua bidestilada grado PCR	36

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 min
2. Treinta ciclos que consisten en:
 - Desnaturalización: 94°C durante 1 min
 - Annealing* : 65°C durante 1 min
 - Esta temperatura se disminuyó automáticamente 1 °C cada 2 ciclos, hasta alcanzar 55 °C, temperatura a la cual se efectuaron 10 ciclos adicionales.
 - Extensión: 72°C durante 2 min
3. Extensión final: 72°C durante 10 min
4. Mantenimiento a 4°C

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1 μ l que se comprobaron en gel de agarosa al 3 %, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (0.2 Kb).

3.3.8.2.1. Concentración del producto de la PCR anidada

Todos los productos de PCR finales para cada una de las muestras se concentraron. Los productos fueron aproximadamente concentrados 3 veces empleando membranas Microcon YM-100 (Milipore®) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.8.3. Amplificación de fragmentos del gen estructural de la subunidad α de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*)

Para el estudio específico de las comunidades de bacterias nitrificantes, se escogió como marcador el gen *amoA*, que codifica la subunidad α de la enzima amonio-monooxigenasa, propia de las bacterias oxidadoras de amonio (nitrificantes de fase I). Este gen ha sido empleado en estudios previos, puesto que ha sido posible diseñar cebadores específicos para su amplificación en bacterias nitrificantes de fase I pertenecientes a la subclase β de las Proteobacterias, que comprende los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*, englobando este último a los antiguos géneros *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio* (Nicolaisen and Ramsing, 2002). Estos cebadores no amplifican fragmentos de *amoA* de las bacterias nitrificantes de fase I pertenecientes a la subclase γ de las Proteobacterias (*Nitrosococcus oceanus* y *N. halophilus*), descritas únicamente en ambientes marinos (Nicolaisen and Ramsing, 2002).

Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR utilizando la estrategia semi-anidada optimizada por Nicolaisen and Ramsing (2002) empleando cebadores exentos de degeneraciones en la secuencia oligonucleotídica, con lo que se consigue una mayor especificidad de la amplificación y mejor calidad de los perfiles de bandas.

Para la primera PCR se emplearon los cebadores AmoA-1F y AmoA-2R, y para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-AmoA-1F y AmoA-2R (Nicolaisen

and Ramsing, 2002). La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR semi-anidada

CEBADOR	SECUENCIA (DE 5´A 3´)
AMOA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT
AMOA-2R	CCCCTCTGCAAAGCCTTCTTC
GC-AMOA-1F	CGCCGCGCGGCCGGGCGGGGCGGGGGC GGGGTTTCTACTGGTGGT

En negrita se indica la cola rica en GC

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron las descritas por Nicolaisen and Ramsing (2002). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Reactivos empleados en las reacciones de la PCR anidada, efectuadas en un volumen final de 50µl

REACTIVO	VOLUMEN µL
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	5
MgCl ₂ 25mM (Applied Biosystems)	3
Seroalbúmina bovina 10mg/ml (N E Biolabs)	1
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	1
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	2.5
Cebador AmoA-1F ó GC-AmoA-1F 100µM (Sigma)	0.2
Cebador AmoA-2R 100µM (Sigma)	0.2
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0.2
ADN molde	1
Agua bidestilada grado PCR	36

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 92°C durante 7 minutos.
2. 35 ciclos que constan de:
 - Desnaturalización: 92°C durante 30 segundos.
 - Annealing*: 57°C durante 30 segundos.
 - Extensión: 72°C durante 45 segundos, añadiendo 1 segundo adicional por ciclo.
3. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.
4. Mantenimiento a 4°C.

Tras la primera reacción, se tomaron alícuotas de 1 µl que se chequearon en gel de agarosa al 3%, para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (475 bp). Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a la segunda PCR en idénticas condiciones. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl. Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1µl que se chequearon nuevamente en un gel de agarosa al 3%.

3.3.8.3.1. Concentración del producto de la PCR anidada

Todos los productos de PCR finales para cada una de las muestras se concentraron aproximadamente 20 veces, empleando membranas Microcon (Milipore), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.8.4. Separación de las muestras mediante TGGE

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Watman Biometra). Para la separación de los distintos fragmentos se emplearon geles desnaturizantes de poliacrilamida, preparados en agua MilliQ, con la composición que se indica en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Composición del gel desnaturizante de poliacrilamida empleado en la TGGE

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Poliacrilamida-bisacrilamida 37.5:1 (Sigma)	6 %
Urea, grado biología molecular (Sigma)	8 M
Formamida desionizada (Sigma)	20 %
Glicerol (Sigma)	2 %
Buffer tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE) pH 8,0	1x
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina (TEMED), grado biología molecular	0,06 %
Persulfato de amonio, grado biología molecular	0,06 %

Los geles se dejaron polimerizar durante 24 h antes de llevar a cabo la electroforesis.

Para la electroforesis se empleó *buffer* TAE (2X). Se cargaron 4 μ l de cada muestra más 1 μ l de *buffer* de carga (5X) de la siguiente composición: 0.5 % tritón X-100, 0.05 % azul de bromofenol, 0.05 % xilencianol, EDTA 10 mM y *buffer* TAE 5X.

Las condiciones de la electroforesis para Eubacterias, Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Bacterias de alto contenido en G+C y Acidobacterias fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:
 - Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 20^{\circ}\text{C}$
 - Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 20^{\circ}\text{C}$
 - Voltaje 300 V
 - Duración 18 min
2. Establecimiento del gradiente de temperatura:
 - Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 43^{\circ}\text{C}$
 - Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 63^{\circ}\text{C}$
 - Voltaje 0 V
 - Duración 10 min
3. Separación de muestras:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 43^\circ\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 63^\circ\text{C}$
- Voltaje 125 V
- Duración 18 h

Además, debido al alto contenido en G+C de este grupo, se ensayaron diferentes condiciones de electroforesis hasta optimizar el gradiente de temperatura con el objetivo de obtener una mayor resolución en la separación. Las condiciones electroforéticas se optimizaron y fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:
 - Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 20^\circ\text{C}$
 - Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 20^\circ\text{C}$
 - Voltaje 300 V
 - Duración 18 min
2. Establecimiento del gradiente de temperatura:
 - Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 47^\circ\text{C}$
 - Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 56^\circ\text{C}$
 - Voltaje 0 V
 - Duración 10 min
3. Separación de muestras:
 - Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 47^\circ\text{C}$
 - Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 56^\circ\text{C}$
 - Voltaje 125 V
 - Duración 18 h

Para separar los fragmentos amplificados del gen estructural de la subunidad α de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*), se siguieron los mismos pasos explicados para la separación de fragmentos amplificados del gen codificante del ARNr 16S, excepto el programa para el TGGE, que varió las temperaturas, y que no se usaron marcadores de

especies. Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 20^\circ\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 20^\circ\text{C}$
- Voltaje 300 V
- Duración 18 min

2. Establecimiento del gradiente de temperatura:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 38^\circ\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 48^\circ\text{C}$
- Voltaje 0 V
- Duración 10 min

3. Separación de muestras:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 38^\circ\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 48^\circ\text{C}$
- Voltaje 120 V
- Duración 18 h

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con plata, empleando el kit “Gel Code Silver Staining” (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como patrón de separación para los fragmentos del gen ADNr 16S, se construyó un marcador de seis especies a partir de las cepas de colección que se muestran en la Tabla 3.12 (Cortés Lorenzo *et al.*, 2006). El proceso seguido para preparar el fragmento de ADN de los patrones fue idéntico al de las muestras.

Tabla 3.12. Listado de las cepas de colección que se emplearon como marcadores en la TGGE

ESPECIE	CEPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 8750
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 15308
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α
<i>Nocardia corynebacterioides</i>	ATCC 21253
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341

ATTC: American Type Cultura Collection

3.3.8.5. Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE

Las bandas individuales visualizadas en los geles mediante tinción de plata se punzaron en su parte central con una punta de pipeta estéril, y el fragmento así extraído se suspendió en 10 μ l de agua bidestilada grado PCR, en tubos de 0.2 μ l para PCR. Partiendo de estos fragmentos como molde, se efectuó la reamplificación de cada banda individual mediante PCR, siguiendo el mismo procedimiento ya descrito en los apartados 3.3.8.2. y 3.3.8.3.

3.3.8.6. Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN reamplificados

Los productos de PCR reamplificados se corrieron en geles de agarosa al 3% y, tras la tinción con bromuro de etidio, las bandas se escindieron del gel con una espátula estéril, siendo purificadas mediante el kit de extracción Quiaex II (Quiagen), y el ADN resuspendido en un volumen final de 20 μ l de agua MilliQ esteril.

Los productos así purificados fueron secuenciados empleando como cebadores los mismos utilizados para su reamplificación. La secuenciación de ADN de doble cadena fue efectuada por el centro López Neyra (Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada) mediante el método de los terminadores marcados con fluorocromos, usando el kit ABI-PRISM[®] Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems[®]) y un

secuenciador automático Applied Biosystems 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

3.3.8.7. Análisis informático de las secuencias

Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados con los programas informáticos de libre distribución *Chromas* v. 1.51 y *Gene Runner* v. 3.05. Para el alineamiento y la comparación de las secuencias de ADN de los distintos fragmentos obtenidos, se emplearon las herramientas de biocomputación *Align* (Kruskal, 1983) y *WU-BLAST-n* v. 2.0 (Altschul *et al.*, 1997), ambas disponibles en el servidor web del *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk>). El programa *Clustal X* v. 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) fue utilizado para la generación de alineamientos de las secuencias, empleando los parámetros por defecto. se empleó el programa *Mega2* (Kumar, 2001). Para el cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método *Neighbour-Joining* (Saitou and Nei, 1987), se empleó el programa *Mega2* (Kumar, 2001). Los árboles se calcularon tomando como criterio la no inclusión de los huecos (*gaps*) del alineamiento. Los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo con reemplazamiento (*Bootstrap*) (Felsenstein, 1985) y los porcentajes superiores al 50% aparecen reflejados en los árboles correspondientes. Los patrones de bandas obtenidos mediante TGGE se analizaron con el programa *Gel Compar II* v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica). Se construyeron dendrogramas que relacionasen los distintos perfiles de bandas en función de su similitud, aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Dice. Este método establece la similitud entre los perfiles en función de las posiciones relativas de las bandas, pero sin tener en cuenta su densidad (intensidad). Como método para evaluar la fiabilidad del dendrograma, se utilizó el método del coeficiente de correlación cofenético, que expresa la consistencia de un cluster calculando la correlación entre similitudes del dendrograma y la matriz de distancia por pares. Además, se construyeron dendrogramas que relacionasen los perfiles de bandas en función de la densidad (intensidad), el coeficiente de Pearson. Como método para evaluar la fiabilidad del dendrograma, se utilizó el método del coeficiente de correlación cofenética, que expresa la consistencia de un cluster calculando la correlación entre similitudes del dendrograma y la

matriz de distancia por pares.

3.3.9. Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos en los apartados 3.2 y 3.3 se sometieron a tratamiento estadístico, empleando los programas *Statgraphics* plus 3.1. (Statistical Graphics, Corp.) y *Statistica* (StatSoft, Inc.). El tratamiento consistió en:

- Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial con interacción.
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias y test de rango múltiple (t de Student) para determinar la influencia por separado de los factores de variación en los análisis multifactoriales.
- Análisis de correlación lineal de Pearson.

Los resultados se presentan en gráficas o tablas, indicando en cada caso el número de repeticiones. En todos los casos, se ha calculado la MDS con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$).



4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS *IN SITU* DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL LAS Y DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE TRAS VERTIDOS CONTROLADOS EN PARCELAS EXPERIMENTALES. CINÉTICA DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL LAS EN EL SUELO

En este apartado se resumen los principales resultados derivados del seguimiento espacial y temporal de la concentración de LAS y de la microbiota cultivable (microorganismos heterótrofos totales) en una parcela agrícola experimental, tras la aplicación de vertidos controlados del surfactante. Además, se describe la cinética de biotransformación del LAS para las distintas estaciones del año mediante ajustes de la función de extinción del contaminante en el suelo a modelos exponenciales negativos (Perales *et al.*, 1999; Perales *et al.*, 2007).

En la Figura 4.1. se representa la evolución espacio-temporal de la distribución del LAS en el suelo de la parcela experimental durante cada una de las estaciones del año. La concentración inicial de LAS en el suelo, previa a la aplicación del surfactante, estuvo siempre comprendida entre 0.3 y 0.4 mg/kg y su distribución vertical era uniforme. Además, en todas las experiencias se vertió la misma cantidad de LAS sobre el suelo. Tras efectuar el vertido, las mayores concentraciones del surfactante se encontraron siempre en los estratos más superficiales del suelo (normalmente en los primeros 10 cm). Este patrón general resultó especialmente evidente durante la árida estación estival, mientras que las estaciones más húmedas (otoño, invierno y primavera) se caracterizaron por perfiles de distribución vertical de LAS algo menos acusados, en los cuales el surfactante profundizó más en el perfil edáfico. El caso más extremo fue registrado durante el invierno, estación caracterizada por un progresivo descenso vertical del LAS en el suelo a lo largo del periodo de observación.

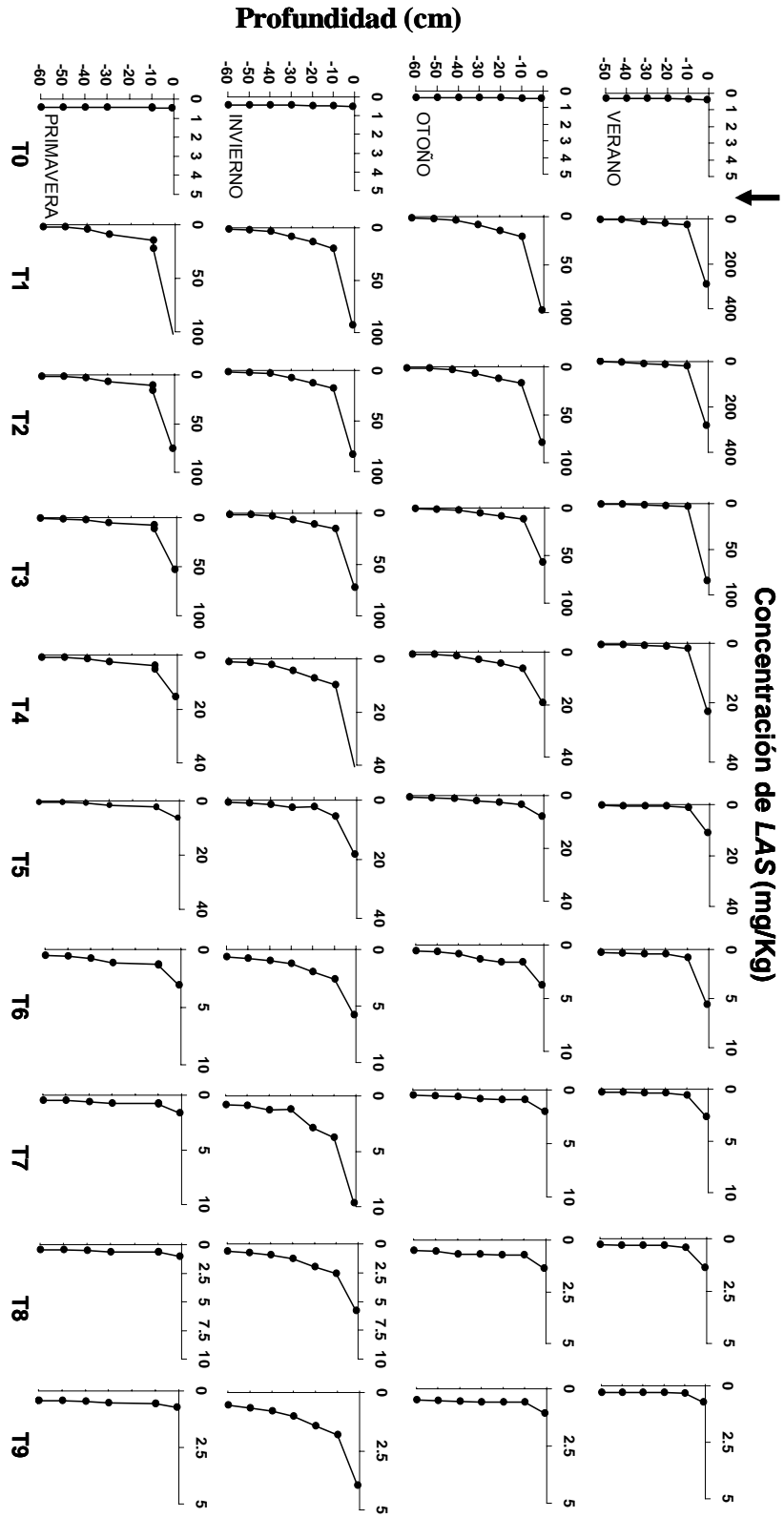


Fig 4.1. Distribución espacio-temporal del LAS a lo largo de cada uno de los experimentos de adición controlada del surfactante efectuados en la parcela experimental . La flecha negra vertical marca el momento en que se realizó el vertido controlado de LAS

En todos los casos estudiados, el *LAS* se vio sometido a un rápido proceso de biotransformación. No obstante, la cinética de la desaparición del surfactante en el suelo presentó un marcado carácter estacional. De esta manera, la evolución temporal de la concentración de *LAS* en el suelo siempre se pudo modelar satisfactoriamente mediante una curva exponencial negativa (Fig. 4.2) ajustada mediante una ecuación del tipo:

$$S = S_0 * e^{-b t}$$

Donde *S* es la concentración de *LAS* en el momento *t*, *S*₀ es la concentración inicial del surfactante en el suelo y *t* es el tiempo.

El coeficiente de extinción del *LAS* en el suelo (representado por el parámetro *b* de la regresión exponencial decreciente) fue distinto en las diferentes estaciones del año (Tabla 4.1). Así, este coeficiente alcanzó sus mayores valores durante las experiencias realizadas en verano y primavera, fue algo inferior en otoño y registró su valor más bajo durante el invierno. Como resultado, la degradación del *LAS* durante el verano y la primavera resultó especialmente efectiva. En tan sólo 18 días se había degradado la totalidad del *LAS* vertido en verano, y sólo se necesitaron 20 días para biotransformar el 98% del vertido en primavera. Algo más lenta fue la biotransformación del surfactante en otoño cuando se registró un 98% de degradación del *LAS* vertido, tras 23 días de observación. Por último, durante el invierno se registró la tasa de biotransformación más lenta y sólo se eliminó el 96% del *LAS* vertido, tras un periodo de observación de 31 días.

Sobre las curvas modeladas, y siguiendo las expresiones propuestas por Perales *et al.* (1999) y Perales *et al.* (2007), se calculó el periodo de aclimatación de los microorganismos al contaminante (*t*₁₀), estimado como el tiempo necesario para obtener una biotransformación del 10% del *LAS* vertido. Igualmente, se determinó el tiempo requerido para reducir la concentración del *LAS* vertido en el suelo en un 50% (*t*₅₀). El tiempo de aclimatación más elevado se detectó durante la estación invernal y el más reducido durante la primavera. De igual forma, *t*₅₀ alcanzó sus valores más bajos en primavera y verano, mientras que el valor más elevado correspondió al invierno (ver Tabla 4.1).

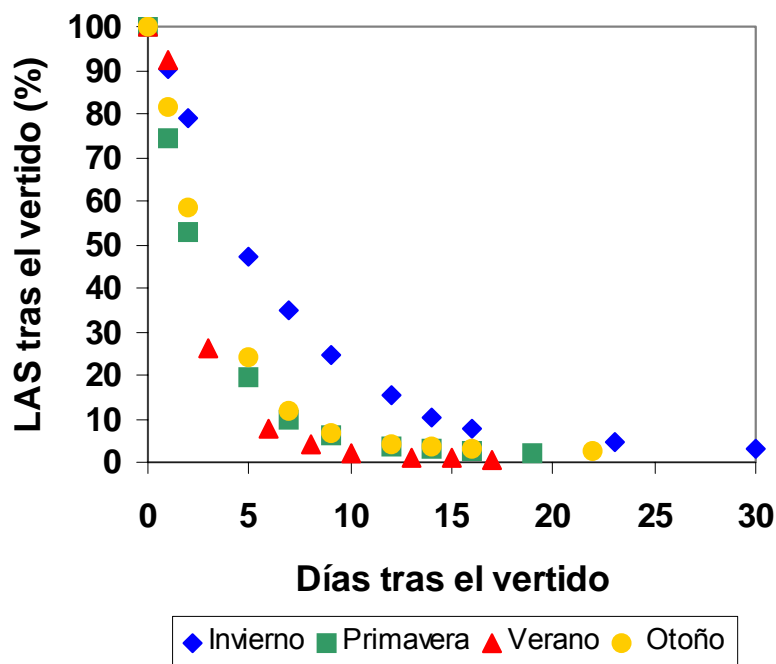


Fig 4.2. Cinética de la biotransformación del LAS para cada una de las estaciones del año

Tabla 4.1. Parámetros de los modelos exponenciales negativos aplicados a la biotransformación del LAS en función del tiempo

	Parámetros de la regresión			Parámetros cinéticos (días)	
	b	R	p	t ₁₀	t ₅₀
Verano	0.3454	0.98	<0.0001	0.75	1.57
Otoño	0.2738	0.99	<0.0001	0.43	2.24
Invierno	0.1558	0.99	<0.0001	1.1	4.45
Primavera	0.3175	0.99	<0.0001	0.40	1.92

La distribución espacio-temporal de la microbiota edáfica cultivable también se caracterizó por una marcada heterogeneidad a lo largo de todo el periodo de estudio. De esta manera, los microorganismos presentaron, durante todas las estaciones del año, un patrón de distribución según el cual las mayores concentraciones se localizaban en las capas más superficiales del perfil edáfico (Fig. 4.3). La variabilidad intraestacional en el perfil de distribución vertical de la microbiota posiblemente se relacione con el efecto de lavado y transporte advectivo de microorganismos ejercidos por la acción de la lluvia y/o de la aplicación de riegos.

En términos promedio, los números mas altos de microorganismos heterótrofos totales se registraron durante las estaciones cálidas de primavera y verano (6.53 y 5.54 Log UFC/g suelo, respectivamente) y menores durante otoño e invierno (5.20 y 5.30 Log UFC/g suelo, respectivamente). El coeficiente de extinción de *LAS* en cada uno de los experimentos de adición mostró relación con la abundancia de microorganismos en el suelo objeto de estudio. Dicha relación, a pesar no poder ser testada estadísticamente debido a la escasez de datos (sólo cuatro, uno por cada estación del año), queda puesta de manifiesto en la Fig. 4.4.

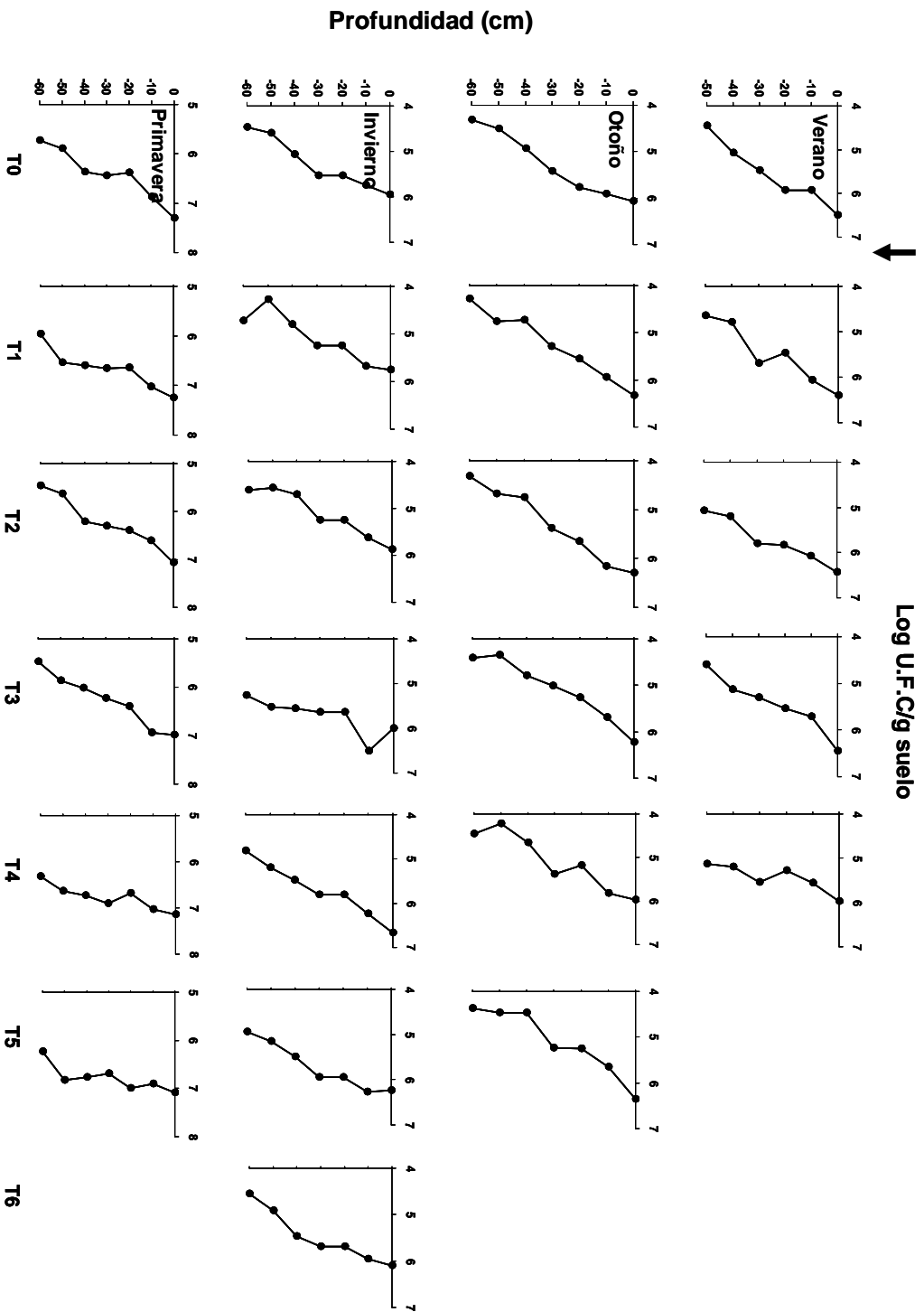


Fig 4.3. Distribución espacio-temporal de la microbiota cultivable a lo largo de cada uno de los experimentos de adición controlada de LAS efectuados en la parcela experimental. La flecha negra vertical marca el momento en que se realizó el vertido controlado del surfactante.

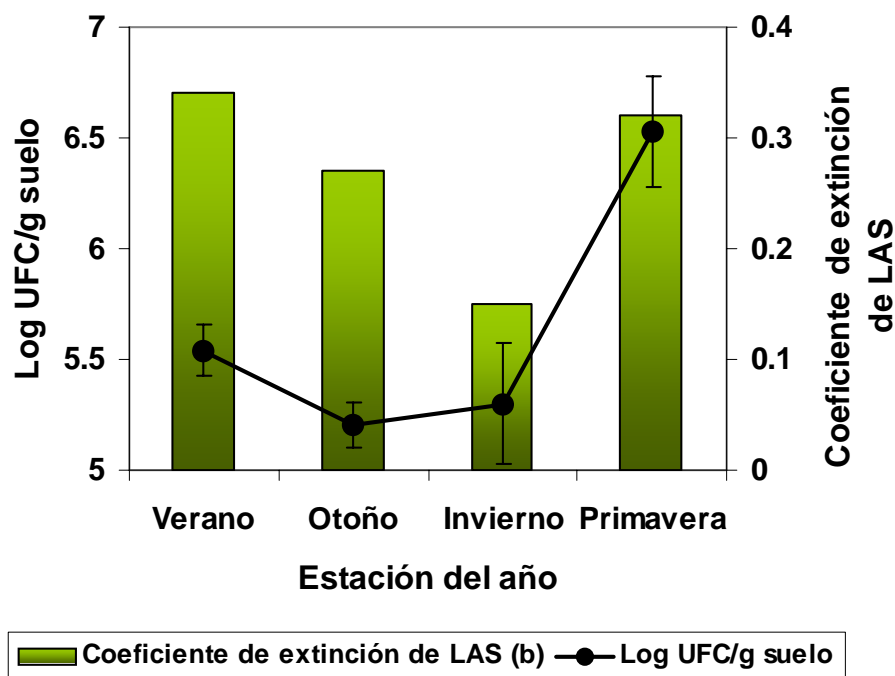


Fig 4.4. Relación entre el número de microorganismos (heterótrofos aerobios) cultivables en el suelo objeto de estudio y el coeficiente de extinción de *LAS* en el mismo

4.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE SUELO AGRÍCOLA ADICIONADO DE *LAS*

Tras realizar la fase de enriquecimiento, se procedió al aislamiento y caracterización de microorganismos a partir de muestras de suelo adicionadas de distintas concentraciones de surfactante (10 y 500 mg/l *LAS*).

4.2.1. Aislamiento y caracterización de microorganismos a partir de suelo adicionado con 10 mg/l de *LAS*

El enriquecimiento de las muestras de suelo adicionadas de 10 mg/l permitió el aislamiento de 9 colonias bacterianas, caracterizadas como representativas de los distintos tipos coloniales dominantes.

En primer lugar, las 9 cepas seleccionadas (LAS01 a LAS09) fueron diferenciadas según su morfología y pigmentación colonial tal y como se detalla en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Características coloniales de las cepas aisladas (grande > 3 mm; pequeña < 3 mm)

CEPA	MORFOLOGÍA COLONIAL	PIGMENTACIÓN
LAS01	Pequeña y estrellada	Azulado
LAS02	Grande y aterciopelada	Blanco
LAS 03	Grande y estrellada	Blanco
LAS04	Grande, redonda y cremosa	Blanco
LAS05	Pequeña, irregular y con un halo	Ámbar
LAS06	Pequeña y redonda	Ámbar
LAS07	Pequeña y redonda	Transparente
LAS08	Pequeña y redonda	Amarillo pálido
LAS09	Grande y redonda	Blanca

4.2.2. Aislamiento y caracterización de microorganismos a partir de suelo adicionado con 500 mg/l de LAS

Del enriquecimiento de las muestras de suelo adicionadas con 500 mg/l de LAS se aislaron 10 colonias bacterianas (caracterizadas como representativas del único tipo colonial), con idéntica morfología y pigmentación. A estas colonias se le realizaron una serie de pruebas (microscópicas, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas) que permitieran su ubicación taxonómica. Los resultados obtenidos para cada una de las cepas resultaron ser idénticos y se resumen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, determinadas a las cepas bacterianas aisladas de un suelo agrícola adicionado de 500 mg/l de LAS

PRUEBA	RESULTADO
Morfología	Bacilo
Gram	-
Movilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Desnitrificación	-
Crecimiento	Anaerobia facultativa

A continuación, a cada una de estas cepas se le aplicó un estudio bioquímico más específico basado en el sistema miniaturizado API 20 E descrito en el apartado de Material y Métodos. Los resultados de esta prueba volvieron a coincidir en todas las cepas. De esta manera, se obtuvieron resultados positivos para las pruebas bioquímicas β -galactosidasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, utilización del citrato, producción de acetoina, producción de NO_2 , reducción a gas N_2 y fermentación de los siguientes azúcares: glucosa, manitol, inositol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, arabinosa y amigdalina. Sin embargo, los resultados obtenidos para las pruebas bioquímicas arginina, producción de H_2S , ureasa, triptofano desaminasa, producción de indol y fermentación del azúcar gelatinasa resultaron negativos.

Con los resultados obtenidos se procedió a la clasificación taxonómica de las cepas escogidas, utilizando para ello el catálogo API 20E y las claves identificativas recogidas en el Manual Bergey's of Determinative Bacteriology. Como conclusión, se determinó que todas las cepas estudiadas se identificaban con *Enterobacter aerogenes*.

4.2.3. Identificación genética de microorganismos

Con objeto de poder identificar a nivel de especie las distintas cepas aisladas desde los suelos adicionados con 10 y 500 mg/l de LAS se procedió al análisis genético de la secuencia del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S. Esta técnica es hoy día reconocida como de enorme importancia en el estudio de las interrelaciones filogenéticas entre los microorganismos. De hecho, el análisis de esta región especialmente diversa, ha conducido a importantes revisiones de la taxonomía y sistemática de las bacterias, así como a la introducción de nuevos géneros y especies (Vinuesa *et al.*, 1998). En el caso del aislamiento tras el enriquecimiento con 10 mg/l de LAS se identificaron genéticamente los 9 tipos coloniales seleccionados. Por su parte, en el caso del aislamiento tras el enriquecimiento con 500 mg/l de LAS, de las 10 cepas idénticas aisladas se procedió a la identificación genética de una de ellas escogida al azar.

4. Resultados

Tras la amplificación por PCR y la purificación de los fragmentos de ADN correspondientes al gen que codifica para el ARNr 16S de cada una de las cepas, se procedió a su secuenciación parcial. Con la estrategia empleada, se obtuvo una secuencia de en torno a 650-700 nt en todos los casos, que abarca las regiones hipervariables V1, V2 y V3 (Neefs *et al.*, 1990). La comparación de dichas secuencias parciales con las depositadas en las bases de datos se efectuó mediante el programa informático BLASTn, y permitió establecer su afiliación taxonómica más probable.

Los resultados obtenidos en la identificación de la totalidad de las cepas aisladas en presencia de 10 y 500 mg/l de LAS se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Afiliación taxonómica más probable de las cepas aisladas en presencia de 10 y 500mg/l de LAS, basada en la comparación de la secuencia parcial del gen codificante del ARN ribosómico 16S con secuencias depositadas en las bases de datos

Cepa, aislamiento (10 ó 500 mg/l de LAS) y Nº de acceso	Afiliación taxonómica más probable % identidad	Microorganismo descrito con mayor similitud
LAS01 (10 mg/l) AB117953	Gamma- Proteobacteria/Pseudomonadaceae 99,86	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAS02 (10 mg/l) AY138274	Firmicutes/Bacillaceae 99,7	<i>Bacillus cereus</i> cepa 2000031498
LAS03 (10 mg/l) AY138274	Firmicutes/Bacillaceae 98,8	<i>Bacillus cereus</i> cepa 2000031498
LAS04 (10 mg/l) AY315430	Gamma- Proteobacteria/Moraxellaceae 99,4	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa CC-RR1- 52
LAS05 (10 mg/l) AJ012712	Gamma- proteobacteria/Pseudomonadaceae 99,6	<i>Pseudomonas</i> sp. AB131*
LAS06 (10 mg/l) AF270147	Firmicutes/Staphylococcaceae 100	Beta- <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> cepa SR1
LAS07 (10 mg/l) AY302438	Protobacteria/Comamonadaceae 99,9	<i>Delftia tsuhatensis</i> cepa HR4
LAS08 (10 mg/l) AF270147	Firmicutes/Staphylococcaceae 99,4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa SR1
LAS09 (500 mg/l) AB114268	Gamma- Proteobacteria/Enterobacteriaceae 99,5	<i>Enterobacter</i> sp. Cepa B901-2

*esta secuencia figura en la base de datos EMBL como correspondiente a *Pseudomonas boreales*, que no es un nombre taxonómicamente validado.

4.2.4. Árbol filogenético de las cepas aisladas en los ensayos de enriquecimiento

Una vez secuenciadas e identificadas las cepas aisladas en los ensayos de enriquecimiento de las muestras de suelo adicionadas con LAS se procedió a la elaboración de un árbol filogenético (ver Fig. 4.5) a partir de un alineamiento múltiple de las mismas, aplicando el método *Neighbour-Joining*.

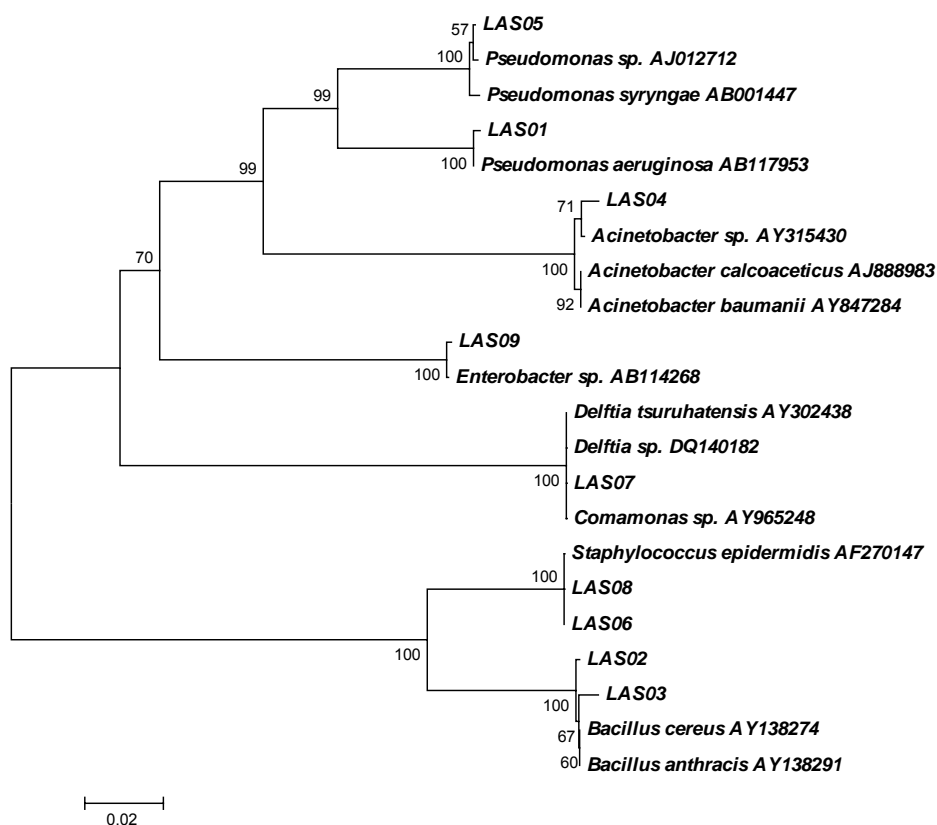


Fig 4.5. Árbol filogenético *Neighbour-Joining* de las cepas estudiadas. La barra indica un 2% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50%

4.2.5. Curvas de crecimiento en medio de dializado de suelo

Se realizaron curvas de crecimiento en medio de dializado de suelo para cada una de las 9 cepas seleccionadas en los distintos ensayos realizados (10 y 500 mg/l de LAS). Estos estudios se llevaron a cabo a 30°C durante 48 horas bajo condiciones de aerobiosis, con agitación de 100 r.p.m. Los experimentos se realizaron tanto en medio de dializado de suelo adicionado de 50 mg/l de LAS como en un medio control de dializado de suelo sin LAS. Los resultados obtenidos se detallan en las Figuras 4.6 a 4.14.

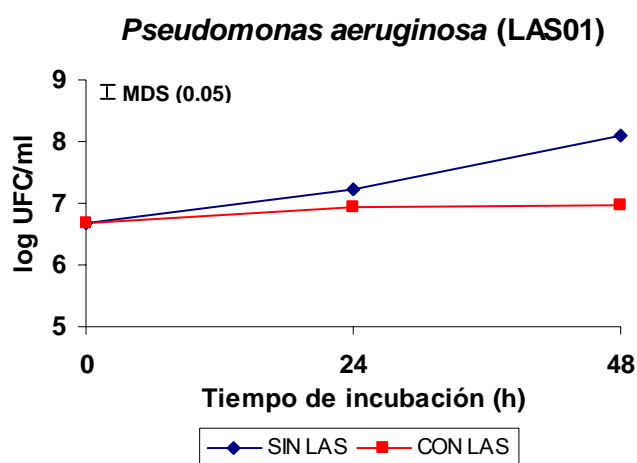


Fig 4.6. Curva de crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* LAS01 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

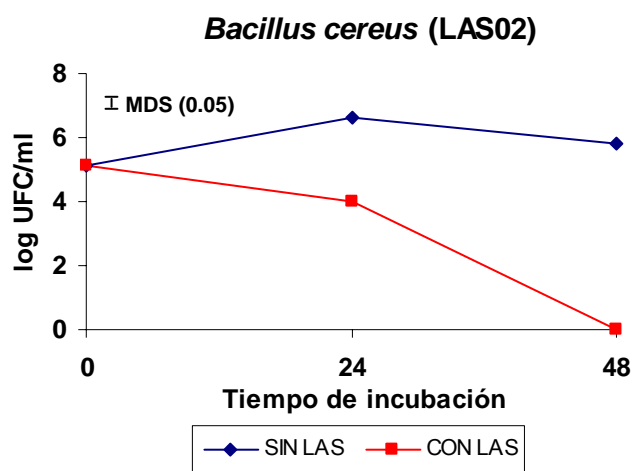


Fig 4.7. Curva de crecimiento de la cepa *Bacillus cereus* LAS02 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS.
MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

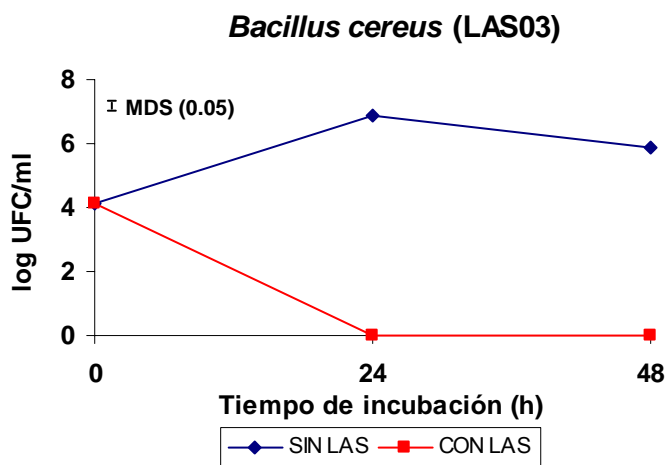


Fig 4.8. Curva de crecimiento de la cepa *Bacillus cereus* LAS03 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS.
MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

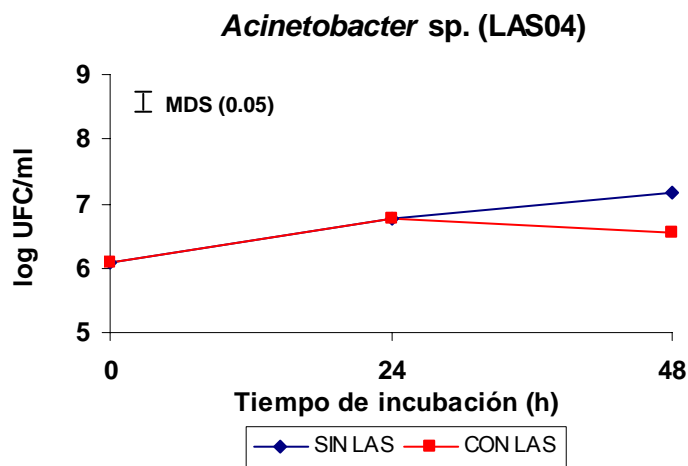


Fig 4.9. Curva de crecimiento de la cepa *Acinetobacter* sp. LAS04 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS.
MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

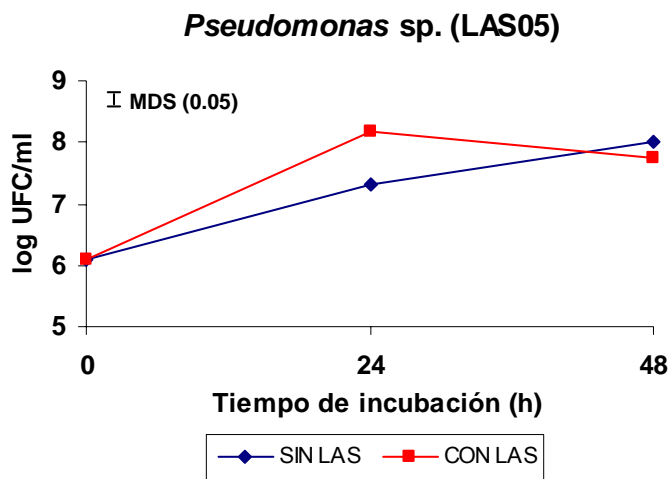


Fig 4.10. Curva de crecimiento de la cepa *Pseudomonas* sp. LAS05 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS.
MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

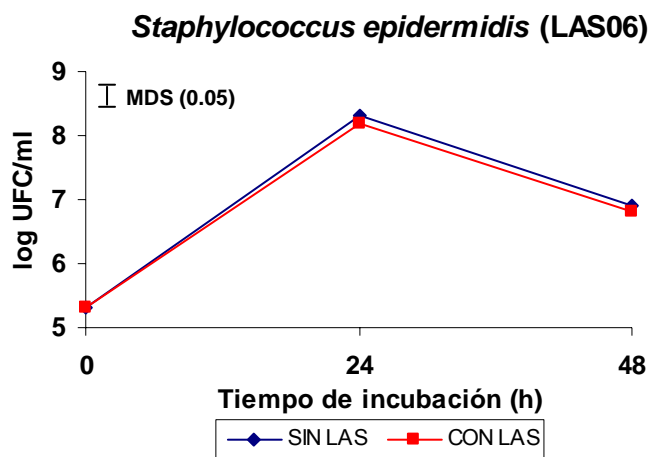


Fig 4.11. Curva de crecimiento de la cepa *Staphylococcus epidermidis* LAS06 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$).

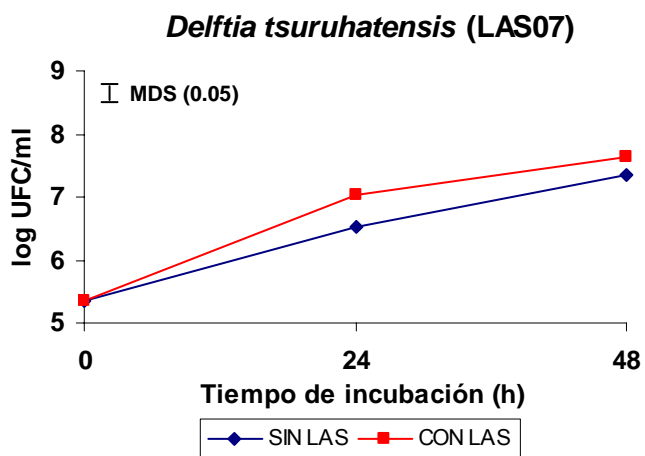


Fig 4.12. Curva de crecimiento de la cepa *Delftia tsuhatensis* LAS07 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$).

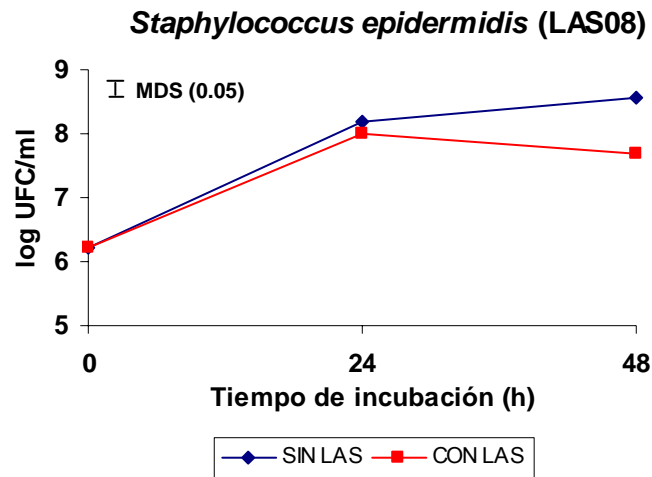


Fig 4.13. Curva de crecimiento de la cepa *Staphylococcus epidermidis* LAS08 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

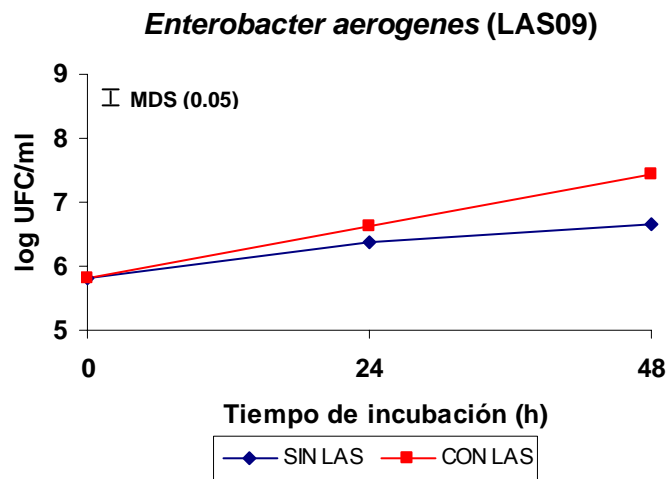


Fig 4.14. Curva de crecimiento de la cepa *Enterobacter aerogenes* LAS09 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos pusieron de manifiesto tres posibles respuestas de las distintas cepas bacterianas frente a la presencia de LAS:

- a) En el caso de las cepas *Acinetobacter* sp. LAS04 y *Staphylococcus epidermidis* LAS06 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento de los cultivos en medios adicionados de 50 mg/l de LAS y el crecimiento de las mismas en medios sin surfactante (considerados como control, Fig. 4.9 y 4.11). Por su parte, la cepa *Staphylococcus epidermidis* LAS08 (Fig. 4.13) presentó un ligero aunque estadísticamente significativo incremento poblacional en ausencia de LAS una vez transcurridas 24 horas de observación. Por lo que podemos concluir que estas cepas no son afectadas (o lo son muy ligeramente) por el surfactante a las concentraciones estudiadas.
- b) Por el contrario, en el caso de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* LAS01 y, sobre todo, las cepas y *Bacillus cereus* LAS02 y *Bacillus cereus* LAS03, la presencia de 50 mg/l de LAS resultó fuertemente tóxica para las poblaciones bacterianas (Fig. 6, 7 y 8).
- c) Por último, las cepas *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuhatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 mostraron un incremento estadísticamente significativo de su crecimiento en presencia de 50 mg/l de LAS, en relación al registrado en el medio control (Fig. 4.10 y 4.12 y 4.14).

4.2.5.1. Crecimiento de *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuruhatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 en medio de dializado de suelo adicionado de 50 mg/l de LAS incubado a 30°C durante 10 días

Al objeto de confirmar el efecto del LAS sobre la microbiota de suelos agrícolas, se diseñó un nuevo experimento utilizando también medios de dializado de suelo (cuya formulación se ha descrito previamente en el Capítulo de Material y Métodos), adicionados de 50 mg/l de LAS e inoculados con las cepas que mostraron el mejor crecimiento en el

mismo medio incubadas durante cortos periodos de tiempo, esto es, las cepas LAS05, LAS07 y LAS09 identificadas como *Pseudomonas* sp., *Delftia tsuharatensis* y *Enterobacter aerogenes*, respectivamente.

Los cultivos (medios de dializado de suelo e inoculados con las cepas seleccionadas) se incubaron con 50 mg/l de LAS, a 30°C en condiciones aeróbicas con agitación de 100 r.p.m. durante un tiempo de 10 días.

La Figura 4.15. representa el crecimiento de *Pseudomonas* sp. LAS05 bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Como se puede comprobar, la presencia de 50 mg/l de LAS en el medio de dializado de suelo incrementó de forma significativa el crecimiento de este microorganismo una vez transcurridas 24 horas de incubación.

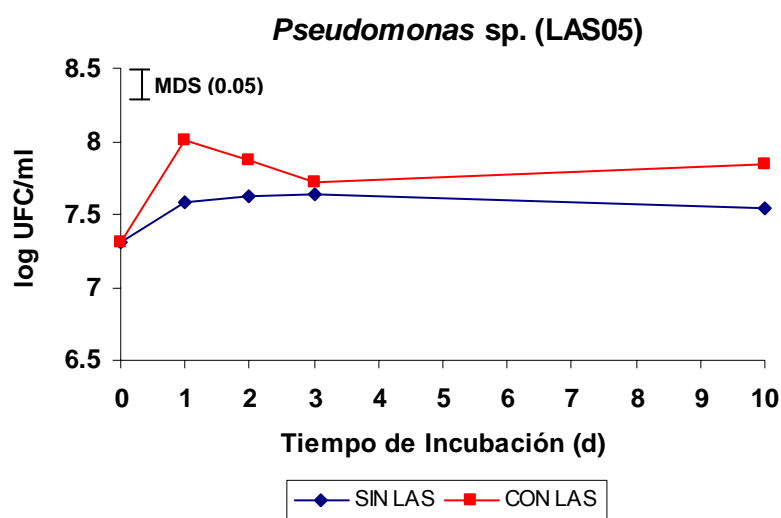


Fig 4.15. Curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp. LAS05 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS.
MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

El crecimiento de *Delftia tsuharatensis* LAS07 bajo las condiciones arriba mencionadas queda descrito en la Figura 4.16. En este caso, la presencia de 50 mg/l de LAS en el medio incrementa significativamente el crecimiento de este microorganismo, tendencia que se mantiene durante todo el tiempo de incubación.

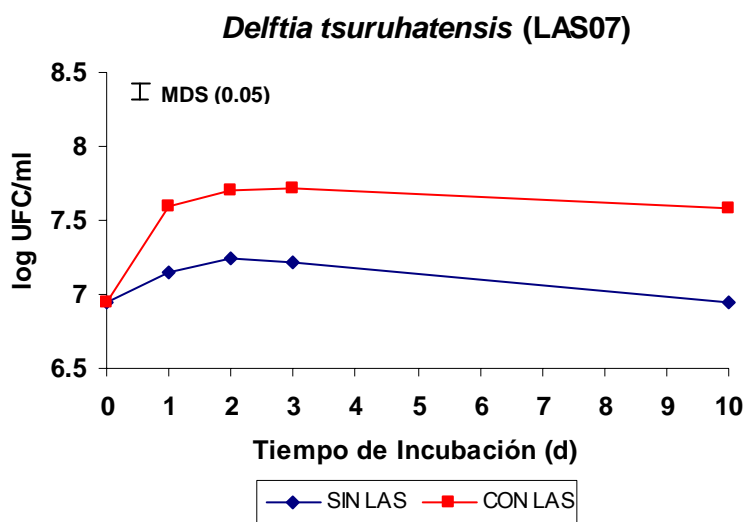


Fig 4.16. Curva de crecimiento de *Delftia tsuhalatensis* LAS07 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Por su parte, la presencia de 50 mg/l de LAS en el medio incrementó ligeramente el crecimiento de *Enterobacter aerogenes* LAS09 tras 48 horas de incubación (Fig. 4.17).

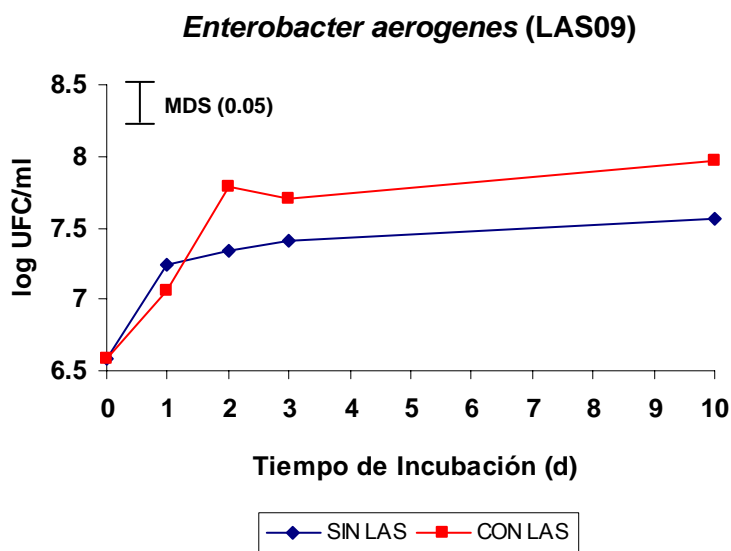


Fig 4.17. Curva de crecimiento de *Enterobacter aerogenes* LAS09 en medio de dializado de suelo, adicionado de 50 mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos confirman que las tres cepas seleccionadas, en especial *Delftia tsuharatensis* LAS07, ven favorecido su crecimiento en medio de dializado de suelo en presencia de 50 mg/l de LAS, en comparación con el medio control carente de LAS.

4.2.5.2. Estudio de biotransformación de LAS por *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09

Para poder comprobar la posible biotransformación de LAS por las cepas de *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09, se llevaron a cabo una serie de experimentos encaminados a la cuantificación de la evolución temporal del tensioactivo en medios de dializado de suelo adicionados con 50 mg/l de LAS e inoculados con cada una de las cepas mencionadas. En estos experimentos se incluyeron distintos controles de manera que permitieran garantizar que una disminución de la concentración de LAS estuviera inequívocamente relacionada con la capacidad biodegradadora por parte de las cepas utilizadas. En este sentido, se demostró que el LAS a concentraciones de 50 mg/l en agua destilada no sufría ninguna modificación en su concentración tras periodos de incubación de 10 días a la temperatura de 30°C y agitación continua a 100 r.p.m. Este control se consideró como control de la degradación “no biológica” del surfactante.

Además del mencionado control, se incluyeron en nuestro estudio medios de dializado inoculados con suspensiones bacterianas muertas por calor, medios de dializado sin inocular y medios de dializado inoculados con suspensiones bacterianas vivas.

En todos los casos, la posible degradación de LAS se estableció en los sobrenadantes de los cultivos mediante la técnica de HPLC, siguiendo la metodología descrita en el Capítulo correspondiente a Material y Métodos. Los resultados de estas experiencias se detallan en las Figuras 4.18, 4.19 y 4.20.

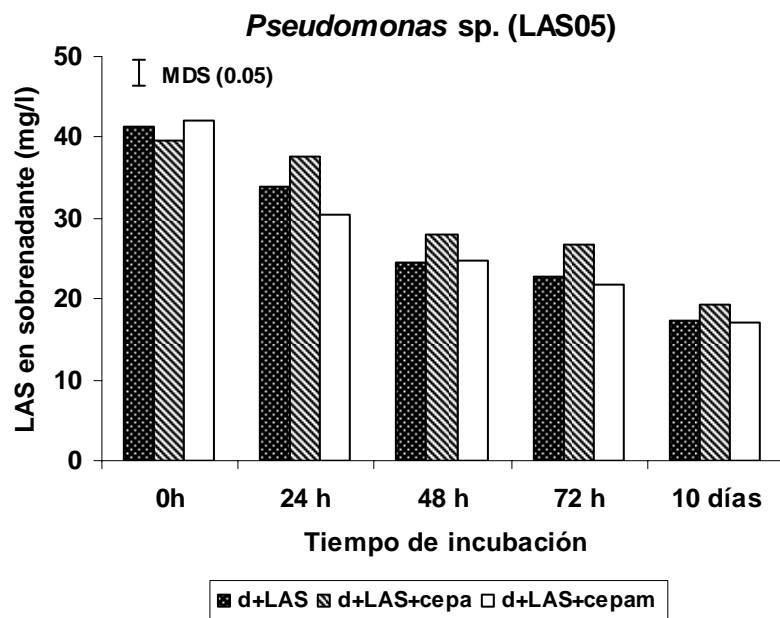


Fig 4.18. Concentración de LAS (mg/l) detectada en medios de dializado de suelo inoculados con *Pseudomonas* sp. LAS05 (barra bgris), *Pseudomonas* sp. LAS05 muerta por calor (barra blanca) y en medio sin inocular (barra negra). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

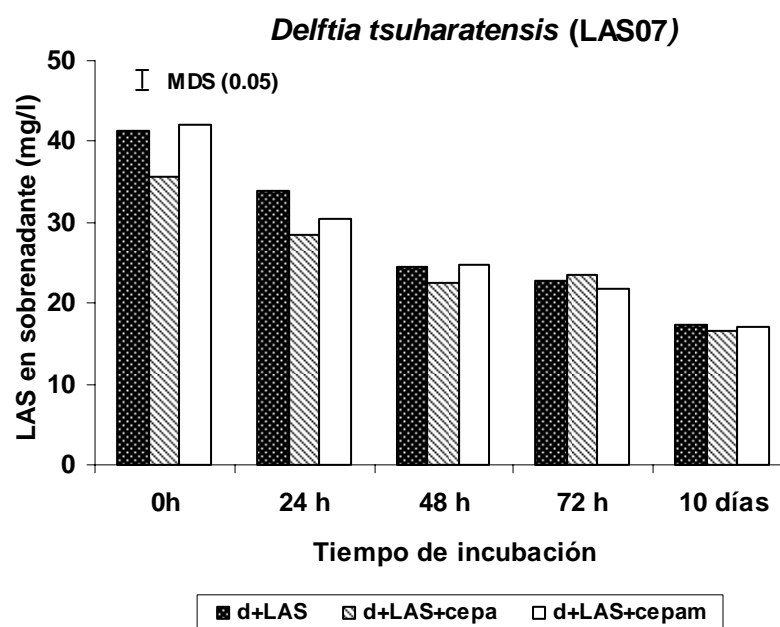


Fig 4.19. Concentración de LAS (mg/l) detectada en medios de dializado de suelo inoculados con *Delftia tsuhatensis* LAS07 (barra gris), *Delftia tsuhatensis* LAS07 muerta por calor (barra blanca) y en medio sin inocular (barra negra). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

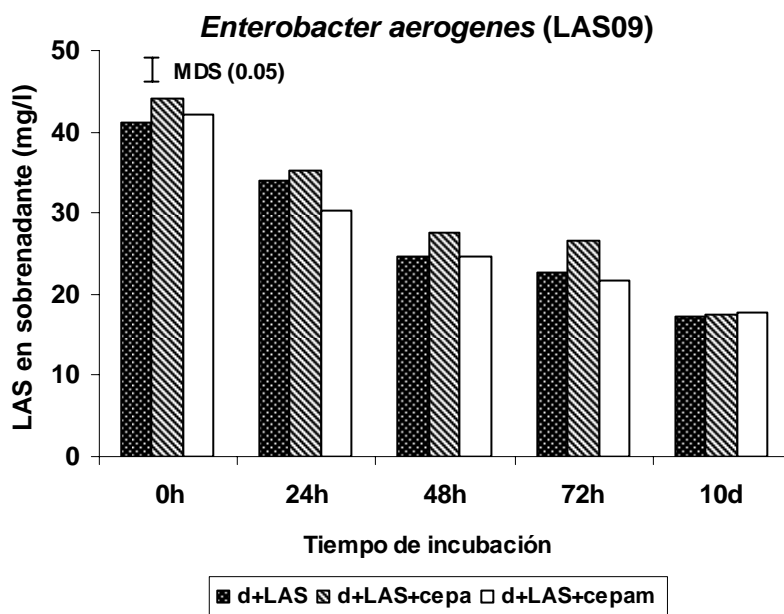


Fig 4.20. Concentración de *LAS* (mg/l) detectada en medios de dializado de suelo inoculados con *Enterobacter aerogenes* LAS09 (barra gris), *Enterobacter aerogenes* LAS09 muerta por calor (barra blanca) y en medio sin inocular (barra negra). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos en estas experiencias (Figura 4.18, 4.19 y 4.20) demuestran que la concentración de *LAS* en los medios de cultivo disminuye en función del tiempo con independencia del crecimiento bacteriano, su viabilidad o la presencia de células en los sistemas. Así, tras diez días de incubación, la concentración de *LAS* en la experiencias con *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 alcanza valores próximos a los 20 mg/l. Sin embargo, resultados análogos se obtienen en sistemas controles tanto inoculados con células muertas como no inoculados. Ello parece indicar, en consonancia con todos los resultados hasta ahora expuestos, que la disminución de *LAS* en los medios de dializado de suelo no resulta consecuencia directa de la actividad biológica de las cepas ensayadas ni de procesos de bioeliminación pasiva de las células bacterianas. Podríamos sugerir, desde un enfoque meramente físico, que la disminución en la concentración de *LAS* podría estar relacionada con un proceso de adsorción que puede tener su origen en la propia presencia de suelo contenido en las membranas de diálisis.

No obstante, parece contradictorio que *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09, pese a no degradar LAS, se estimulen en su crecimiento con la presencia de este tensioactivo tal y como se ha expuesto en el apartado 4.2.5.1. Es por ello que, para poder explicar este interesante efecto, hemos estudiado el posible impacto de la presencia de LAS sobre la disponibilidad de nutrientes en los medios de dializado de suelo. Estos experimentos se describen en detalle en los siguientes apartados.

4.2.6. Efecto de la adición de LAS sobre la disponibilidad de nutrientes en los medios de dializado de suelo

Tras observar un incremento en el crecimiento de los microorganismos *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07, *Enterobacter aerogenes* LAS09 en el medio de dializado de suelo en presencia de 50 mg/l LAS, y comprobar que el crecimiento de las cepas no se debía a la utilización de LAS como fuente de carbono, se procedió a la determinación de nutrientes en el medio de dializado de suelo (en presencia y en ausencia de LAS) con el objeto de poder determinar el motivo del crecimiento de las cepas.

4.2.6.1. Determinación de nitrógeno total

Para poder establecer si la adición del surfactante a la concentración de 50 mg/l ejerce algún efecto sobre la concentración de compuestos nitrogenados en los medios de cultivo utilizados en nuestras experiencias, se incubaron medios de dializado de suelo adicionado de LAS a temperatura de 30°C y agitación de 100 r.p.m. durante 72h. Transcurridas 24, 48 y 72 h de incubación se determinó la concentración de nitrógeno total indicándose dichos resultados en la Figura 4.21. Medios de dializado de suelo sin inocular fueron utilizados como controles.

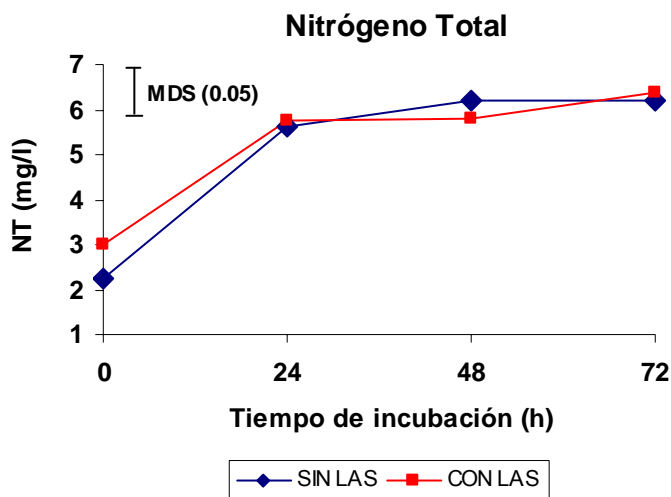


Fig 4.21. Concentración de nitrógeno total en medio de dializado de suelo, adicionado con 50 mg/l de *LAS* o sin *LAS*. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos indican que la presencia de *LAS* en los medios de dializado de suelo no determina un incremento significativo en la concentración de compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos disponibles para los microorganismos, lo cual sugiere que estas sustancias tensioactivas no provocan cambios significativos en relación a este tipo de nutrientes.

4.2.6.2. Determinación de fosfatos

Al igual que en el caso de la determinación de la concentración total de nitrógeno, la determinación de la concentración total de fosfatos se realizó en medios de dializado de suelo adicionados de 50 mg/l y en medios control sin adicionar *LAS*. Los resultados de estas experiencias se muestran en la Figura 4.22.

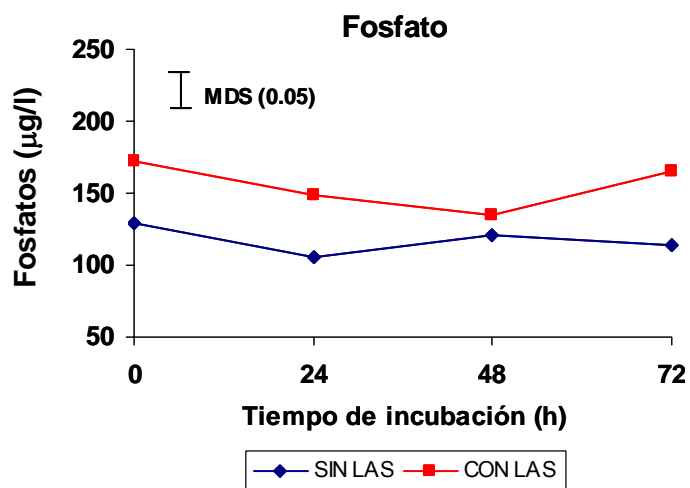


Fig 4.22. Concentración de fosfatos en medios de dializado de suelo, suplementado con 50 mg/l de LAS o sin LAS. MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Los datos mostrados en la Figura 4.22 revelan un incremento ligero pero significativo en la concentración de fosfatos en los medios de dializado de suelo como consecuencia de la adición de 50 mg/l de LAS. Este hecho podría posibilitar una mayor disponibilidad de fosfatos para aquellos microorganismos que, como los aislados en nuestro estudio, son capaces de tolerar altas concentraciones del compuesto tensioactivo.

4.3 ESTUDIOS DE BIOTRANSFORMACIÓN E IMPACTO DEL LAS MEDIANTE EL EMPLEO DE MICROCOSMOS EDÁFICOS

En este apartado se muestran los distintos resultados derivados del empleo de microcosmos edáficos controlados para el estudio de los procesos de biotransformación e impacto del *LAS* sobre la microbiota edáfica presente en el suelo.

Tal y como se indicó en el apartado de Material y Métodos fueron diseñados tres tipos de microcosmos edáficos: Un microcosmos autoclavado (A) a través del cual se hizo pasar agua adicionada de las concentraciones de *LAS* estudiadas (10 y 50 mg/l), un microcosmos no esterilizado (B), a través del cual se hizo pasar agua adicionada de las distintas concentraciones de *LAS* estudiadas (10 y 50 mg/l) y un microcosmos no esterilizado (C), a través del cual se hizo pasar agua sin *LAS* (control).

Sobre cada uno de los microcosmos edáficos diseñados (A, B y C) se llevaron a cabo una serie de ensayos encaminados a determinar:

- 1) El tiempo necesario de tratamiento de los microcosmos con el influente adicionado de *LAS* para detectar la presencia del mismo en el efluente de salida.
- 2) La evolución de la concentración de *LAS* en los microcosmos a lo largo del periodo de estudio.
- 3) Los patrones espacio-temporales característicos de la microbiota cultivable presente en el suelo de estudio, las actividades enzimáticas y los perfiles de biodiversidad microbiana generados mediante técnicas independientes del cultivo

Para dar cumplimiento a los objetivos 2) y 3) se establecieron tiempos de apertura secuenciales de los microcosmos en base a los resultados obtenidos en el ensayo 1).

4.3.1 Ensayo 1. Determinación del tiempo necesario de tratamiento de los microcosmos con el influente adicionado de LAS para detectar la presencia del mismo en el efluente de salida

En este ensayo se cuantificó el tiempo de tratamiento de los distintos microcosmos edáficos necesario para poder detectar la presencia de LAS en el efluente de salida. El experimento completo se llevó a cabo bajo dos concentraciones de LAS distintas adicionadas en el influente: 10 mg/l y 50 mg/l.

Como ya quedó expuesto en el apartado de Material y Métodos, en el caso del ensayo realizado con 10 mg/l de LAS fueron necesarios 21 días de funcionamiento para detectar la presencia del xenobiótico (homólogo C10) en el efluente de salida del microcosmos esterilizado (A). Por otra parte, este periodo resultó insuficiente para detectar LAS en los efluentes de los microcosmos B y C. En el caso del ensayo con 50 mg/l de LAS, transcurridos 7 días se detectó LAS (homólogo C10) por vez primera en el microcosmos estéril (A). Al igual que sucediera en el ensayo con 10 mg/l de LAS, en todo este periodo no fue detectada su salida desde los microcosmos B y C. La Figura 4.23 muestra un cromatograma correspondiente a la salida del primer homólogo del LAS (C10) en el efluente de los microcosmos A (10 y 50 mg/l de LAS).

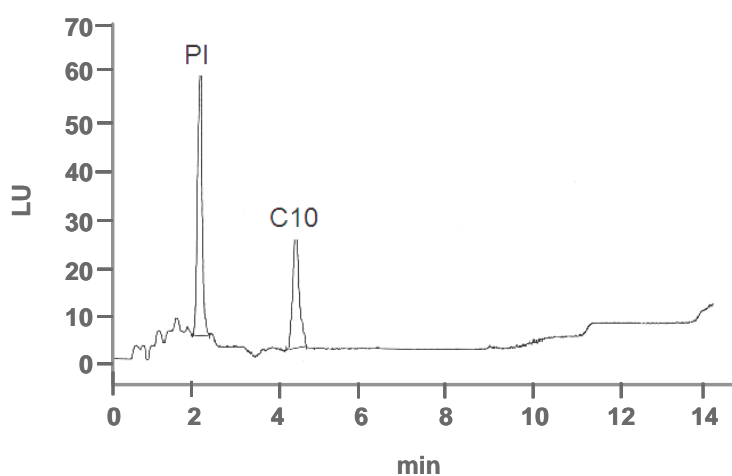


Fig 4.23. Cromatograma correspondiente a la salida del primer homólogo del LAS (C10) en el efluente de los microcosmos A.

4.3.2. Ensayo 2. Evolución de la concentración de LAS en los microcosmos a lo largo del periodo de estudio

Una vez extraídas las muestras de suelo contenidas en las columnas de vidrio (dos muestras por columna, correspondientes a la zona superior, ZS, y zona inferior, ZI) se procedió a la cuantificación mediante HPLC de la concentración de LAS presente en cada una de ellas a lo largo del periodo de estudio (ver Material y Métodos para más detalle sobre el procedimiento utilizado).

En las Figuras 4.24 y 4.25 se representa la evolución de la concentración de LAS en cada una de las muestras de suelo correspondientes a los microcosmos A y B bajo la influencia de influentes de 10 mg/l y 50 mg/l de LAS, respectivamente.

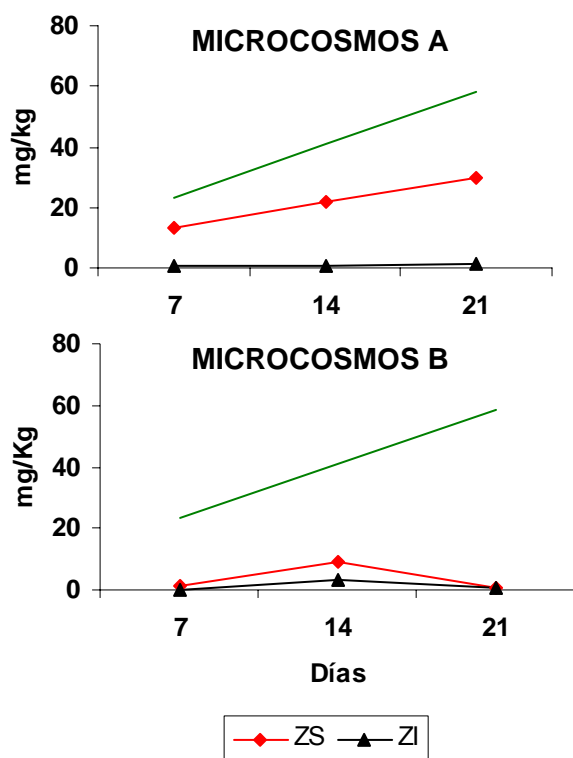


Fig 4.24. Concentraciones de LAS detectadas en la zona superior (ZS) e inferior (ZI) en los microcosmos A y B tratados con un influente adicionado de 10 mg/l de LAS. La línea verde indica el LAS adicionado (mg/kg suelo) durante el tiempo completo de tratamiento.

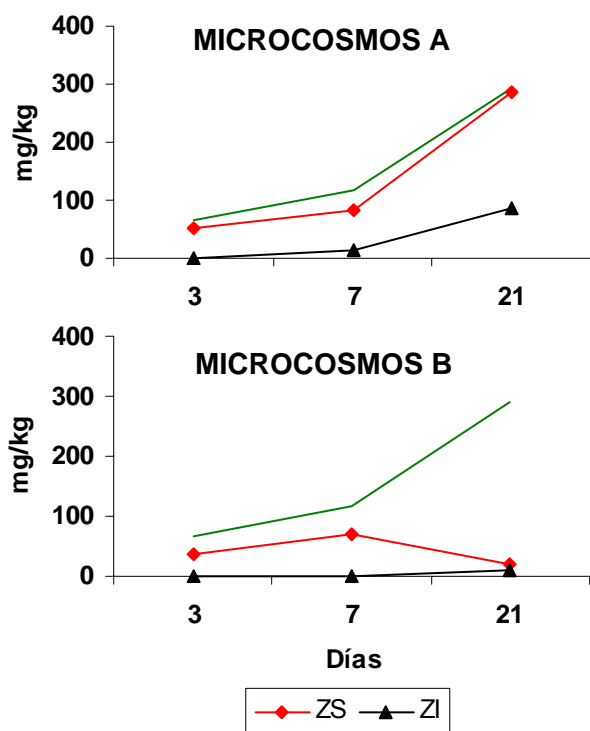


Fig 4.25. Concentraciones de *LAS* detectadas en la zona superior (ZS) e inferior (ZI) en los microcosmos A y B tratados con un influente adicionado de 50 mg/l de *LAS*. La línea verde indica el *LAS* adicionado (mg/kg suelo) durante el tiempo completo de tratamiento.

En ambos ensayos se apreció una tendencia temporal diferenciada en las concentraciones de *LAS* de los microcosmos autoclavados (A) y aquellos sin autoclavar (B). Bajo condiciones abióticas, el surfactante se acumuló de forma progresiva en el suelo, de forma notablemente más intensa en las capas superiores. Por el contrario, en los microcosmos tipo B se registró una disminución progresiva de la concentración de *LAS*, también más acusada en la zona superior del suelo.

4.3.3. Estudio de la microbiota cultivable, actividad enzimática y perfiles de biodiversidad en microcosmos experimentales

El siguiente paso en nuestra investigación consistió en el análisis de la evolución temporal de la microbiota cultivable, de las actividades enzimáticas y los perfiles de biodiversidad microbiana generados mediante técnicas independientes del cultivo.

Las muestras de suelo estudiadas procedían de la zona superior (ZS) e inferior (ZI) de los microcosmos edáficos B y C, y los muestreos se realizaron transcurridos 7, 14 y 21 días desde el inicio del ensayo con 10 mg/l de LAS y a los 3, 7 y 21 días en el caso del ensayo con 50 mg/l de LAS.

4.3.3.1. Recuento de microorganismos cultivables

Con el objetivo de poder establecer el efecto del LAS sobre el crecimiento de la microbiota cultivable (microorganismos heterótrofos aerobios mesófilos) en las muestras de suelo de los microcosmos se realizaron recuentos en placa en dos medios de cultivo diferentes: TSA diluido al 10% y en medio de Burk's con NH_4^+ .

Previamente, se llevó a cabo el recuento de microorganismos cultivables una vez recolectado el suelo problema de la parcela experimental y previamente a su introducción en las columnas de vidrio. Estos datos fueron considerados como el "tiempo 0 (T0)" común a los dos ensayos.

4.3.3.1.1. Recuento de microorganismos cultivables bajo el efecto de un influente adicionado de 10 mg/l de LAS

Seguidamente, se muestra el recuento de microorganismos cultivables (expresado como logaritmo del número de unidades formadoras de colonias /g de suelo seco, log UFC/g) correspondiente a las muestras de suelo de la zona superior e inferior de los microcosmos B y C, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 10 mg/l de LAS.

En los recuentos realizados en medio TSA (10%) (Fig. 4.26) se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos (con LAS y sin LAS) en la zona superior del microcosmos una vez transcurridos 14 días de tratamiento. Por el contrario, la presencia del surfactante no indujo ningún cambio de la microbiota en la zona inferior de la columna edáfica.

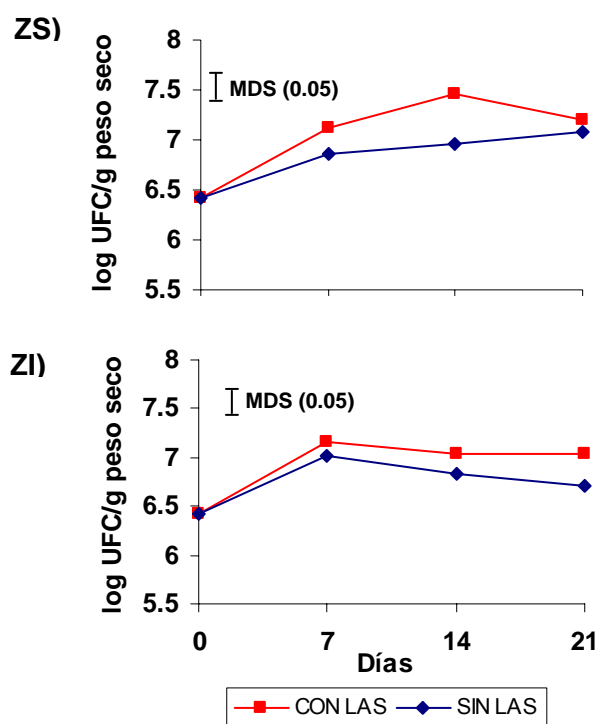


Fig 4.26. Recuento (log UFC/g suelo) de microorganismos cultivables en medio TSA (10%) correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 10 mg/l de LAS en zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos en el medio de Burk's (Fig. 4.27) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la zona superior e inferior del microcosmos transcurridos los tiempos de tratamiento.

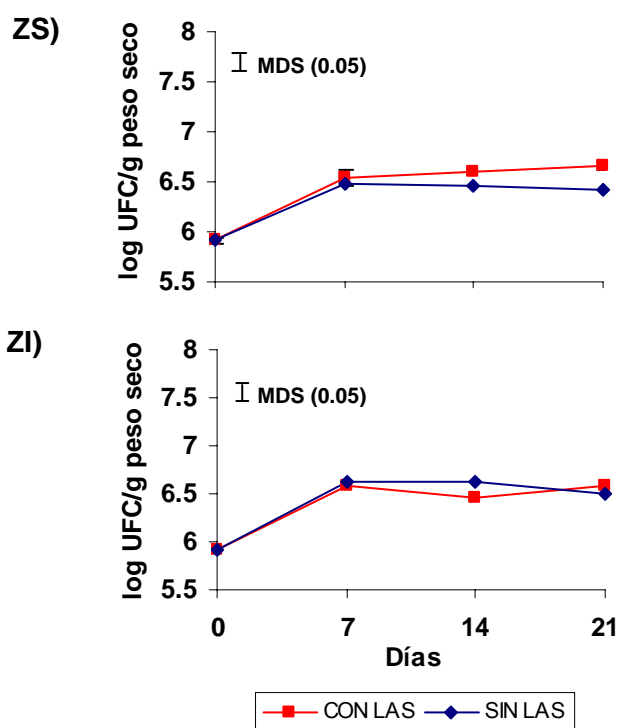


Fig 4.27. Recuento (log UFC/g suelo) de microorganismos cultivables en medio de Burk's correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 10 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

4.3.3.1.2. Recuento de microorganismos cultivables bajo el efecto de un influente adicionado de 50 mg/l de LAS

Con el objetivo de evaluar el impacto de una concentración superior de LAS sobre la microbiota edáfica, se repitió el ensayo previamente descrito utilizando en este caso, un influente adicionado de una mayor concentración LAS (50 mg/l). Bajo estas condiciones, la evolución del recuento de microorganismos cultivables en medio TSA diluido al 10% en la zona superior e inferior de los microcosmos B y C se muestra en la Figura 4.28.

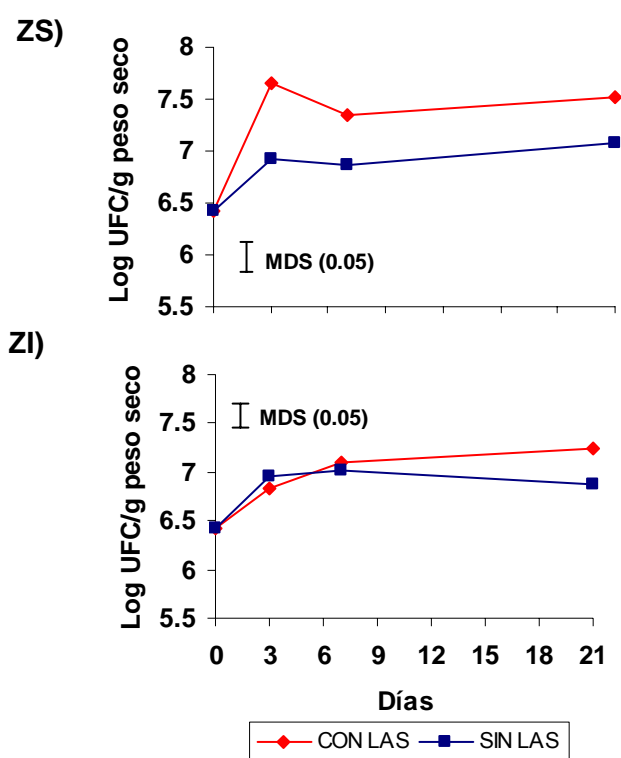


Fig 4.28. Recuento (log UFC/g peso seco) de microorganismos cultivables en medio TSA (10%) correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 50 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

En este ensayo, las diferencias entre tratamientos resultaron más marcadas que en el anterior, especialmente en la zona superior de la columna, donde resultaron estadísticamente significativas desde el tercer día de observación. Este efecto fue más suave en la zona inferior del microcosmos, donde se alcanzaron ligeras diferencias significativas entre tratamientos a partir del décimo octavo día de estudio. Además, se

aprecia un incremento en el número de microorganismos cultivables respecto al ensayo realizado con 10 mg/l de LAS, especialmente relevante en la zona superior del microcosmos.

Por último, se analizó la evolución los microorganismos cultivables en medio de Burk's en los microcosmos B y C adicionados de 50 mg/l de LAS. (Fig. 4.29).

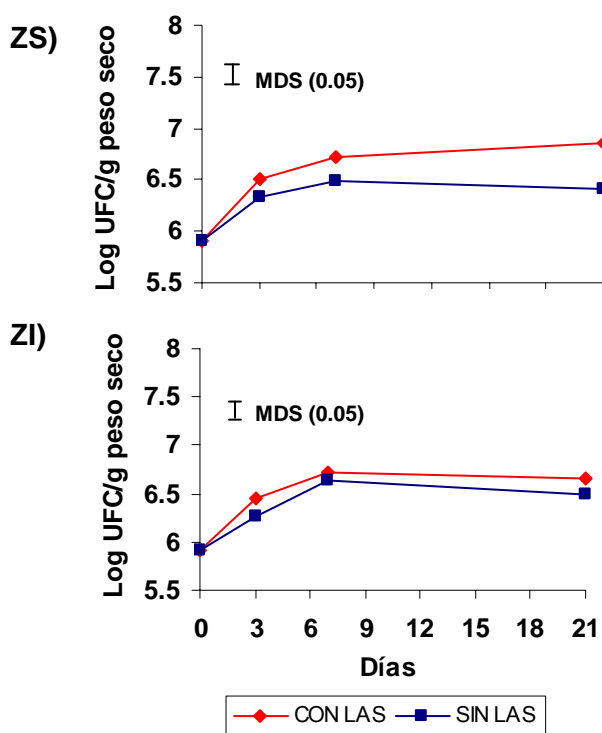


Fig 4.29. Recuento (log UFC/g suelo) de microorganismos cultivables en medio de Burk's correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 50 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Al igual que ocurriera en el ensayo con 10 mg/l de LAS, las diferencias encontradas entre los recuentos microbianos en medio Burk's correspondientes a los tratamientos con LAS y sin LAS fueron inferiores a las registradas cuando se utilizaba TSA (10%) como medio de cultivo.

Igualmente, las diferencias entre tratamientos fueron más importantes en la zona superior del microcosmos que en la inferior, donde no llegaron a ser estadísticamente significativas. Además, se necesitó un tiempo mayor de observación (7-9 días) para detectar estas diferencias en la zona superior.

Como ya revelaron los recuentos en medio TSA (10%), el recuento de microorganismos cultivables en medio Burk's correspondiente al microcosmos sometido a un influente de 50 mg/l de LAS fue superior a la registrada durante el ensayo con 10 mg/l de LAS.

4.3.3.2. Actividades enzimáticas en las muestras de suelo contenidas en los microcosmos

A continuación se detallan los resultados obtenidos tras analizar el efecto de las distintas concentraciones de LAS aplicadas a los microcosmos (10 mg/l y 50 mg/l) sobre las actividades enzimáticas del suelo (fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, arilsulfatasa y deshidrogenasa).

Como paso previo a la ejecución de estos ensayos, se llevó a cabo la determinación de estas actividades una vez recolectado el suelo problema de la parcela experimental y previamente a su introducción en las columnas de vidrio. Estos datos fueron considerados como el "tiempo 0 (T0)" común a los dos ensayos.

Como norma general, las actividades enzimáticas medidas siguieron una evolución espacio-temporal paralela al recuento de microorganismos cultivables descrito en el apartado anterior, con máximas actividades registradas coincidiendo con la detección de los números más altos de microorganismos viables en el suelo tratado y siempre mayores en las capas superficiales de los microcosmos respecto a las más profundas. Sin embargo, en el caso de la actividad enzimática deshidrogenasa se encontró un patrón de evolución opuesto al del recuento de microorganismos cultivables, y las diferencias entre tratamientos no resultaron estadísticamente significativas.

4. Resultados

4.3.3.2.1. Determinación de actividades enzimáticas bajo el efecto de un influente adicionado de 10 mg/l de LAS

Bajo el efecto de un influente adicionado de 10 mg/l de LAS la actividad enzimática fosfatasa ácida (Fig. 4.30) presentó un patrón similar (correlacionado) al del recuento de microorganismos, con máximos valores registrados a los 14 días de observación, más elevados en la zona superior del microcosmos que en la inferior. No obstante, por lo general las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los momentos de estudio.

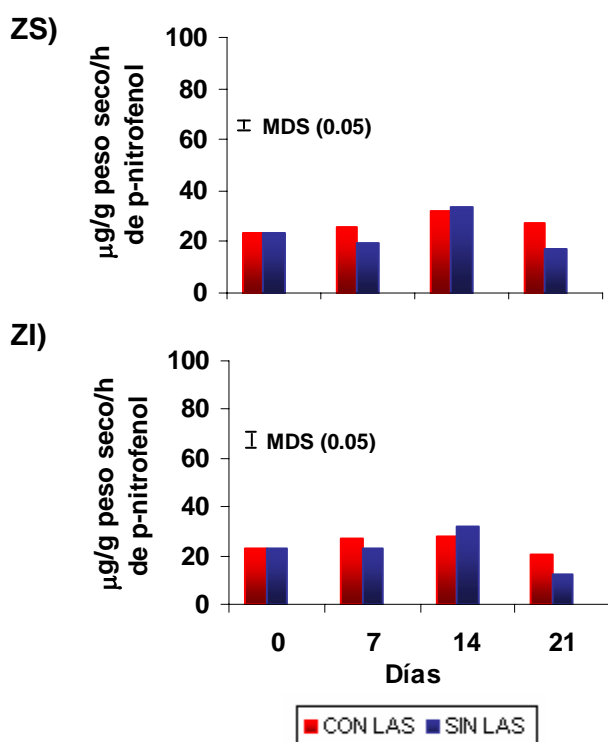


Fig 4.30. Determinación de la actividad enzimática fosfatasa ácida correspondientes correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 10 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

En el caso de la actividad enzimática fosfatasa alcalina (Fig. 4.31) tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con *LAS* y sin *LAS*. La evolución espacio-temporal de esta actividad en la columna de suelo se ajustó ligeramente al patrón del recuento de microorganismos cultivables.

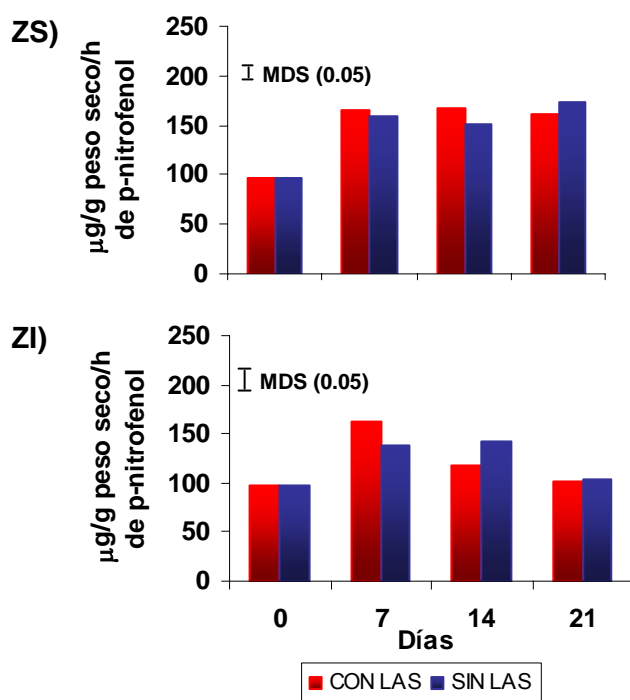


Fig 4.31. Determinación de la actividad enzimática fosfatasa alcalina correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 10 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

4. Resultados

Por el contrario, la actividad enzimática arilsulfatasa (Fig. 4.32) mostró diferencias más acusadas entre los distintos tratamientos. Así, los valores de esta actividad fueron superiores en el microcosmos afectado por la entrada de LAS desde el día 7 de observación en la zona superior y desde el 14 en la inferior. Una vez más, el patrón de evolución espacial y temporal de esta actividad enzimática fue paralelo y sincrónico al del recuento de microorganismos cultivables.

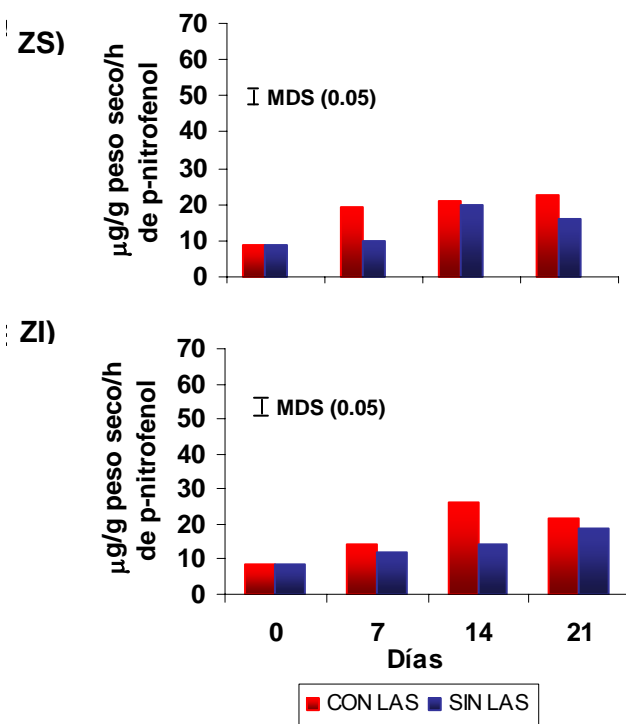


Fig. 4.32. Determinación de la actividad enzimática arilsulfatasa correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 10 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Finalmente, los valores correspondientes a la actividad enzimática deshidrogenasa (Fig. 4.33) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos y su patrón de evolución espacio-temporal resultó inverso a la evolución de los recuentos de microorganismos cultivables.

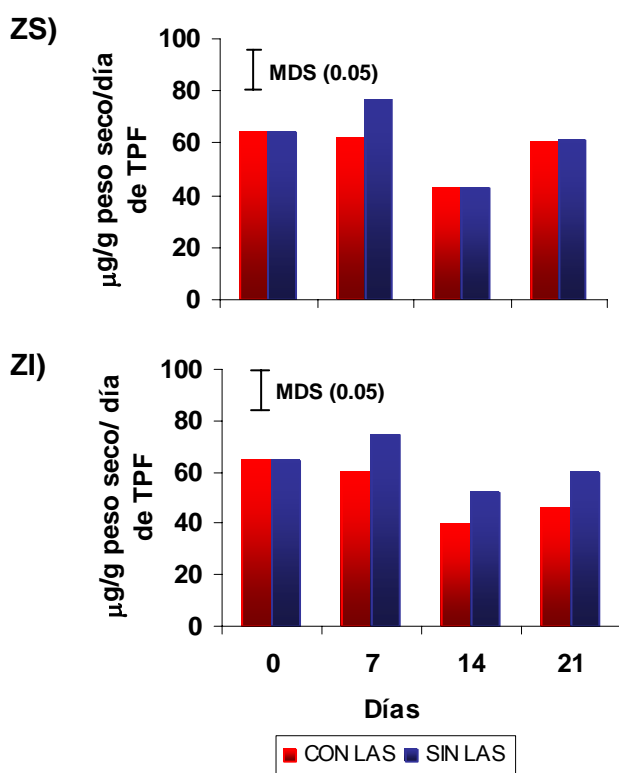


Fig 4.33. Determinación de la actividad enzimática deshidrogenasa correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 10 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS); e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

4.3.3.2.2. *Determinación de actividades enzimáticas bajo el efecto de un influente adicionado de 50 mg/l de LAS*

Como norma general, los valores de las actividades enzimáticas registradas en el ensayo con 50 mg/l de *LAS* fueron siempre superiores a los correspondientes al ensayo con 10 mg/l. Además, la evolución espacial y temporal de las distintas actividades medidas se caracterizó por un patrón más elevado respecto a aquellos descritos para el tratamiento con 10 mg/l de *LAS*. De esta manera, se encontraron máximos de actividad enzimática más tempranos e intensos y los valores en las capas profundas aumentaron de forma considerable.

Por otra parte, las diferencias entre tratamientos fueron siempre más marcadas y estadísticamente significativas en este nuevo ensayo, registrándose los mayores valores de actividad bajo el efecto del influente adicionado de *LAS*. La actividad enzimática deshidrogenasa constituyó la única excepción a este patrón general. La actividad fosfatasa ácida (Fig. 4.34) fue significativamente superior en los microcosmos afectados por *LAS* y se caracterizó por una evolución sincrónica al del recuento de microorganismos cultivables (ver Fig. 4.28), con un importante máximo en el día 3 de observación. El patrón fue similar en la zona superficial y en la profunda del microcosmos, aunque en esta última los valores fueran más reducidos y las diferencias menores.

Por el contrario, la actividad enzimática fosfatasa alcalina mostró diferencias entre tratamientos menos marcadas que en el caso de la actividad fosfatasa ácida y generalmente no fueron estadísticamente significativas (Fig. 4.35).

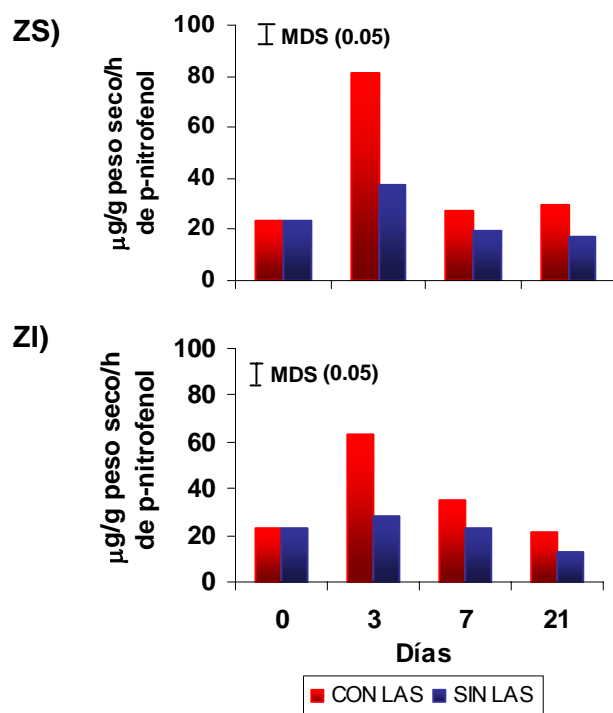


Fig 4.34. Determinación de la actividad enzimática fosfatasa ácida correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 50 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

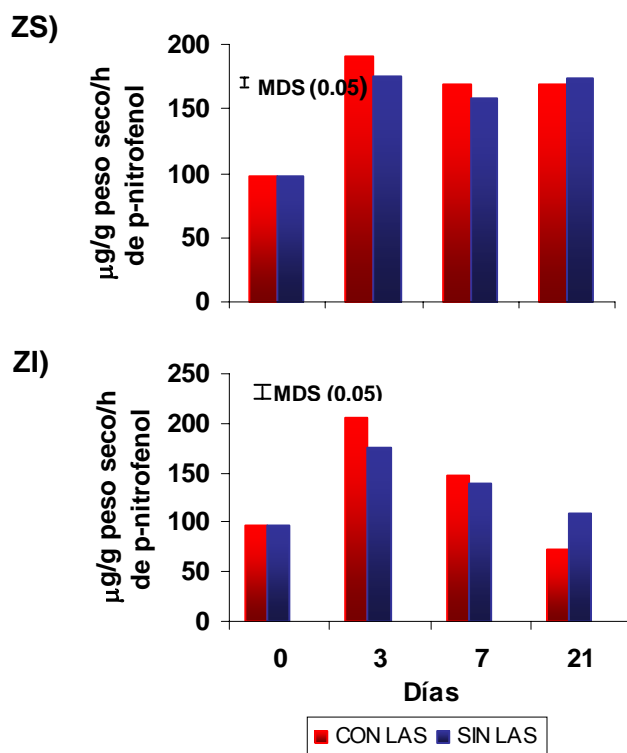
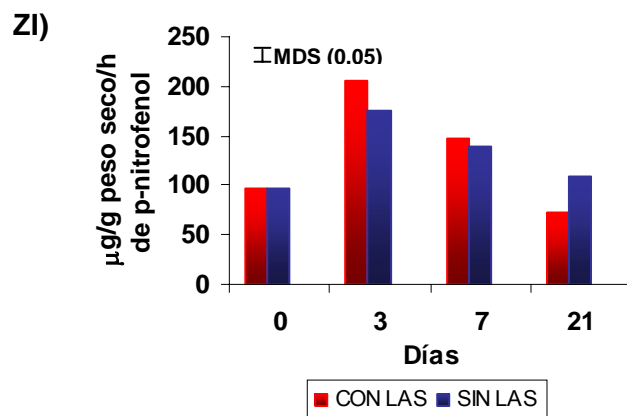


Fig 4.35. Determinación de la actividad enzimática fosfatasa alcalina correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 50 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)



Por su parte, la actividad enzimática arilsulfatasa (Fig. 4.36) presentó importantes diferencias entre tratamientos. El máximo valor de esta actividad se registró durante el tercer día de observación y en la zona superficial de la columna, de forma similar a la evolución espacial y temporal descrita para el recuento de microorganismos cultivables durante este mismo ensayo.

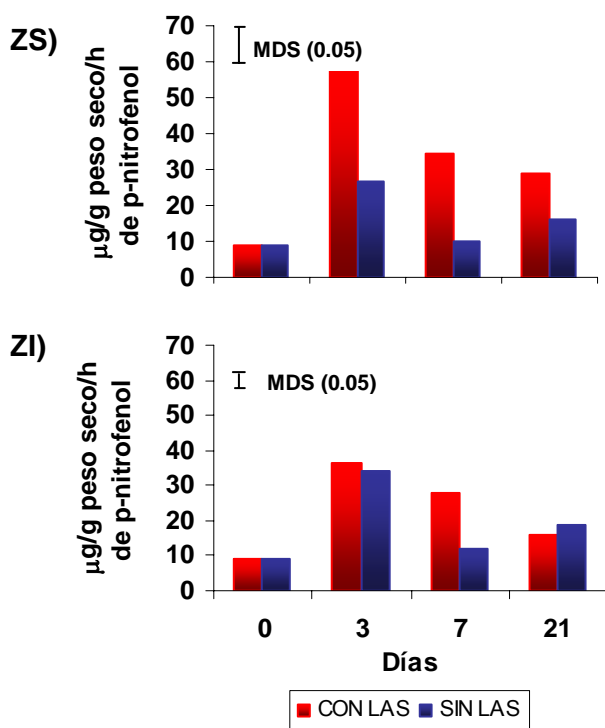


Fig 4.36. Determinación de la actividad enzimática arilsulfatasa correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 50 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Mínima Diferencia Significativa ($p < 0.05$)

Por último, una vez más la actividad enzimática deshidrogenasa se caracterizó por un patrón de evolución espacio-temporal ligeramente opuesto al de los recuentos de microorganismos cultivables. Las diferencias encontradas entre los valores de la actividad deshidrogenasa para los distintos tratamientos a lo largo del tiempo de estudio no fueron estadísticamente significativas (Fig. 4.37).

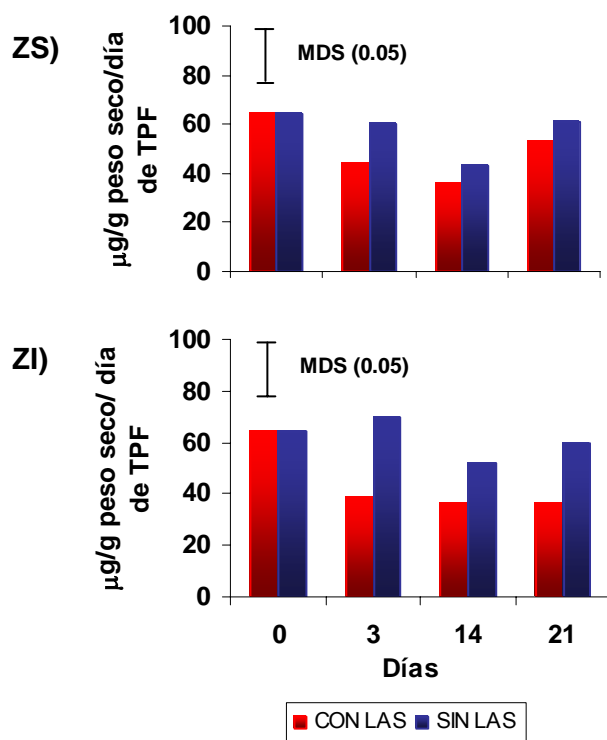


Fig 4.37. Determinación de la actividad enzimática deshidrogenasa correspondientes a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos C (sin LAS) y B, bajo el efecto de un influente constante adicionado de 50 mg/l de LAS, en la zona superior (ZS) e inferior (ZI). MDS (0.05)= Distancia mínima estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

4.3.3.2.3. Análisis estadístico de correlación lineal entre los recuentos de microorganismos cultivables y las actividad enzimáticas en los distintos ensayos realizados

Finalmente, con el objetivo de sintetizar la información expuesta y de validar estadísticamente para cada tratamiento las relaciones encontradas entre los recuentos de microorganismos cultivables (tanto en medio TSA 10% como en medio de Burk's) y los valores correspondientes a las diferentes actividades enzimáticas, se llevó a cabo un análisis de correlación lineal, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.5. Como se desprende de esta información, existe una relación positiva y estadísticamente significativa entre la número de microorganismos cultivables y las actividades enzimáticas fosfatasa y arilsulfatasa, tanto en los tratamientos con influentes de 10 mg/l de LAS como de 50 mg/l de LAS. Estas correlaciones mostraron siempre mayores valores del coeficiente de correlación de Pearson en la zona superior de los microcosmos edáficos que en la inferior. Por su parte, la correlación entre los recuentos de bacterias cultivables en medio TSA (10%) y la actividad

4. Resultados

deshidrogenasa en presencia de LAS (en los dos ensayos realizados) fue negativa y estadísticamente significativa. De igual manera, la correlación entre los recuentos en medio de Burk's y la actividad deshidrogenasa fue negativa, aunque no significativa a $p < 0.05$. Por último, cabe destacar que en los microcosmos control sin LAS (tipo C) la densidad de microorganismos tan sólo se relacionó de forma positiva y estadísticamente significativa con la actividad fosfatasa (principalmente alcalina) y, eventualmente, con la actividad arilsulfatasa.

Tabla 4.5. Matriz de coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los recuentos de microorganismos cultivables (cifras color negro: medio TSA (10%); cifras color rojo: medio de Burk's) y las distintas actividades enzimáticas estudiadas (* $p < 0.05$).

Ensayo	UFC (Microcosmos, Zona)	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina	Arilsulfatasa	Deshidrogenasa
10 mg/l LAS	B, ZS	0.82*	0.94*	0.89*	-0.84*
		0.63*	0.96*	0.94*	-0.66*
	C, ZS	-0.39	0.93*	0.70*	-0.54
		0.02	0.90*	0.55	-0.46
	B, ZI	0.27	0.61*	0.63*	-0.73*
		0.15	0.52	0.63*	-0.71*
	C, ZI	0.18	0.75*	0.27	-0.18
		0.13	0.74*	0.53	-0.55
50 mg/l LAS	B, ZS	0.58*	0.97*	0.84*	-0.59*
		0.10	0.82*	0.56*	-0.49
	C, ZS	0.05	0.83*	0.54	-0.18
		-0.14	0.86*	0.25	-0.54
	B, ZI	0.58*	0.75*	0.75*	-0.27
		0.62*	0.78*	0.76*	-0.23
	C, ZI	-0.06	0.65*	0.45	-0.31
		-0.29	0.30	0.10	-0.49

4.3.3.2.4. Determinación de fosfatos en el efluente de salida de los microcosmos edáficos

Como análisis complementario, y con el objetivo de explorar la posible acción del LAS como agente emulsionante de nutrientes en el suelo, se llevó a cabo la determinación de fosfatos en el efluente de los microcosmos experimentales B y C a lo largo del periodo de estudio en cada uno de los ensayos realizados (10 y 50 mg/l de LAS). En la figura 4.38 se

muestran los resultados obtenidos del análisis de fosfatos en ambos ensayos y en el tratamiento control (sin LAS)

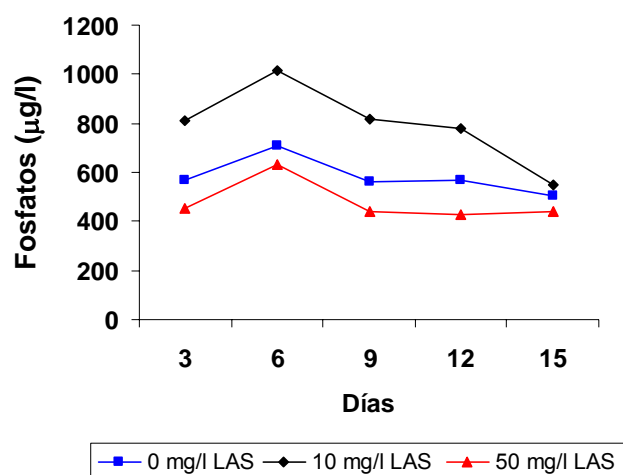


Figura 4.38. Evolución temporal de la concentración de fosfatos en el agua del efluente de salida de los microcosmos B y C bajo el efecto de las distintas concentraciones ensayadas de LAS en el influente.

La evolución temporal de la concentración de fosfatos en el efluente del tratamiento control (0 mg/l de LAS en el influente) puso de manifiesto la acción de lavado y arrastre por el agua de este nutriente. Por su parte, la concentración de fosfatos en el agua efluente durante el tratamiento con 10 mg/l de LAS fue considerablemente superior. Este hecho ha sido atribuido al efecto conjunto del lavado y de la acción emulsionante del surfactante sobre los nutrientes del suelo, un fenómeno previamente expuesto en el apartado 4.2.6.2.

Por último, las menores concentraciones de fosfatos en el efluente se registraron en el tratamiento con 50 mg/l de LAS, debido a la acción conjunta de los procesos de lavado y arrastre, emulsión de nutrientes y consumo (directo y por acción de fosfatasa) de fósforo inorgánico disuelto por el mayor número de microorganismos presente en las columnas edáficas.

4.3.3.3. Estudio de biodiversidad en los microcosmos edáficos ensayados

Con el fin de evaluar el impacto de los tratamientos con influentes adicionados de LAS sobre la biodiversidad microbiana del suelo, se realizaron estudios basados en la técnica independiente de cultivo PCR-TGGE, que proporciona perfiles de la composición de las comunidades microbianas en ecosistemas complejos. Dichos perfiles se realizaron estudiando el conjunto de la comunidad de las Eubacterias, y se obtuvieron además perfiles específicos de algunos de los grupos bacterianos más representativos del suelo (Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Acidobacterias, Bacterias Gram positivas de alto G+C y Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio). Las muestras analizadas procedían de la zona superior (ZS) e inferior (ZI) de los microcosmos edáficos B y C, y los tiempos de muestreo seleccionados fueron tras 7, 14 y 21 días desde el inicio del ensayo con 10 mg/l de LAS, y tras 3, 7 y 21 días en el caso del ensayo con 50 mg/l de LAS. Paralelamente, se llevaron a cabo los mismos estudios de los perfiles de biodiversidad del suelo empleado en los microcosmos inmediatamente después de ser recolectado de la parcela, y previamente a su introducción en las columnas de vidrio. Estos datos constituyeron el “tiempo 0 (T0)”, común a los dos ensayos (10 y 50 mg/l de LAS).

Se llevó a cabo la extracción de ADN en todas las muestras de suelo estudiadas y se amplificó una región hipervariable del gen codificante del ARNr 16S (región V3), empleando cebadores de PCR específicos de cada uno de los grupos bacterianos y aplicando una estrategia de PCR anidada, tal y como se describió en el apartado 3.3.8.2. de Material y Métodos.

4.3.3.3.1. Perfiles de biodiversidad de Eubacterias en las muestras de suelo

En la figura 4.39 se muestran los perfiles de biodiversidad de las comunidades procariotas, correspondientes tanto a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos experimentales como a aquellas del T0. En éste y los siguientes apartados, el carril nombrado como M (marcador) en la fotografía corresponde a una mezcla de ADN amplificado a partir de varias especies bacterianas conocidas. Al examinar visualmente el

gel, se aprecia que la composición de la comunidad procariota en las distintas muestras de suelo presenta perfiles similares, todos ellos compuestos por un elevado número de bandas.

Para obtener una mayor información, los perfiles de bandas se normalizaron y se analizaron mediante el programa informático Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica). Dada la complejidad de los perfiles, se optó por aplicar el coeficiente numérico de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). El coeficiente de Pearson no depende de la asignación de bandas, sino que relaciona los distintos perfiles en función de la similitud de sus curvas densitométricas completas, teniendo en cuenta por tanto la intensidad relativa de las bandas. Este método se recomienda para una interpretación rápida y fiable de perfiles de comunidad generados mediante DGGE/TGGE (Van Verseveld and Röling, 2004)

El dendrograma generado (Fig 4.40) muestra que los perfiles obtenidos en la zona superior e inferior del microcosmos B tratado con 50 mg/l de LAS tras 21 días de tratamiento se separan del resto de las muestras analizadas (similitud 78%). El resto de las muestras se segregó en dos clusters (similitud 83%). En el primero, se agrupan las muestras correspondientes a los ensayos sin LAS y al T0 (similitud 91%). En el segundo, por su parte, se agruparon todas aquellas muestras que recibieron de manera continua un influente adicionado de LAS, tanto a la concentración de 10 como de 50 mg/l de LAS (similitud 89%).

4. Resultados

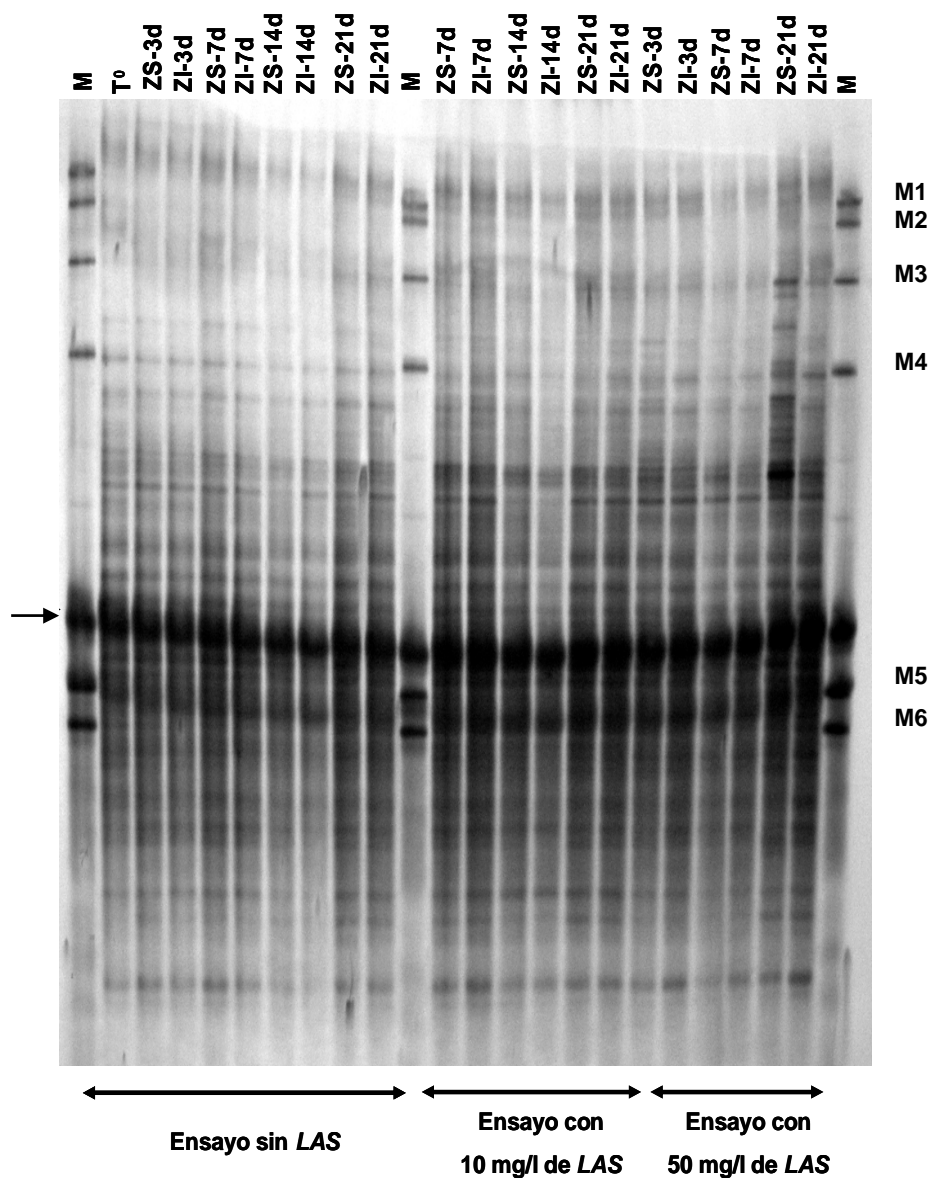


Fig 4.39. Análisis de la biodiversidad microbiana de Eubacterias (basado en la región V3 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de suelo procedentes de los microcosmos B (con LAS) y C (sin LAS) mediante la técnica de TGGE. La flecha señala un grupo de bandas que aparecen en todos los carriles y son artefactos. M= Marcador de seis especies (M1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; M2, *Pseudomonas putida* ATCC 8750; M3, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308; M4, *Escherichia coli* DH5 α ; M5, *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253; M6, *Micrococcus luteus* ATCC 9341).

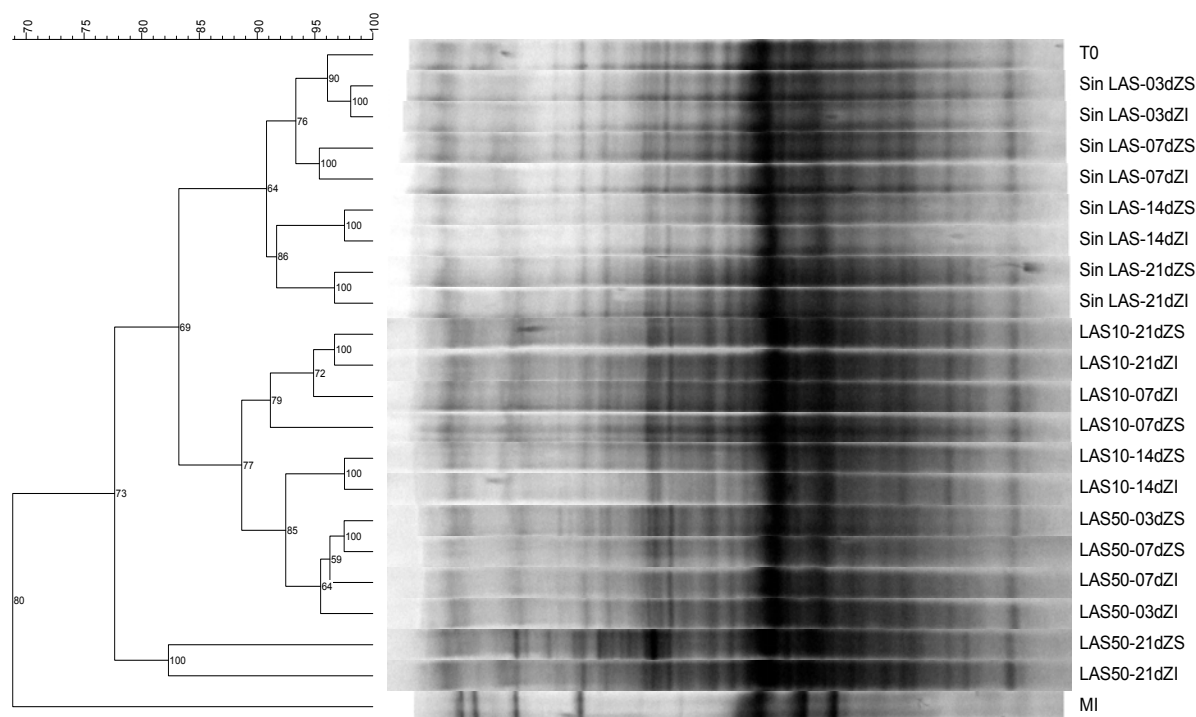


Fig 4.40. Dendrograma obtenido al analizar los perfiles generados mediante TGGE de las comunidades de Eubacterias presentes en las muestras de suelo de los microcosmos, utilizando el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica), aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Pearson. La barra superior muestra el porcentaje de similitud entre los perfiles de bandas, y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética.

Finalmente, no se procedió a la extracción de bandas de este gel para su posterior reamplificación y secuenciación, debido a la limitación física que supone el efecto de solapamiento de bandas.

4.3.3.3.2. Perfiles de biodiversidad de Beta-proteobacterias en las muestras de suelo

En la Figura 4.41. se muestran los perfiles de biodiversidad de las comunidades de Beta-proteobacterias, correspondientes tanto a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos experimentales como a aquellas del T0.

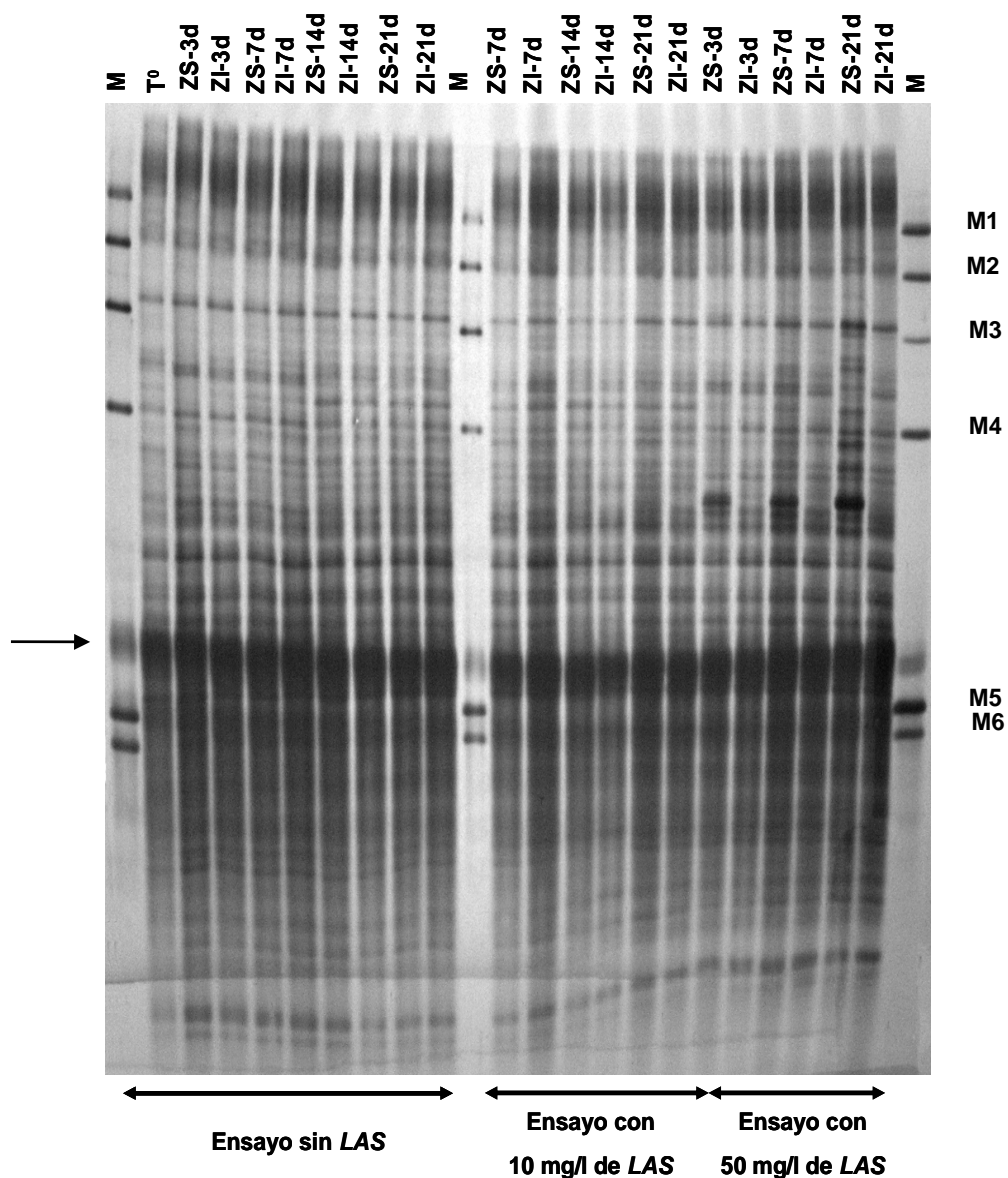


Fig 4.41. Análisis de la biodiversidad microbiana de Beta-proteobacterias (basado en la región V3 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de suelo procedentes de los microcosmos B (con LAS) y C (sin LAS) mediante la técnica de TGGE. La flecha señala un grupo de bandas que aparecen en todos los carriles y son artefactos. M= Marcador de seis especies (M1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; M2, *Pseudomonas putida* ATCC 8750; M3, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308; M4, *Escherichia coli* DH5 α ; M5, *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253; M6, *Micrococcus luteus* ATCC 9341).

Al examinar visualmente el gel, se aprecia que los perfiles de bandas obtenidos en las distintas muestras de suelo son muy similares a los obtenidos con los cebadores universales para las Eubacterias. Esta gran semejanza, junto a la enorme complejidad de los perfiles obtenidos, sugiere que los cebadores empleados para la amplificación selectiva de las Beta-proteobacterias no mostraron la suficiente especificidad, aplicados bajo las condiciones de este estudio.

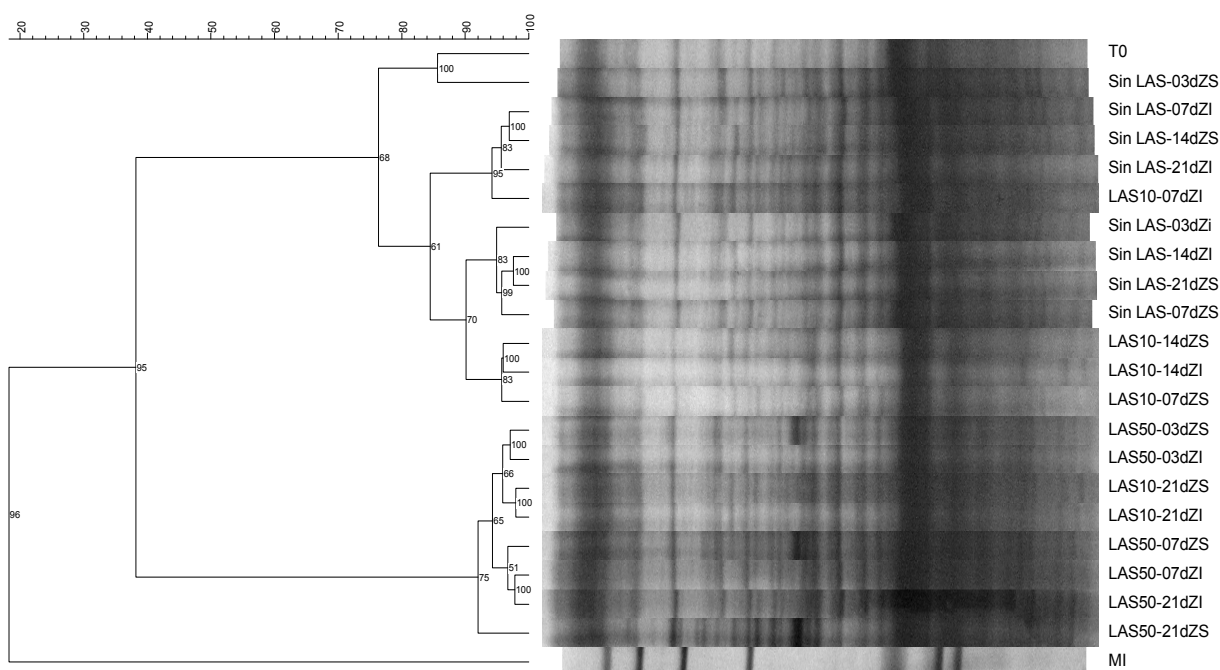


Fig 4.42. Dendrograma obtenido al analizar los perfiles generados mediante TGGE de las comunidades de Beta-proteobacterias presentes en las muestras de suelo de los microcosmos, utilizando el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica), aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Pearson. La barra superior muestra el porcentaje de similitud entre los perfiles de bandas, y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética.

Los perfiles de bandas se normalizaron y analizaron mediante el programa informático Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica), aplicando también en este caso el coeficiente numérico de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA. El dendrograma generado (Fig 4.42) muestra que los perfiles obtenidos se segregaron en dos clusters con una similitud entre ellos del 38%. En el primer cluster, se agrupan las muestras

correspondientes a los ensayos sin *LAS*, aquellas que recibieron de manera continua un influente adicionado de 10 mg/l de *LAS* (exceptuando las muestras ZS-21d y ZI-21d), y el T0 (similitud del 76%). En el segundo, por su parte, se agruparon todas aquellas muestras que recibieron de manera continua un influente adicionado de 50 mg/l de *LAS*, y las muestras ZS-21d y ZI-21d que fueron sometidas al influente adicionado de 10 mg/l de *LAS* (similitud 92%).

En este caso, debido al elevado número de bandas presente en la superficie del gel, tampoco fue posible realizar la extracción de bandas para su posterior reamplificación y secuenciación.

4.3.3.3.3. *Perfiles de biodiversidad de Alfa-proteobacterias en las muestras de suelo*

En la Figura 4.43 se muestran los perfiles de biodiversidad de las comunidades de Alfa-proteobacterias, correspondientes tanto a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos experimentales como a aquellas del T0.

Tal y como se desprende del análisis visual del gel (Fig. 4.43) la composición de la comunidad microbiana difería notablemente entre las distintas muestras de suelo (tratadas o no con *LAS*, zona superior o inferior de los microcosmos). Esto se ve reflejado en bandas que están presentes sólo en algunas muestras y no en otras, o que varían considerablemente su intensidad relativa.

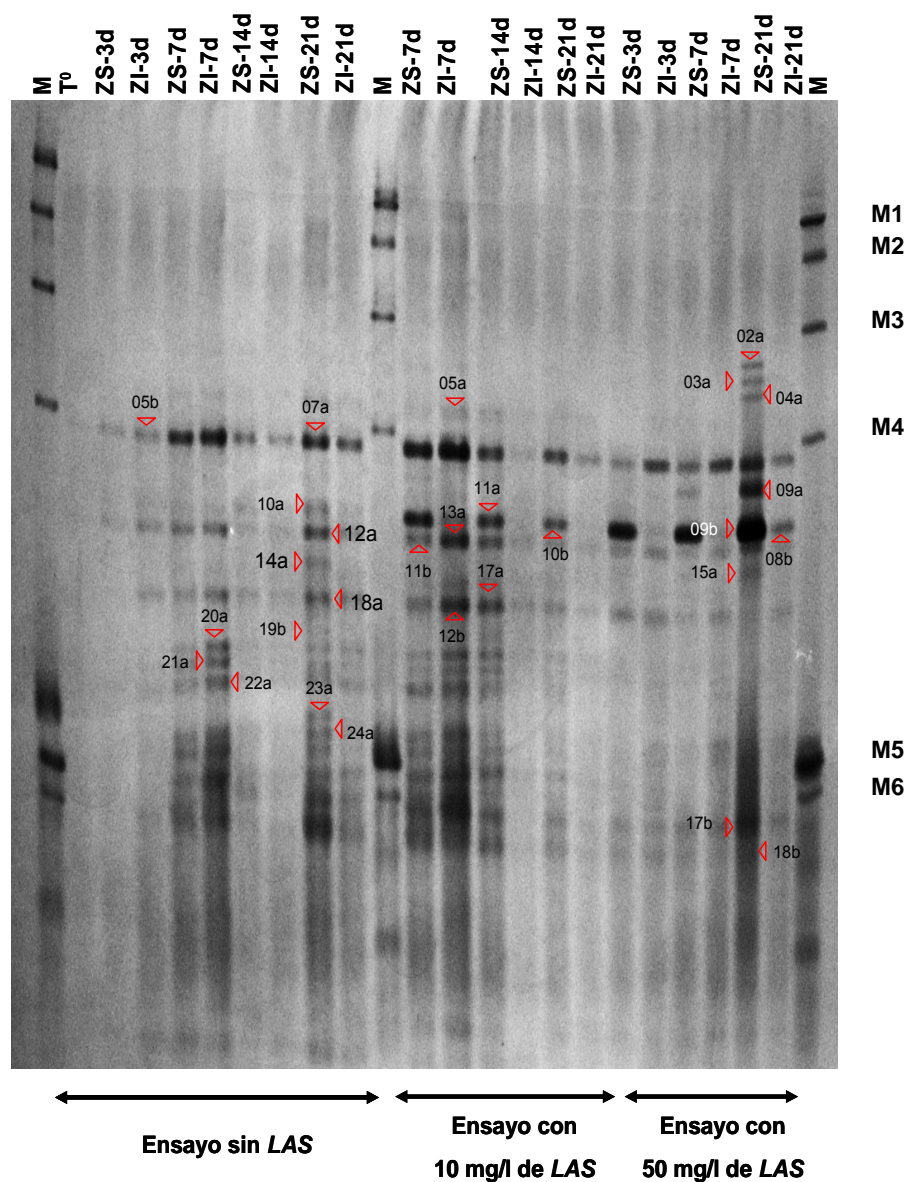


Fig 4.43. Análisis de la biodiversidad microbiana de Alfa-proteobacterias (basado en la región V3 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de suelo procedentes de los microcosmos B (con LAS) y C (sin LAS) mediante la técnica de TGGE. M= Marcador de seis especies (M1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; M2, *Pseudomonas putida* ATCC 8750; M3, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308; M4, *Escherichia coli* DH5 α ; M5, *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253; M6, *Micrococcus luteus* ATCC 9341).

Los perfiles de bandas se normalizaron y se analizaron mediante el programa informático Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica), aplicando el coeficiente

numérico de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA. El dendrograma resultante (Fig. 4.44A) muestra una evidente segregación de las muestras que nunca estuvieron en contacto con *LAS*, o aquellas en las que el contacto fue poco intenso (zona inferior de los microcosmos afectados por influentes adicionados de *LAS*, a las dos concentraciones ensayadas), respecto a las muestras más expuestas a la presencia del tensioactivo. Así, las muestras de las zonas superiores de los microcosmos en contacto con *LAS* y la muestra de la zona inferior sometida a un influente continuado de 50 mg/l de *LAS* durante 21 días se agruparon en un solo cluster, con un nivel de similitud del 65% (Fig 4.44A).

Se observaron claras diferencias en los perfiles de biodiversidad correspondientes a las muestras de la parte superior e inferior de los microcosmos B, tratados con *LAS*. En concreto, estas diferencias se deben fundamentalmente a una banda que estuvo siempre presente a mayor intensidad en las muestras de suelo procedentes de la parte superior de los microcosmos sometidos a un aporte continuo de *LAS* (banda marcada en varios carriles de la Fig. 4.43, como 11a, 09b y 10b), a las dos concentraciones ensayadas. Además, la intensidad de esta banda aumentó considerablemente en el ensayo en el que se utilizó un influente adicionado de 50 mg/l de *LAS* (ZS-3d,ZS-7d,ZS21d), incluso en la parte inferior de la columna transcurridos 21 días de funcionamiento de los microcosmos (banda marcada en la Fig. 4.43 como 08b). Dicha banda también se detectó, aunque con menor intensidad (banda marcada en la Fig 4.43 como 10a), en las muestras del microcosmos C (no tratado con *LAS*).

Dado que los perfiles de biodiversidad obtenidos para las Alfa-proteobacterias no eran excesivamente complejos, se optó por realizar un análisis complementario utilizando el mismo programa informático (Gel Compar) y el algoritmo UPGMA, pero aplicando en este caso el coeficiente de Dice, que relaciona los perfiles en función de su similitud, basándose únicamente en la presencia/ausencia de bandas, independientemente de la intensidad de las mismas.

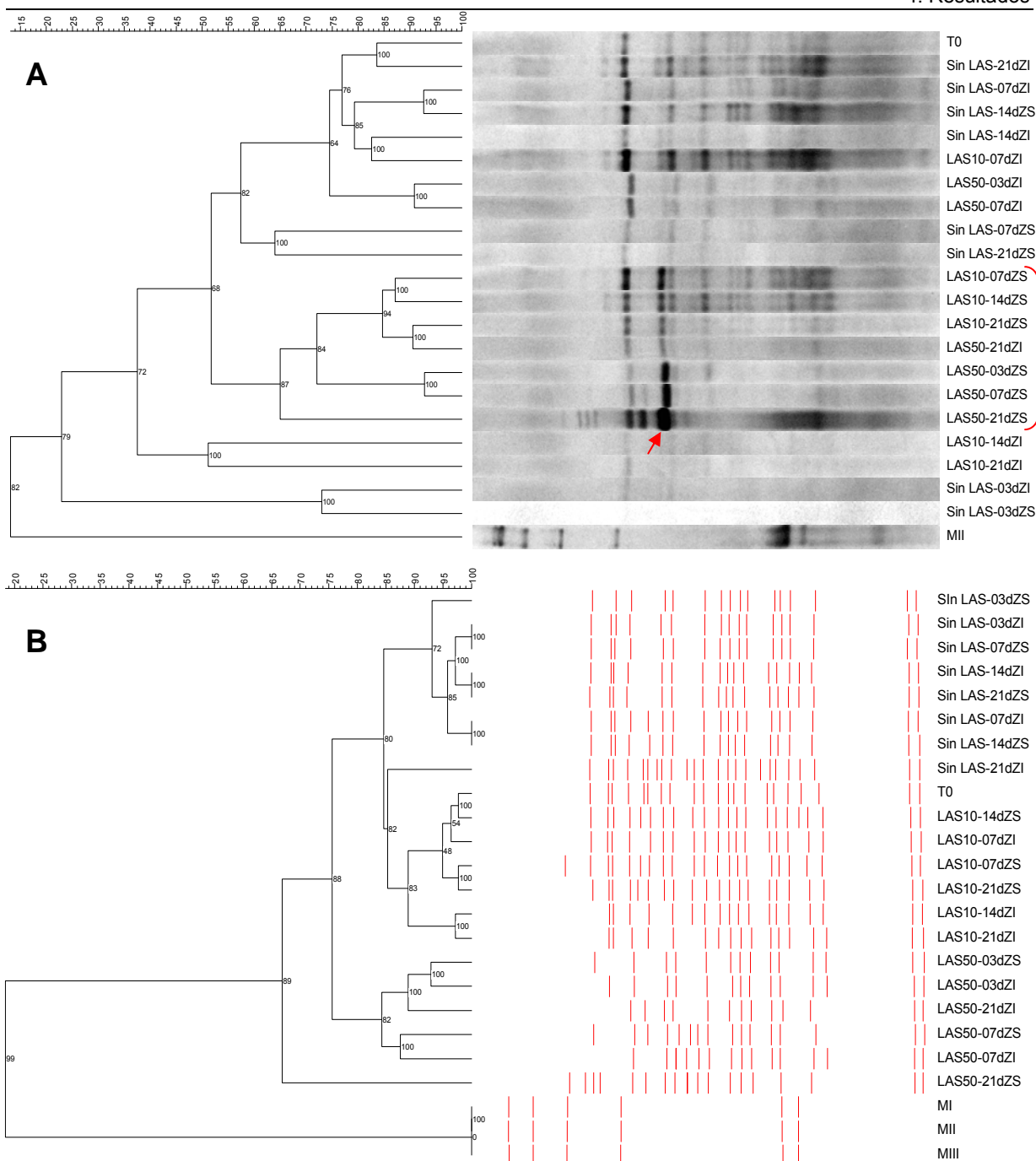


Fig 4.44. Dendrogramas obtenidos al analizar los perfiles generados mediante TGGE de las comunidades de Alfa-proteobacterias presentes en las muestras de suelo de los microcosmos, utilizando el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica), aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y los coeficientes de Pearson (A) y Dice (B). La barra superior muestra el porcentaje de similitud entre los perfiles de bandas, y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética. La flecha señala la banda cuya mayor intensidad distingue las muestras de la zona superior de los microcosmos tratados con LAS (cluster marcado con una llave).

El correspondiente dendrograma (Fig. 4.44 B) indica que el perfil de la comunidad de Alfa-proteobacterias en la zona superior del microcosmos B (tratado con el influente adicionado de 50 mg/l de *LAS* durante 21 días) se separó de manera significativa del resto de las muestras analizadas, con las que mostró una similitud de tan sólo el 69%. El resto de las muestras analizadas se segregó en dos clusters, a un nivel de similitud del 75%. En el primero se agrupan las muestras correspondientes a los ensayos sin *LAS*, aquellas que fueron sometidas a un influente adicionado de 10 mg/l de *LAS*, y el T0 (similitud 85%). En el segundo, por su parte, se encontraron todas aquellas muestras que recibieron de manera continua el influente adicionado de 50 mg/l de *LAS*.

En suma, estos datos indican claramente que el tratamiento del suelo en los microcosmos con *LAS* influencia la composición de las comunidades de Alfa-proteobacterias del suelo, como se deduce de las diferencias significativas encontradas en relación a la ausencia/presencia de determinadas poblaciones (bandas de TGGE). Por otra parte, existe también una diferencia significativa en la intensidad relativa de algunas de las bandas que representan las poblaciones detectadas mediante TGGE, especialmente de una banda que parece potenciarse gradualmente en la zona superior de los microcosmos tratados de manera continuada con *LAS*, alcanzando una máxima intensidad a la concentración más alta de *LAS* ensayada (50 mg/l) y tras 21 días tratamiento continuo (banda 09b).

Con el fin de obtener una mayor información acerca de las poblaciones de Alfa-proteobacterias dominantes en el suelo de los microcosmos tratados o no con *LAS*, y dado que la resolución de los geles de TGGE era adecuada, se procedió a la extracción de un total de 48 bandas para su reamplificación y secuenciación. Se consiguió la secuenciación de 28 de las 48 bandas extraídas (bandas marcadas en la Fig 4.43), que se compararon con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 150 pb) de Alfa-proteobacterias con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL

Banda	Afiliación taxonómica más probable (Clase/familia)	Microorganismo más similar	Longitud de solapamiento	Número de acceso	% Identidad /%Similitud
02a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	122	AY972383	99/100
		<i>Brevundimonas</i> H2/98-FUNDUS	122	AJ313427	98/99
03a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	122	AY972383	99/100
		<i>Brevundimonas</i> H2/98-FUNDUS	122	AJ313427	98/99
04a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	122	AY972383	99/100
		<i>Brevundimonas</i> H2/98-FUNDUS	122	AJ313427	98/99
05a	α -proteobacteria/ <i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. STM1422	124	AM086010	91/95
	α -proteobacteria/ <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium undicola</i> Liujiia-81	124	DQ648579	91/95
07a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. A1	123	AF361188	100/100
		<i>Caulobacter</i> sp. S142	123	AY972383	99/99
09a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	122	AY972383	97/98
		<i>Brevundimonas</i> H2/98-FUNDUS	122	AJ313427	96/97
10a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	122	DQ346729	100/100
		<i>Brevundimonas vesicularis</i>	122	AB193264	100/100
11a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	122	AY972383	100/100
		<i>Brevundimonas</i> H2/98-FUNDUS	122	AJ313427	99/99
12a	α -proteobacteria/ <i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i> sp. R-21940	122	AJ786801	96/98
		<i>Devosia neptunea</i> J1	122	AF469072	96/98
13a	α -proteobacteria/ <i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i> sp. PIC-C22	123	DQ227786	99/100
		<i>Devosia neptunea</i> J1	123	AF469072	99/100
14a	A-proteobacteria	<i>Reichenowia pícate</i>	123	AY316685	99/100
	α -proteobacteria/ <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> N3	123	AF508095	99/100
15a	α -proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	123	AY972383	98/99
		<i>Brevundimonas</i> H2/98-FUNDUS	123	AJ313427	97/98
17a	α -proteobacteria/ <i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i> GB	123	DQ205311	99/100
		<i>Ochrobactrum tritici</i> P10	123	AY972166	99/100

4. Resultados

Tabla 4.6 (cont). Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 150 pb) de Alfa-proteobacterias con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL

Banda	Afiliación taxonómica más probable (Clase/familia)	Microorganismo más similar	Longitud de solapamiento	Número de acceso	%Identidad/ %Similitud
18a	α-proteobacteria/ <i>Methylocystaceae</i>	<i>Methylocystis parvus</i> MFC-EB21	118	AJ630289	96/98
		<i>Methylosinus thichosporium</i> SM6	118	AY460188	96/98
19a	α –proteobacteria	<i>Bacterium Hellín</i> 359	105	AF498741	98/99
		<i>Bacterium Hellín</i> 329	105	AF498711	98/99
20a	α-proteobacteria/ <i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> ATTC 27495	123	U59506	99/99
		<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> DSM 1564	123	Y14304	99/99
21a	α-proteobacteria/ <i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i> DSM 13863	118	AF235089	99/100
		<i>Hyphomicrobium facilis</i> IFAM B522	118	Y14312	97/98
22a	α-proteobacteria/ <i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bosea thiooxidans</i> CP183aa	113	AJ871432	97/98
	α-proteobacteria/ <i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Pedomicrobium australicum</i> IFAM ST1306	113	X97693	98/99
23a	α-proteobacteria/ <i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Phaeospirillum fulvum</i> NCIMB11762	123	D14433	98/99
		<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> SSU	123	Y10109	98/99
24a	α-proteobacteria/ <i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bosea thiooxidans</i> CP183aa	123	AJ871432	92/96
	α –proteobacteria	<i>Bacterium</i> PE03-55G20	124	AB127829	92/96
05b	α-proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. A1	123	AF361188	94/95
		<i>Phenylobacterium lituiforme</i> Fail3	123	AY534887	94/95
08b	α-proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	123	AY972383	100/100
		<i>Brevundimonas</i> H ₂ /98 FUNDUS	123	AJ313427	99/99
09b	α-proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	121	AY972383	100/100
		<i>Brevundimonas</i> H ₂ /98 FUNDUS	121	AJ313427	99/99
10b	α-proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	123	AY972383	100/100
		<i>Brevundimonas</i> H ₂ /98 FUNDUS	123	AJ313427	99/99

Tabla 4.6 (cont). Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 150 pb) de Alfa-proteobacterias con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL

Banda	Afiliación taxonómica más probable (Clase/familia)	Microorganismo más similar	Longitud de solapamiento	Número de acceso	%Identidad/ %Similitud
11b	α-proteobacteria/ <i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia neptuniae</i> J1	124	AF469072	96/99
	α-proteobacteria/ <i>Methylocystaceae</i>	<i>Methylopila capsulata</i> R2L2	124	AJ634928	95/98
12b	α-proteobacteria/ <i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i> GB	123	DQ205311	99/100
	α -proteobacteria	<i>Reichenowia pictae</i>	123	AY316685	99/100
17b	α-proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	123	AY972383	100/100
		<i>Brevundimonas</i> H ₂ /98 FUNDUS	123	AJ313427	99/99
18b	α-proteobacteria/ <i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i> sp. S142	123	AY972383	100/100
		<i>Brevundimonas</i> H ₂ /98 FUNDUS	123	AJ313427	99/99

En la Figura 4.45 se representa el árbol filogenético de todas las secuencias obtenidas, elaborado a partir de un alineamiento múltiple mediante el método *Neighbour-Joining*, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen codificante del ARNr 16S de los microorganismos más similares depositados en la base de datos EMBL, completado con secuencias de especies tipo de la familia *Caulobacteraceae*, igualmente procedentes de la base de datos EMBL. Como se desprende de la interpretación del árbol filogenético, todas las secuencias obtenidas pertenecieron a la clase Alfa-proteobacterias (corroborando la especificidad de los cebadores empleados para la amplificación por PCR) y, dentro de ella, a los órdenes *Rhizobiales* y *Caulobaterales*. En este último orden se encuadraron las secuencias de las bandas que alcanzaron mayor intensidad en las muestras de la zona superficial de los microcosmos tipo B, tratados con LAS (secuencias 11a, 08b, 09b y 10b), así como la banda 10a, procedente del microcosmos tipo A. La secuenciación demostró que todas estas bandas, que migraron a la misma altura del gel en las diferentes muestras, correspondían efectivamente a una secuencia de ADN idéntica, filogenéticamente encuadrada dentro de la familia *Caulobacteraceae* y muy relacionada con especies del género *Phenylobacterium* (*P. falsum*, *P. koreense*, *P. mobile*).

4. Resultados

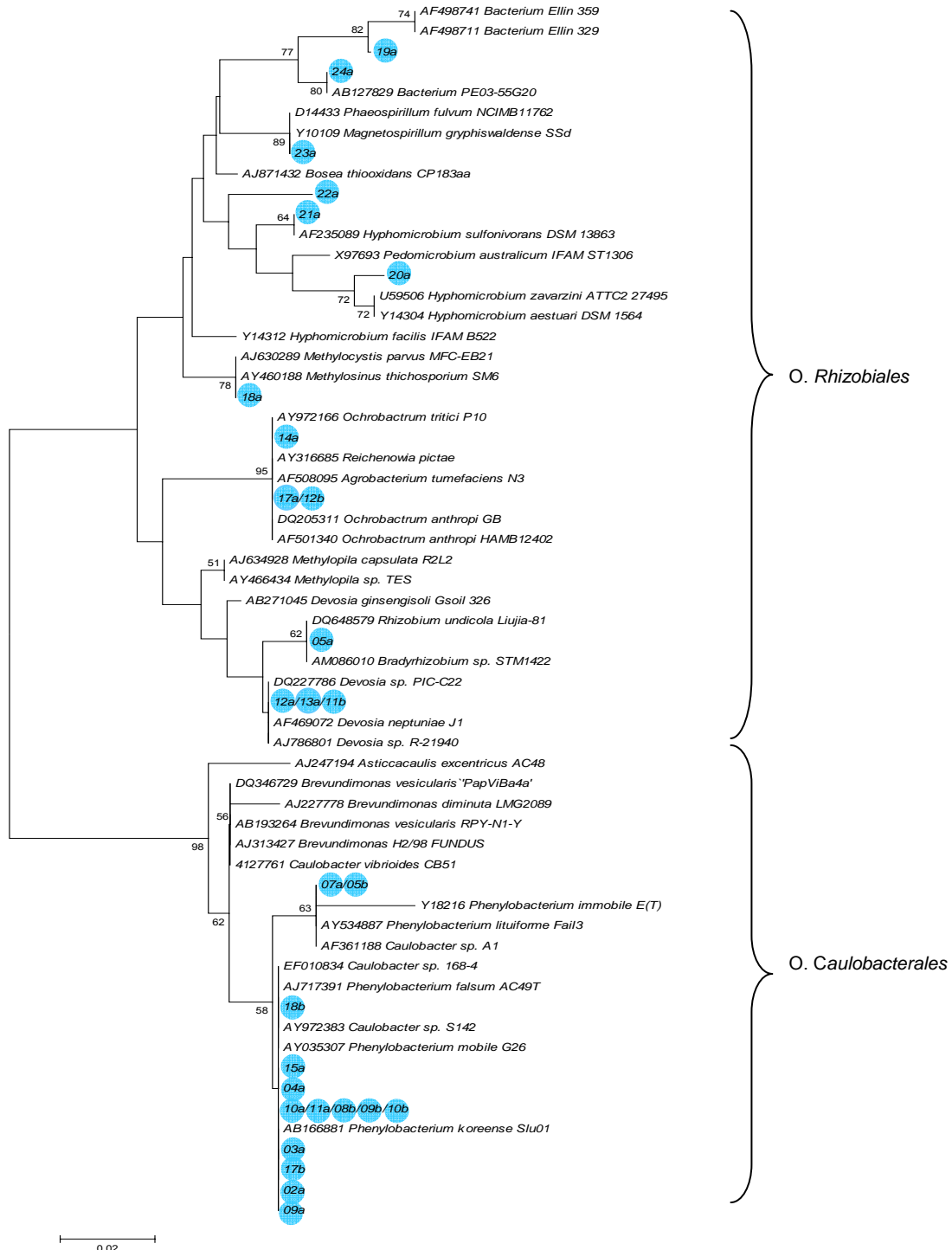


Fig 4.45. Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S (aproximadamente 150 bp) que muestra las posiciones de las secuencias de las bandas de TGGE de Alfa-proteobacterias junto a otras depositadas en la base de datos EMBL. La barra indica un 2% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50%.

Destaca el hecho de que otras 7 bandas (02a, 03a, 04a, 09a, 15a, 17b, 18b), presentes en el perfil de comunidad correspondiente a la muestra de suelo de la parte superior del microcosmos tratado durante 21 días con el influente adicionado de 50 mg/l de LAS, tras ser amplificadas y secuenciadas con éxito, generaron secuencias idénticas a la de la banda 09b. Algunas de estas bandas son exclusivas de la muestra ZS-21d tratada con el influente adicionado de 50 mg/l de LAS, y puede tratarse de bandas generadas artificialmente durante la reacción de PCR, probablemente debido a la presencia del ADN molde de la banda 09b en muy alta concentración.

4.3.3.3.4. Perfiles de biodiversidad de Bacterias Gram-positivas de alto G+C en las muestras de suelo

En la Figura 4.46. se muestran los perfiles de biodiversidad de las comunidades de bacterias Gram-Positivas de alto G+C, correspondientes tanto a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos experimentales como a aquellas del T0.

Debido al alto contenido en G+C de este grupo específico de bacterias, los perfiles de bandas obtenidos bajo un gradiente de separación de 43-63°C se concentraban principalmente en la parte inferior del gel, con la consiguiente dificultad para su extracción, reamplificación y secuenciación. Se ensayaron diferentes condiciones de electroforesis, hasta optimizar el gradiente de temperatura entre 47-56°C (ver Material y Métodos), con el objetivo de obtener una mayor resolución en la separación de las bandas.

De los geles obtenidos bajo estas condiciones (Figura 4.46) se intentó la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 23 bandas, de las cuales se pudieron analizar 16 mediante su comparación con las secuencias de ARN 16S depositadas en la base de datos EMBL (Tabla 7).

4. Resultados

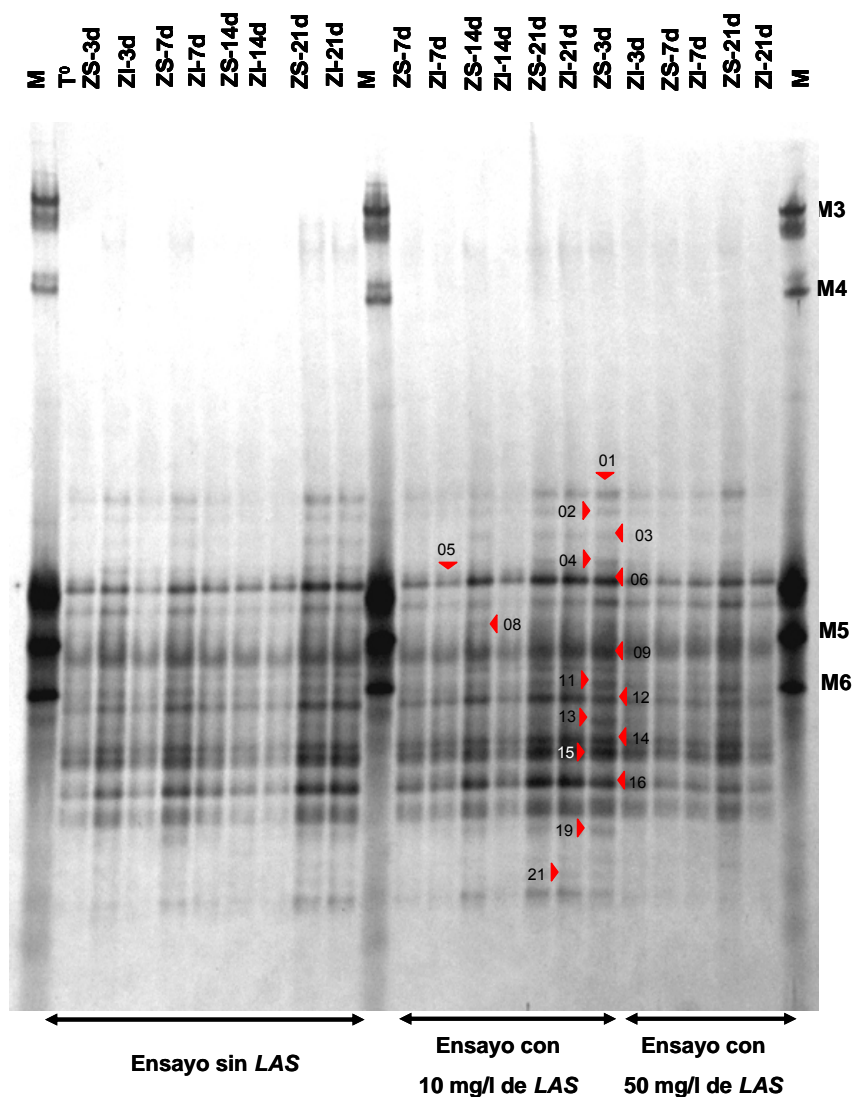


Fig 4.46. Análisis de la biodiversidad microbiana de bacterias Gram-positivas de alto G+C (basado en la región V3 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de suelo procedentes de los microcosmos B (con LAS) y C (sin LAS) mediante la técnica de TGGE. M= Marcador de seis especies, del que sólo se visualizan 4 bandas (M3, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308; M4, *Escherichia coli* DH5 α ; M5, *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253; M6, *Micrococcus luteus* ATCC 9341).

Como se puede comprobar, este grupo bacteriano se caracterizó por presentar perfiles de biodiversidad similares para todas las muestras, tanto aquellas en contacto con LAS como aquellas otras que nunca tuvieron contacto con el tensioactivo. Por tanto, se

puede concluir que este grupo no se vio afectado en ningún sentido por la presencia de LAS, a ninguna de las concentraciones ensayadas, y bajo las condiciones de nuestro estudio.

Tabla 4.7. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 150 pb) de bacterias de alto G+C con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL

Banda	Afiliación taxonómica más probable (Clase/familia)	Microorganismo más similar	Longitud de solapamiento	Número de acceso	% Identidad / %Similitud
01	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. CG4	128	EF025320	97/99
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL B-12307	128	AY999792	97/99
02	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. CG4	124	EF025320	99/100
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL B-12307	124	AY999792	99/100
03	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. C55	124	AY741283	100/100
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL 12307	124	AY999792	100/100
04	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. LK1224.1	128	AY465265	97/98
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL 12307	128	AY999792	97/98
05	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. MC3	128	AY741289	100/100
		<i>Streptomyces vinaceus</i> NRRL B-1733	128	AY999777	100/100
06	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. MC3	128	AY741289	100/100
		<i>Streptomyces vinaceus</i> NRRL B-1733	128	AY999777	100/100
08	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. C55	128	AY741283	98/99
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL 12307	128	AY999792	98/99
09	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. LK12221.4	128	AY465253	98/99
	Actinobacteria/ <i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. 13/3	128	AY660953	98/99
11	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. LK1111.1	121	AY465184	99/100
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL 12307	121	AY999792	99/100
12	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. LK1224	128	AY465265	97/98
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL 12307	128	AY999792	97/98
13	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. LK1224.1	128	AY465265	97/98
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL 12307	128	AY999792	97/98

4. Resultados

Tabla 4.7. (cont) Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 150 pb) de bacterias de alto G+C con las secuencias depositadas en la base de datos EMB

Banda	Afiliación taxonómica más probable (Clase/familia)	Microorganismo más similar	Longitud de solapamiento	Número de acceso	% Identidad / %Similitud
14	Actinobacteria/ <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp. LK1222.3	128	AY465257	97/98
		<i>Streptomyces flavofungini</i> NRRL 12307	128	AY999792	96/98
15	Actinobacteria/ <i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Blastococcus</i> sp. 14III/A01/013	126	AY576696	98/99
		<i>Geodermatophilus</i> sp. BC509	128	AJ296063	97/98
16	Actinobacteria/ <i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Blastococcus</i> sp. 14III/A01/013	126	AY576696	99/99
		<i>Geodermatophilus</i> sp. BC509	128	AJ296063	98/98
19	Actinobacteria/ <i>Frankiaceae</i> Actinobacteria/ <i>Nocardiaceae</i>	<i>Frankia</i> sp. BMG5	128	AJ549320	98/100
		<i>Rhodococcus opacus</i>	128	AB037099	97/99
21	Actinobacteria/ <i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus obscurus</i>	132	L40620	98/98
		<i>Geodermatophilus obscurus</i>	132	X92357	97/97

La mayoría de las secuencias obtenidas (75%) fueron muy similares y se afiliaron al género *Streptomyces*, mientras que el resto se relacionaron filogenéticamente con las familias *Geodermatophilaceae* y *Nocardiaceae*/*Frankiaceae*.

4.3.3.3.5. Perfiles de biodiversidad de Acidobacterias en las muestras de suelo

En la figura 4.47. se muestran los perfiles de biodiversidad de las comunidades de Acidobacterias, correspondientes tanto a las muestras de suelo procedentes de los microcosmos experimentales como a aquellas del T0.

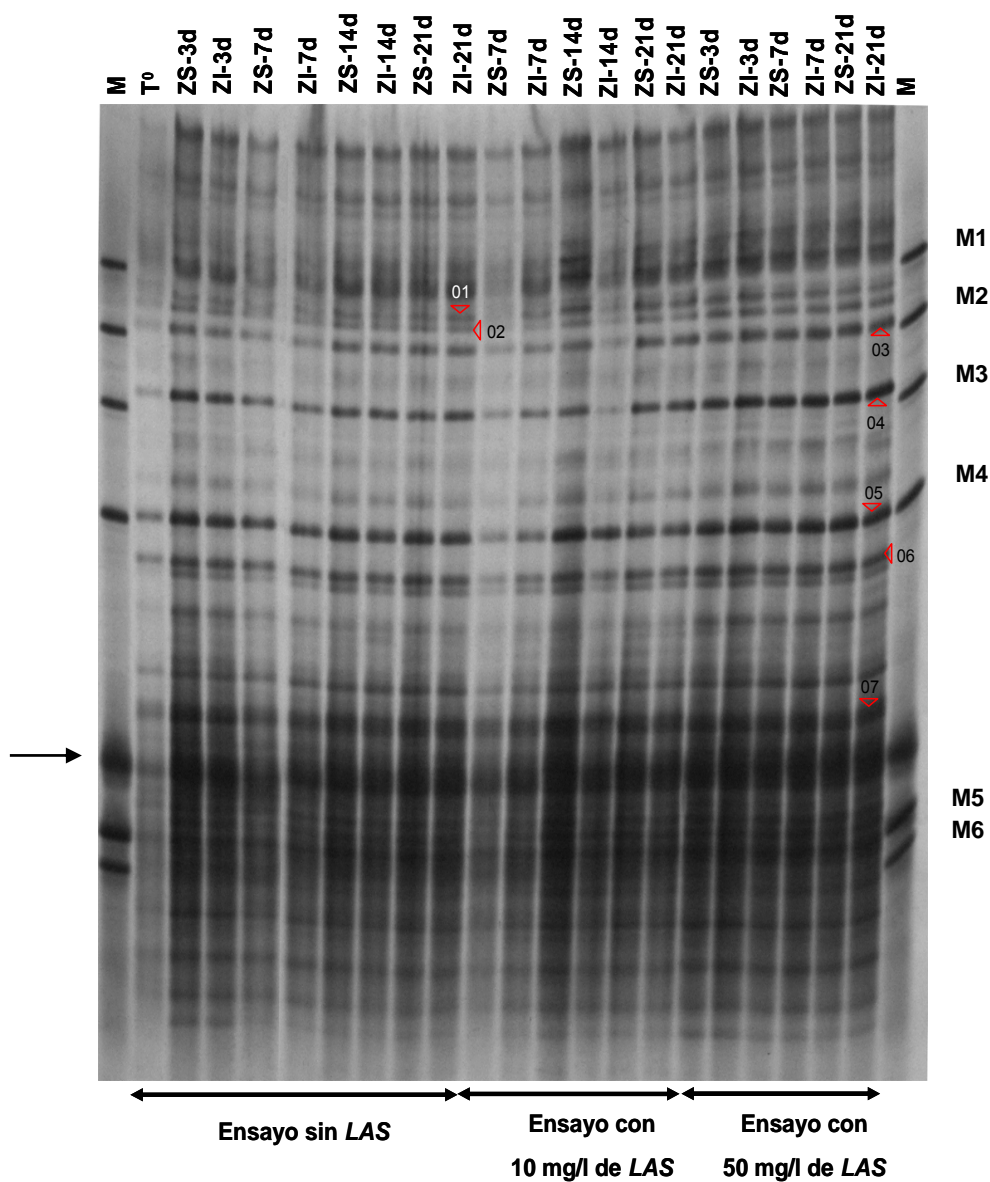


Fig 4.47. Análisis de la biodiversidad microbiana de Acidobacterias (basado en la región V3 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de suelo procedentes de los microcosmos B (con LAS) y C (sin LAS) mediante la técnica de TGGE. M= Marcador de seis especies (M1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; M2, *Pseudomonas putida* ATCC 8750; M3, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308; M4, *Escherichia coli* DH5 α ; M5, *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253; M6, *Micrococcus luteus* ATCC 9341).

4. Resultados

Como se puede comprobar, este grupo bacteriano también se caracterizó por presentar perfiles de biodiversidad muy similares en todas las muestras, tanto aquellas en contacto con LAS como aquellas otras que nunca tuvieron contacto con el tensioactivo. Por tanto, se puede concluir que este grupo tampoco resultó afectado en ningún sentido por la presencia de LAS, a ninguna de las concentraciones ensayadas y bajo las condiciones de nuestro estudio.

De este gel se extrajeron bandas para su reamplificación y secuenciación. En total, se consiguió secuenciar 7 de las 21 bandas extraídas, y se compararon con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 150 pb) de Acidobacterias con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL

Banda	Afiliación taxonómica más probable (Clase)	Microorganismo más similar	Longitud de solapamiento	Número de acceso	% Identidad / %Similitud
01	Acidobacteria	Bacterium Ellin 6075	100	AY234727	92/93
		Acidobacterium Gsoil 1619	100	AB245338	91/92
02	Acidobacteria	Bacterium Ellin 6075	100	AY234727	90/93
		Acidobacterium Gsoil 1619	100	AB245338	89/92
03	Acidobacteria	Bacterium Ellin 6075	120	AY234727	86/86
		Acidobacterium Gsoil 1619	120	AB245338	86/86
04	Acidobacteria	Acidobacterium Ellin 7246	132	AY673412	84/84
		Bacterium Ellin 6075	112	AY234727	90/90
05	Acidobacteria	Bacterium Ellin 6075	100	AY234727	93/93
		Acidobacterium Ellin 7246	132	AY673412	82/82
06	Acidobacteria	Acidobacterium Ellin 7246	135	AY673412	83/83
		Bacterium Ellin 6075	111	AY234727	90/90
07	Acidobacteria	RB126	100	Z95716	90/90
		mb2424	112	Z95733	94/95

En la Figura 4.48 se representa el árbol filogenético de todas las secuencias obtenidas, elaborado a partir de una alineamiento múltiple mediante el método *Neighbour-Joining*, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen codificante del ARNr 16S de los microorganismos más similares depositados en la base de datos, así como de especies tipo y clones representativos de cada uno de los 6 grupos filogenéticos de Acidobacterias descritos en bibliografía (Quaiser *et al.*, 2003), igualmente obtenidos a partir de la base de datos EMBL. Como se desprende de la interpretación del árbol filogenético, las secuencias obtenidas no están próximas a ninguno de los géneros validados, sino que

se encuadran dentro de los grupos filogenéticos III y V, perteneciendo en su mayoría al grupo III.

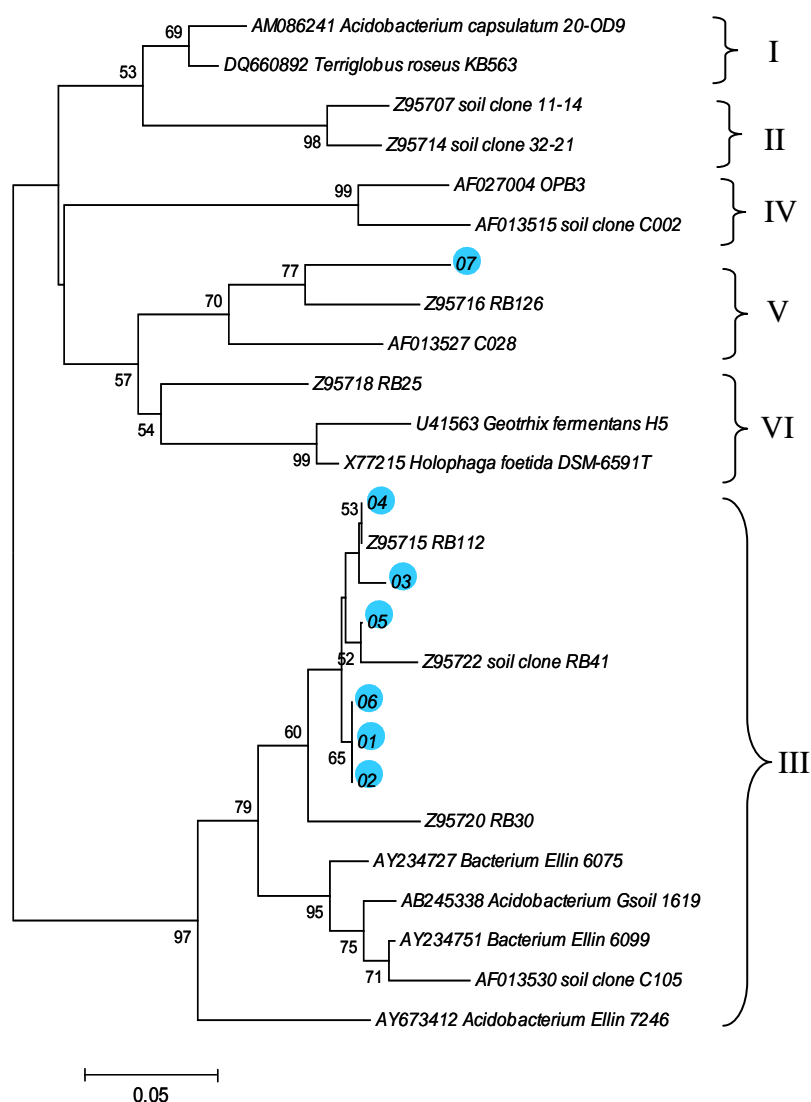


Fig 4.48. Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S (aproximadamente 150 bp) que muestra las posiciones de las secuencias de las bandas de TGGE de Acidobacterias, junto a secuencias de especies tipo y clones representativos de cada uno de los seis grupos de las Acidobacterias depositadas en la base de datos EMBL. La barra indica un 5% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50%.

4.3.3.3.6. *Perfiles de biodiversidad de las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio en las muestras de suelo*

El análisis de biodiversidad para las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio se basó en la amplificación del gen *amoA* a partir de las muestras de suelo de los microcosmos. Este grupo de microorganismos, si bien poco numeroso en el suelo, posee un importante papel en el ciclo del N y fue incluido en el estudio dadas las numerosas referencias bibliográficas existentes que hacen mención de la gran sensibilidad de este grupo de bacterias al LAS (ver apartado de la Introducción). Sin embargo el análisis entrañó importantes dificultades, derivadas en buena medida de la presencia de escasas bandas en los perfiles de TGGE y de la baja intensidad de éstas, incluso tras concentrar las muestras hasta 20 veces (Fig. 4.49), motivo por el cual los resultados no aportaron información suficiente como para extraer conclusiones definitivas sobre el impacto del LAS en este grupo, bajo las condiciones de este estudio.

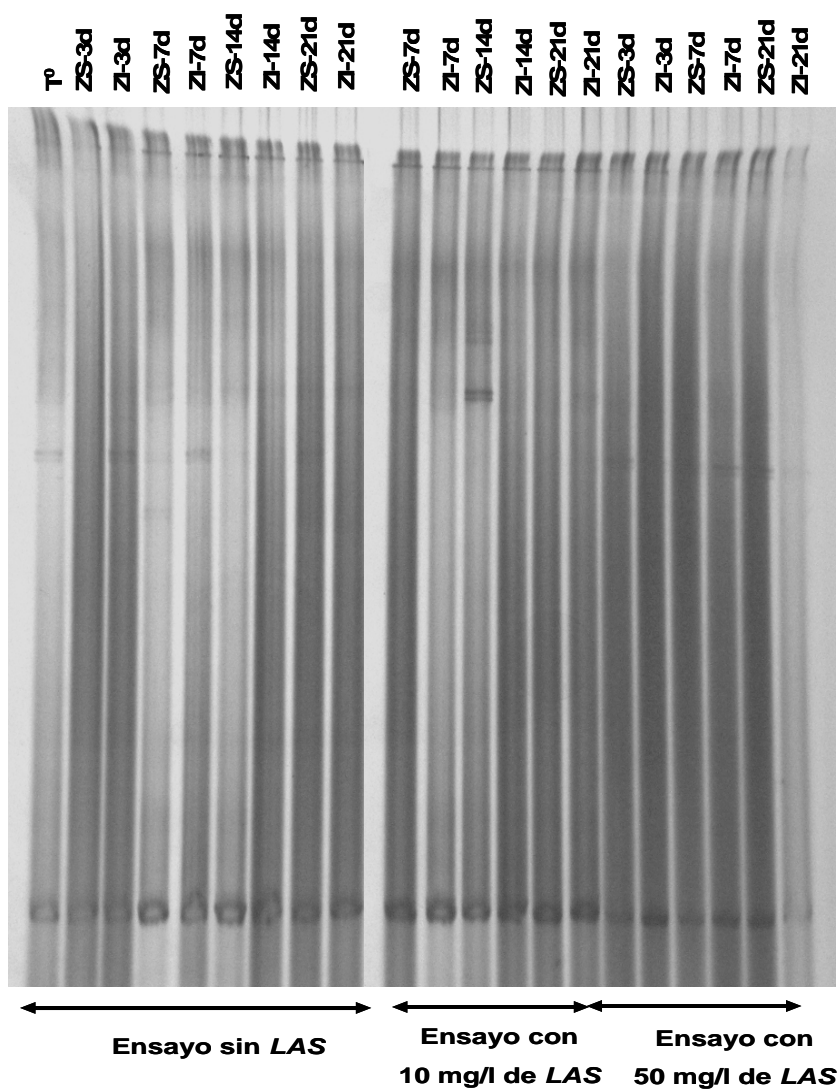


Fig 4.49. Análisis de la biodiversidad microbiana de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio (basado en el gen *amoA*) en las muestras de suelo procedentes de los microcosmos B (con LAS) y C (sin LAS) mediante la técnica de TGGE.



5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El Sulfonato de Alquibenceno Lineal (*LAS*) es el tensioactivo aniónico más utilizado en el mercado mundial de detergentes. Lo extendido de su uso, tanto en el ámbito doméstico como en el industrial, implica que el xenobiótico constituya un componente frecuente tanto en la composición de las aguas residuales como de los lodos de depuradora. El interés y la preocupación que suscita la presencia de un compuesto xenobiótico de amplia difusión mundial en el ambiente ha propiciado que numerosos investigadores hayan abordado de forma reciente -y bajo muy distintas aproximaciones- el estudio del proceso de biodegradación de *LAS*, tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres (Elsgaard *et al.*, 2003; Ying, 2006; Prats *et al.*, 2006; Perales *et al.*, 2007).

En el caso concreto de los suelos de labor agrícola, el uso de lodos biológicos como fertilizante y la ingente demanda de agua por parte de la agricultura suponen los principales mecanismos por los que el *LAS* alcanza el sistema edáfico (Holt *et al.*, 1998), un ecosistema único que alberga una gran comunidad de bacterias, hongos, algas, protozoos y virus, donde las interacciones biológicas son especialmente intensas y acontece una gran variedad de procesos bioquímicos vinculados a la degradación de la materia orgánica y a las transformaciones de elementos minerales para la nutrición de las plantas (Paul, 2006). Los vertidos indeseados de agentes xenobióticos (tales como el *LAS*) pueden alterar de forma significativa la actividad metabólica del suelo, afectando de esta manera, entre otros, a su fertilidad. Como respuesta, el ecosistema trata de amortiguar (o tamponar) el impacto del xenobiótico mediante la transformación y/o degradación de estos compuestos. En este sentido, la presente Tesis Doctoral supone una nueva contribución al conocimiento científico en torno a la interacción entre el *LAS* y la microbiota edáfica. A continuación se discuten los principales resultados obtenidos.

Análisis *in situ* de la distribución espacio-temporal del LAS y de la microbiota cultivable tras vertidos controlados en parcelas experimentales.

En una primera aproximación *in situ*, nuestro estudio ha puesto de manifiesto un claro patrón en la distribución vertical del LAS en el perfil edáfico. De esta manera, tras efectuar el vertido de LAS y a lo largo de todo el periodo de estudio, el surfactante quedó retenido prioritariamente en los primeros 10 centímetros de suelo, precisamente en la zona donde se detectaron los mayores recuentos de microorganismos cultivables heterótrofos (Fig 4.1 y 4.3). Distintos estudios han puesto de manifiesto patrones similares de distribución vertical de LAS en suelos (Küchler and Schnaak, 1997), en microcosmos edáficos (Jacobsen *et al.*, 2004) y en sedimentos marinos (León *et al.*, 2001). De igual forma, los microorganismos tampoco se distribuyeron de forma uniforme a lo largo del perfil edáfico, de forma que las máximas densidades de estos, se registraron en las capas más superficiales del suelo (Fig 4.3). Es bien conocido, que los microorganismos no están distribuidos regularmente en el suelo, ya que existe un mosaico discontinuo de microambientes. Normalmente, la dispersión de los microorganismos sigue la distribución vertical de los nutrientes, aunque esta, a veces puede ser alterada por factores tales como el pH, la humedad, la cantidad de minerales asimilables, la composición de la atmósfera del suelo, etc. (Carrillo, 2003).

Una vez el surfactante alcanza el suelo es sometido a un proceso de biodegradación mediado principalmente por bacterias aeróbicas (Holt *et al.*, 1989; Ying, 2006). En todos los casos estudiados, el proceso de biotransformación del LAS a lo largo del tiempo se ajustó satisfactoriamente a un modelo exponencial decreciente (Fig 4.2), coincidente con las apreciaciones de Küchler and Schnaak (1997), Cavalli *et al.* (1999), Perales *et al.* (1999), Elsgaard *et al.* (2003), Jacobsen *et al.* (2004) y Perales *et al.* (2007). El tiempo de aclimatación de la comunidad microbiana tras el vertido de LAS osciló entre un máximo invernal de 1.1 y un mínimo primaveral de 0.4 días (Tabla 4.1), en todo caso periodos cortos que favorecieron el ajuste exponencial frente a modelos logísticos como los propuestos por Simkins and Alexander (1984), Quiroga *et al.* (1999) y Jurado *et al.* (2006).

De acuerdo con estos datos, y según investigaciones previas (Marcomini *et al.*, 1989; Madsen *et al.*, 1999 y Jacobsen *et al.*, 2004), es posible distinguir dos fases bien diferenciadas en el proceso de biotransformación del LAS en el suelo: una primera fase en la que el compuesto sufre una acelerada biodegradación, y una segunda en la que la transformación del xenobiótico se lleva a cabo de forma más pausada.

Numerosos autores (Berna *et al.*, 1989; Kneabel *et al.*, 1990; Brandt *et al.*, 2003; Pozo *et al.*, 2003) han puesto de manifiesto que el LAS en el suelo tiene una corta vida media, debido a la degradación a la que es sometido por parte de la microbiota edáfica. En las cuatro experiencias de adición del surfactante efectuadas (experimentos de verano, otoño, invierno y primavera) se alcanzó la práctica extinción del tensioactivo tras un periodo máximo de 31 días (Fig 4.2). La vida media del surfactante en el suelo (t_{50}) osciló entre 1.6 y 4.5 días (Tabla 4.1), valores similares a los encontrados por Litz *et al.* (1987), Ginger *et al.* (1987), Knaebel *et al.* (1990), Küchler and Schnaak (1997) y Elsgaard *et al.* (2003) en suelos agrícolas, y ligeramente inferiores a aquellos publicados por Berna *et al.* (1989), Holt *et al.* (1989) y Topp and Starrat (2000), según los cuales la vida media del LAS en suelos de labor oscilaría entre 7 y 33 días (Ying, 2006). Jacobsen *et al.* (2004) pusieron de manifiesto que la forma de adicionar el LAS sobre el suelo puede determinar en buena medida la vida media del tensioactivo en el mismo. Así, cuando el LAS se aplica disuelto en agua o en lodos bien mezclados con el suelo la vida media del compuesto en el suelo resulta considerablemente inferior a la registrada tras adiciones de LAS contenido en lodos con fuerte presencia de agregados.

Las medidas de densidad y biomasa microbiana suelen presentar un elevado grado de estacionalidad, generalmente caracterizada por máximos valores en primavera y verano y mínimos en invierno (Bardgett *et al.*, 1999). En este contexto, numerosos estudios previos han puesto de manifiesto el desarrollo de máximos primaverales de crecimiento, densidad y actividad microbiana en muy distintos tipos de suelos (Ritz and Robinson, 1988, Sarathchandra *et al.*, 1988, Patra *et al.*, 1990, Ross *et al.*, 1995, Toniutti *et al.*, 1999). De acuerdo con esto, la mayor velocidad de biotransformación se registró en verano y primavera, cuando los números de microorganismos en el suelo fueron más elevados y la temperatura ambiente más alta. Por el contrario, el proceso de biotransformación resultó

menos intenso en otoño y, sobre todo, en invierno, bajo el efecto de bajas temperaturas y con un menor número de microorganismos. En esta estación fría se registraron también tiempos más prolongados de aclimatación de la comunidad microbiana al vertido. En este sentido, nuestros resultados son coincidentes con las observaciones de Prats *et al.*, (2006), quienes pusieron de manifiesto el papel de la temperatura como agente determinante de los tiempos de aclimatación y de la vida media del LAS en el suelo. Es precisamente durante el transcurso de las estaciones más frías cuando el LAS vertido y no biodegradado en las capas superficiales puede ser transportado disuelto en el agua hasta estratos más profundos, dando lugar a perfiles de distribución algo más homogéneos (Fig 4.1). De esta manera, nuestros resultados parecen indicar, que la biodisponibilidad y biodegradabilidad del LAS no sólo dependen del porcentaje de LAS aportado y de sus características moleculares como apuntaban Litz *et al.* (1987), Schöberl *et al.* (1988), Knaebel *et al.* (1990) y Nielsen *et al.* (2004), sino que también puede depender de otros factores del suelo tales como la temperatura.

A las concentraciones de LAS adicionadas, que se corresponden con aquellas típicamente encontradas en lodos de depuradora (Jensen, 1999), no se detectaron en ningún caso efectos nocivos del surfactante sobre el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables. Por el contrario, se ha encontrado una relación directa entre la tasa de biotransformación del LAS y la densidad de microorganismos en el suelo (Fig 4.4), coincidente con las observaciones experimentales de Jurado *et al.* (2006). Asimismo, y de acuerdo con los resultados obtenidos por Finge and Schöberl (1989), Kneabel *et al.* (1990), Holt *et al.* (1989), Larson *et al.* (1989), Marcomini *et al.* (1989), Waters *et al.* (1989), Brandt *et al.* (2003) y Jacobsen *et al.* (2004), nuestro estudio pone de manifiesto que una vez se ha aplicado el LAS al suelo de labor éste es rápidamente transformado y no sufre procesos de acumulación de año en año. Estos resultados son congruentes con las apreciaciones de autores como Atlas and Bartha (2002), según los cuales el LAS constituye una molécula sintética de biodegradación sencilla si se compara con los surfactantes que le precedieron (BAB/BABS), de características mas refractarias frente a la biodegradación.

Aislamiento de microorganismos a partir de suelo agrícola adicionado de LAS

La fertilidad de un suelo agrícola está íntimamente ligada a su microbiota particular y a las relaciones que existen entre los grupos microbianos involucrados en los ciclos de los nutrientes, los cuales son esenciales para el funcionamiento y la evolución normales del suelo (Paul, 2006). En este contexto, el principal efecto biológico del LAS consiste en la disrupción de biomembranas y la desnaturalización de proteínas. En los microorganismos, la adsorción del LAS produce la despolarización de las membranas celulares y, consecuentemente, reduce la adsorción de nutrientes y modifica la liberación de sustancias del metabolismo celular. Jensen (1999) detectó estos efectos a concentraciones de LAS entre 10-50 mg LAS/kg de suelo. De acuerdo con los resultados de nuestros experimentos, podemos sugerir que la adición de LAS a un suelo agrícola afecta a la viabilidad de la microbiota y a la diversidad de las bacterias heterotróficas cultivables. De esta manera, se puede considerar que dosis a partir de 50 mg/l de LAS afectan de forma negativa a determinados microorganismos del suelo. Conclusiones similares han sido previamente sugeridas por Wilke (1997).

Hartmann (1996) sugiere que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los Sulfonatos de Alquilbenceno Lineales (LAS) que las bacterias Gram negativas, posiblemente debido a que la membrana externa que protege a estos microorganismos les permite resistir concentraciones más elevadas de estos compuestos. Por el contrario, Lee (1970) describió una mayor resistencia al LAS en las bacterias Gram positivas respecto a las Gram negativas. Sin embargo, más recientemente Elsgaard *et al.* (2001c) han demostrado que ambos grupos de bacterias (Gram positivas y Gram negativas) son susceptibles al LAS. En este contexto, nuestros estudios demuestran que tanto las bacterias Gram positivas como Gram negativas interactúan con el LAS en el suelo, y sugieren que probablemente sean las bacterias Gram positivas las más sensibles a la aplicación de este tensioactivo.

De nuestras experiencias se desprende que existe un comportamiento diferencial de ciertas bacterias aisladas a partir de suelos adicionados con 10 mg/l de LAS si son sometidas a dosis de 50 mg/l de LAS. De esta manera, hay cepas como *Bacillus cereus*

(LAS02 y LAS03) que resisten concentraciones de 10 mg/l de LAS pero no son capaces de sobrevivir ante concentraciones de 50 mg/l de LAS. En resumen, frente al incremento de concentración de LAS en el suelo, se detectó una disminución del crecimiento en algunas cepas (*Bacillus cereus*, LAS02 y LAS03), tolerancia en otras (*Staphylococcus epidermidis* LAS06 y LAS08, *Acinetobacter* sp. LAS04 y *Pseudomonas aeruginosa* LAS01) y, finalmente, estimulación del crecimiento en el caso concreto de las cepas de *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 ensayadas en nuestro estudio (Fig 4.6 a 4.14). Por tanto, resulta evidente que la microbiota cultivable del suelo objeto de estudio puede presentar distinta sensibilidad al LAS y, lógicamente, el incremento de la concentración de este tensioactivo puede afectar a la biodiversidad del ecosistema.

Estas afirmaciones se pudieron comprobar de forma más concluyente al incrementar la concentración de LAS en el suelo hasta alcanzar 500 mg/l. Solo *Enterobacter aerogenes* LAS09 fue capaz de tolerar la presencia de esta concentración de LAS en los medios de cultivo, lo cual puso de manifiesto la alta capacidad de resistencia de este microorganismo a una sustancia tensioactiva con una marcada actividad antibacteriana.

Pese a la alta resistencia de *Enterobacter aerogenes* LAS09 al LAS, este microorganismo no parece que tenga la capacidad de utilizar este compuesto como única fuente de carbono y energía (Fig 4.20). En definitiva, podemos hablar de una elevada resistencia ó tolerancia de *Enterobacter aerogenes* LAS09 al LAS, factor este de una gran importancia ambiental.

El proceso de biodegradación aeróbica del LAS ha sido descrito en diversas ocasiones (VanGinkel, 1996; Marcomini *et al.*, 2002). No obstante, su biotransformación anaeróbica no ha sido demostrada claramente hasta el momento. Al ser el suelo un hábitat formado por muy diversos microambientes sometidos a distintas concentraciones de oxígeno, podríamos sugerir que en ciertos microhabitats anaerobios o microaerófilos se podría originar una cierta acumulación de LAS, que determinaría un efecto tóxico sobre la microbiota bacteriana. En estos habitats con baja disponibilidad de O₂, microorganismos como *Enterobacter* spp. (anaerobios facultativos) encontrarían un medio favorable para su enriquecimiento en detrimento de otros microorganismos. Ello podría afectar al equilibrio de

los ciclos biogeoquímicos en estos microhabitat y en consecuencia afectar a la estabilidad de estos sistemas.

Las curvas de crecimiento en medios de dializado de suelo realizadas para *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 demuestran un incremento significativo de su crecimiento en presencia de 50 mg/l de LAS (Fig 4.15, 4.16 y 4.17). Además, cepas bacterianas de estas mismas especies han sido descritas como microorganismos que normalmente exhiben capacidad de biodegradación de compuestos aromáticos (López *et al.*, 2005). Los medios de dializado de suelo han sido usados en múltiples ocasiones en microbiología ambiental, ya que reproducen con más fidelidad las condiciones encontradas por los microorganismos en el suelo que los medios de cultivo convencionales (González-López and Vela, 1981). Por ello, el hecho de que estos microorganismos vean favorecido su crecimiento en presencia de 50 mg/l de LAS al ser cultivados en dichas condiciones, parece sugerir un efecto estimulante sobre su actividad biológica en habitats naturales, conclusión que puede ser de importancia para entender los efectos que ciertas concentraciones de LAS pueden ejercer sobre los suelos agrícolas.

El efecto positivo que originó la presencia de LAS sobre el crecimiento de *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 en medio de dializado de suelo, podría ser indicativo de la posible biotransformación de estas sustancias por los microorganismos para su empleo como fuentes de C y energía, o bien ser debido a algún efecto indirecto sobre las condiciones de cultivo. Nuestros resultados no parecen indicar que *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 posean la capacidad de biotransformar LAS en medios de dializado de suelo (Fig 4.18, 4.19 y 4.20). Así, la disminución observada en la concentración de LAS en los medios de cultivo ocurre independientemente de la existencia o no de microorganismos en el medio, así como de la incubación de los medios de cultivo con suspensiones bacterianas vivas o muertas. Es por tanto previsible que la disminución en la concentración de LAS sea más atribuible a causas no relacionadas con la actividad biológica, tales como procesos físicos.

Como ya se indicó con anterioridad, el LAS puede ser degradado con cierta facilidad por consorcios bacterianos bajo condiciones aeróbicas (VanGinkel, 1996; Hrsak and Grbic-Galic, 1995; Hrsak, 1996; Jiménez *et al.*, 1991; Sigoillot and Nguyen, 1990,1992). Sin embargo, el LAS resulta difícil de degradar por un único microorganismo en cultivo puro. A diferencia de lo que ocurre en el caso de otros xenobióticos (Somerville, 1978; Stevenson and Leonardson, 1992; Pozo *et al.*, 1995) la identidad de los consorcios responsables del cometabolismo del LAS está aún poco documentada.

Los medios de dializado de suelo se preparan introduciendo en membranas de diálisis (corte molecular de 14 kDa) una determinada cantidad de suelo (normalmente 10g) y éstas se disponen en 50 ml de agua destilada. Es bien conocido que el LAS sufre procesos de adsorción por la fracción orgánica del suelo (Cserhádi *et al.*, 2002; Linz *et al.*, 1987; McAvoy *et al.*, 1994). En base a todo ello, resulta posible sugerir que la disminución de la concentración de LAS observada en los medios de dializado de suelo sea consecuencia de la adsorción que, a lo largo del tiempo, va teniendo lugar por la materia orgánica presente en el suelo utilizado para la preparación de los medios de cultivo.

Si bien nuestros resultados indican que *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 no poseen la capacidad para biotransformar LAS bajo las condiciones de este estudio, resulta también evidente que el crecimiento de estos microorganismos se estimula al ser cultivados en medios de dializado de suelo enriquecidos con 50mg/l de LAS (Fig 4.15, 4.16 y 4.17). La causa de este hecho puede encontrarse en el incremento de algunos nutrientes liberados desde el suelo tras la adición del tensioactivo. En este sentido, los medios de dializado de suelo son sistemas oligotróficos (González-Lopez and Vela, 1981) en los que el crecimiento microbiano se encuentra limitado no solamente por la disponibilidad de carbono, sino especialmente por la cantidad de fósforo. Así, incrementos en la concentración disponible de estos nutrientes pueden determinar efectos claramente positivos sobre el crecimiento bacteriano.

El P es ampliamente reconocido como factor limitante en el crecimiento microbiano del suelo (García *et al.*, 2003). Nuestros resultados demuestran que la adición de LAS a los medios de dializado de suelo determina un incremento de los compuestos fosforados

solubles en el sobrenadante, lo cual origina una mayor disponibilidad de estos para los microorganismos (Fig 4.22). Posiblemente, este efecto es consecuencia de la capacidad tensioactiva del LAS. De esta manera, al ser *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09 microorganismos capaces de tolerar una concentración de 50 mg/l de LAS en el medio de cultivo, y al favorecer este compuesto tensioactivo la liberación y solubilización de determinados nutrientes, el resultado final es una mayor disponibilidad de los mismos en el medio, que favorece el crecimiento de las cepas estudiadas. Esta consecuencia de las propiedades surfactantes del LAS sobre la movilización de nutrientes desde el suelo ha sido propuesta previamente por Elsgaard *et al.* (2001c).

Estudios de biotransformación e impacto del LAS mediante el empleo de microcosmos edáficos

De todos los parámetros que aportan información sobre la calidad de un suelo, los relativos a su composición biológica y actividad metabólica son los que presentan una mayor sensibilidad frente a procesos de contaminación (García *et al.*, 2003). Como contraposición, las componentes física y química del suelo pueden considerarse relativamente estables, de forma que cualquier impacto en el suelo es detectado en primer lugar por variaciones en su dinámica biológica. En este contexto, nuestro estudio en microcosmos edáficos experimentales sobre el proceso de biotransformación del LAS y su impacto sobre la comunidad microbiana permitió diferenciar distintos tipos de respuestas de los microorganismos frente a la presencia de LAS en el suelo.

El hecho de que, bajo las mismas condiciones ambientales y características edáficas, la concentración de LAS en los microcosmos A (columnas previamente autoclavadas) fuera significativamente superior a la medida en los microcosmos B (columnas sin esterilizar) puso de manifiesto el proceso de biotransformación del surfactante (Figs. 4.24 y 4.25). Este proceso alcanzó su mayor intensidad a partir de los 14 días de experimentación en el caso del ensayo con 10 mg/l de LAS, y a partir de los 7 cuando se usaba un influente adicionado de 50 mg/l.

De forma análoga a los resultados obtenidos en nuestra serie de estudios de campo, el LAS añadido a los distintos microcosmos edáficos a través del influente quedó preferentemente retenido en la zona superior de la columna. Estudios elaborados en microcosmos de similares características a los aquí empleados (Jacobsen *et al.*, 2004), revelaron el mismo patrón de distribución del tensioactivo en la columna experimental, con máximas concentraciones registradas en los primeros 15 cm y un transporte no significativo hacia las capas inferiores. El hecho de no encontrar concentraciones significativas de LAS en las capas profundas de los microcosmos se debe principalmente al rápido proceso de biotransformación que el compuesto sufre en la zona superior del suelo, tal como quedó puesto de manifiesto en apartados anteriores de este estudio (ensayo *in situ*). El primer homólogo de degradación del LAS registrado en el efluente del microcosmos A fue el C10 (Fig 4.23), debido a que los homólogos de cadena más larga resultan más fácilmente biodegradables cuando se encuentran en el agua intersticial, y una vez adsorbidos a las partículas edáficas son retenidos con mayor fuerza que los homólogos de cadena corta. Jacobsen *et al.* (2004) obtienen resultados similares, obteniendo las mayores vidas medias para los homólogos de cadena larga retenidos en las capas superiores del microcosmos.

Nuestros resultados revelan que existe una relación directa entre la concentración de LAS en el influente vertido sobre los microcosmos y el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables detectados en estos sistemas. De esta manera, los recuentos efectuados (principalmente en medio TSA 10%) a partir de las muestras recogidas en las zonas superiores de los microcosmos sometidos a influentes adicionados de distintas concentraciones de LAS (10 y 50 mg/l de LAS), siempre fueron significativamente superiores a aquellos realizados sobre muestras procedentes de los microcosmos que sólo recibían agua (microcosmos C) (Fig 4.26 y 4.27). De igual manera, el recuento de microorganismos en las columnas tratadas con influentes adicionados de 50 mg/l de LAS fue significativamente superior a la registrada en las columnas sometidas a influentes adicionados con 10 mg/l de LAS (Fig 4.28 y 4.29). Tras un vertido de lodos con altas concentraciones de LAS, Brandt *et al.* (2003) describieron incrementos significativos en la comunidad microbiana heterotrófica del suelo solapados con la degradación del 90% del surfactante adicionado. En el mismo estudio se muestra una estimulación de la actividad microbiana en el área de suelo que rodea al lodo vertido. Jurado *et al.*, (2006) observaron,

bajo condiciones experimentales *in vitro*, incrementos importantes en el número de bacterias en comunidades microbianas expuestas a la presencia de diferentes concentraciones de LAS. En este mismo contexto, Vinther *et al.* (2003) demostraron que la adición de LAS (174mg/kg) al suelo puede generar un notable incremento en el número total de las bacterias del suelo, en comparación con los valores de un suelo control libre de LAS. Según estos autores, el mencionado incremento podría ser atribuido al uso de LAS como fuente de carbono y al efecto que el LAS produciría sobre la liberación de bacterias adheridas a las partículas del suelo.

Actividades enzimáticas

El suelo constituye un sistema vivo en el que buena parte de la actividad bioquímica es desarrollada por medio de procesos enzimáticos (Overbeck, 1991; Stryler, 1995). La medida de la actividad enzimática en el suelo permite inferir la calidad del sistema y es generalmente utilizada como un adecuado indicador de la actividad microbiana del mismo (Sinsabauh, 1994; García *et al.*, 2003). Además es un indicador de cambios en las propiedades del suelo inducidos por la adición de compuestos antropogénicos (Lobo *et al.*, 2000).

Nuestro estudio con microcosmos edáficos ha revelado que las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y arilsulfatasa se caracterizaron por un patrón de distribución espacio-temporal paralelo al del recuento de microorganismos cultivables heterótrofos en las columnas experimentales, tanto en el ensayo con 10 mg/l de LAS como en el de 50 mg/l de LAS, de manera que los máximos valores de actividad enzimática siempre fueron medidos en la zona superior de las columnas y se correlacionaron positivamente con el número de microorganismos (Tabla 4.5).

Si bien en el ensayo con un influente adicionado de 10 mg/l de LAS se pudo observar que los valores medidos para las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y alcalina resultaron siempre superiores en los microcosmos tipo B (con LAS) que en los tipo C (sin LAS), estas diferencias no llegaron nunca a ser estadísticamente significativas. Por el contrario, la actividad arilsulfatasa sí presentó diferencias significativas entre las muestras

tratadas con LAS y en ausencia de LAS. La aplicación de mayores concentraciones de LAS en el influente (50 mg/l LAS) resultó en valores más elevados de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, alcalina y arilsulfatasa, y en patrones de distribución espacial y temporal caracterizados por máximos de actividad más tempranos e intensos que en el caso del ensayo con un influente adicionado de 10 mg/l de LAS. Además, en este caso las diferencias entre los valores medidos para las actividades fosfatasa ácida y arilsulfatasa en los microcosmos tipo B y C siempre fueron estadísticamente significativas (Fig 4.34 y 4.36).

A pesar de que ciertos estudios previos (Elsgaard *et al.*, 2001b) sugerían una cierta insensibilidad de la actividad arilsulfatasa frente a la adición de LAS, nuestros resultados han puesto de manifiesto que, en nuestro suelo experimental, el valor de esta actividad enzimática crece de forma significativa en presencia de LAS. Una mayor limitación del crecimiento bacteriano por formas bioasimilables del azufre en nuestro suelo frente al considerado por Elsgaard *et al.* (2001b) puede estar en la base de estas diferencias. Así, la actividad arilsulfatasa podría estar involucrada en el uso de la molécula orgánica del LAS para liberar de esta manera el azufre unido a su anillo bencénico, permitiendo a los microorganismos no sólo satisfacer su necesidad en azufre en forma bioasimilable (Dogson *et al.*, 1982) sino también colaborar de forma significativa en la biotransformación del compuesto xenobiótico (Kertesz *et al.*, 1994). De hecho, bacterias del género *Pseudomonas* (susceptible de producir sulfatasas extracelulares, González *et al.*, 2003) han sido previamente descritas como importantes piezas en el consorcio responsable de la biotransformación del LAS (Swisher, 1987; Jiménez *et al.*, 1991). Precisamente, hoy se investiga la posibilidad de uso de bacterias de este mismo género para incrementar la capacidad de movilizar las diferentes formas de S-orgánico y de esta forma acelerar *in situ* el ciclo biogeoquímico y mejorar la fertilidad de los suelos agrícolas (González *et al.*, 2003).

En un medio oligotrófico como nuestro suelo experimental, el continuo lavado de nutrientes (disueltos en el agua y/o emulsionados por el LAS) a través del efluente de los microcosmos edáficos, así como la creciente presión sobre los recursos nutricionales inducida por el aumento en el número de microorganismos cultivables, puede resultar en una importante limitación del crecimiento microbiano por carencia de fosfato en las columnas edáficas. De hecho, nuestros resultados ponen de manifiesto que la concentración

de fosfato en el efluente de los microcosmos sometidos a entradas de 50 mg/l de LAS era sensiblemente inferior al de los microcosmos con influentes de 10 mg/l de LAS, debido a que en los primeros el número de microorganismos cultivables heterótrofos era significativamente superior a los segundos y, por tanto, también lo era la presión sobre el fosfato (Fig 4.38). Ante esta limitación, las bacterias respondieron incrementando la actividad extracelular fosfatasa (principalmente fosfatasa ácida) para favorecer de esta manera la obtención de formas inorgánicas asimilables de fósforo (ión fosfato) a partir de formas orgánicas fosforadas (Speir and Ross, 1978; Dick, 1997; Criquet *et al.*, 2004).

El efecto de la disminución de fosfato por lavado en los microcosmos edáficos a lo largo del periodo de estudio quedó puesto de manifiesto por la relación positiva y estadísticamente significativa encontrada entre el número de microorganismos cultivables y la actividad fosfatasa (principalmente alcalina) en los microcosmos tipo C. Ninguna otra actividad enzimática, con la sola excepción de la arilsulfatasa en la zona superior del microcosmos sometido a un influente de 10 mg/l de LAS, se relacionó de forma significativa con el número de microorganismos cultivables en los microcosmos de tipo C (Tabla 4.5).

Las actividades arilsulfatasa y fosfatasa son consideradas como “parámetros específicos” puesto que corresponden a reacciones concretas mediadas por determinados grupos bacterianos y son dependientes de sustratos específicos. Por el contrario, la actividad deshidrogenasa es considerada como una determinación “general” ya que su medida permite tener una idea de los procesos microbianos que se producen en el suelo de manera global (Tabatai, 1994; García *et al.*, 2003). **Nuestros resultados demuestran que la actividad deshidrogenasa disminuye ligeramente en los microcosmos edáficos a medida que estos recibían influentes adicionados de LAS, estando, esta actividad correlacionada de forma negativa y estadísticamente significativa con el recuento de microorganismos cultivables en la zona superior de los microcosmos, mientras que no se detectó relación estadísticamente significativa alguna entre los recuentos de microorganismos y la actividad deshidrogenasa en los microcosmos tipo C (Tabla 4.5).** Estudios previos, como los desarrollados por Malcomes and Wölher (1983) y Elsgaard *et al.* (2001a), demostraron una disminución similar de la actividad deshidrogenasa en presencia de concentraciones crecientes de LAS. Estos resultados sugieren un cierto efecto negativo del xenobiótico sobre

los procesos microbianos del suelo a nivel general, a pesar de que la presencia de LAS favorece otros procesos más específicos, dependientes de especies o grupos de microorganismos concretos (Van Straalen and Van Gestel, 1993). Margesin and Schinner (1998) demostraron que la presencia de otro surfactante aniónico (SDS) inhibía de forma efectiva la actividad deshidrogenasa del suelo, de manera que la actividad enzimática sólo aumentó cuando se alcanzó el 90% de degradación de surfactante. El mismo estudio concluye que la medida de la actividad deshidrogenasa puede ser considerada, por tanto, como un método especialmente apropiado para la monitorización de procesos de contaminación de suelos por surfactantes aniónicos.

Estudios de biodiversidad en los microcosmos edáficos ensayados

Las actividades microbianas son responsables de los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en el suelo. Por tanto, la diversidad de los microorganismos es considerada crucial para la fertilidad y función del suelo, lo que hace necesario estudiar la variabilidad espacial y temporal de la estructura y función de las comunidades microbianas en respuesta a factores externos, tales como las prácticas agrícolas, los factores climáticos o la introducción de contaminantes (Smalla *et al.*, 2007).

En los últimos años, la aplicación de técnicas independientes de cultivo al estudio de la biología de los suelos ha supuesto un notable avance en el conocimiento acerca de la ecología microbiana de los mismos (Kirk *et al.*, 2004). El uso de estas técnicas puede contribuir de forma decisiva al conocimiento de grupos funcionales de microorganismos que juegan un papel importante en el proceso de biotransformación de contaminantes xenobióticos. De igual modo, pueden ser útiles en la identificación de aquellos otros grupos funcionales que potencialmente son afectados por la presencia del contaminante. Debido a ello, en este estudio se consideró esencial el empleo de un método independiente de cultivo para profundizar en el conocimiento del efecto del LAS sobre la biodiversidad del suelo, usando para ello la metodología PCR-TGGE, basada en la amplificación y secuenciación parcial del gen codificante del ARNr 16S, que ha sido ampliamente empleada con fines similares en los últimos años (Felske *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2001; Heuer *et al.*, 2001; Brümmer *et al.*, 2003; Vílchez *et al.*, 2007; Molina-Muñoz *et al.*, 2007).

De esta manera, con el objetivo de evaluar el impacto del LAS sobre la biodiversidad microbiana del suelo experimental contenido en los microcosmos edáficos, se realizaron estudios de los perfiles de biodiversidad del conjunto de la comunidad de las Eubacterias y, además, se obtuvieron perfiles específicos de algunos de los grupos funcionales bacterianos más representativos del suelo (Alfa-proteobacterias, Beta-proteobacterias, Acidobacterias, Bacterias Gram positivas de alto G+C, y Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio) usando para ello cebadores específicos para cada grupo (ver 3.3.8.2 de Material y Métodos).

Aunque la técnica TGGE no es cuantitativa, diversos estudios han constatado que esta metodología sólo es capaz de detectar poblaciones que constituyan, como mínimo, un 1% de la comunidad total (Muyzer and Smalla, 1998). Este umbral limita la detección de ADN amplificado a partir de células muertas o poblaciones poco numerosas, por lo que se ha de considerar que las bandas presentes en los perfiles de TGGE son representantes de las poblaciones mayoritarias del suelo, cuyos genes para el ARN 16S se encuentran en las concentraciones más altas (Lawrence *et al.*, 2004). Si bien es evidente que esta técnica tiene limitaciones que impiden el conocimiento de la diversidad completa de un hábitat tan complejo como el suelo, su gran aportación es la posibilidad que ofrece para analizar y comparar simultáneamente un número elevado de muestras, siendo una herramienta muy valiosa en estudios ecológicos (Smalla *et al.*, 2007).

Los estudios hasta ahora realizados acerca del efecto del LAS sobre las microbiota del suelo se han basado sobre todo en la evaluación global de la actividad microbiana mediante la estimación de la respiración basal e inducida por sustrato, así como de ciertas actividades enzimáticas y perfiles fisiológicos (Elsgaard *et al.*, 2001a; Brandt *et al.*, 2003; Vinther *et al.*, 2003). Sin embargo, los estudios sobre la composición específica de la comunidad bacteriana heterotrófica en suelos expuestos al LAS son aún muy escasos (Elsgaard *et al.*, 2001c), y no existen referencias bibliográficas relativas a la evaluación del impacto del LAS sobre la composición de la comunidad microbiana del suelo que estén basados en la aplicación de técnicas moleculares. Por tanto, la aproximación experimental utilizada en este trabajo y basada en el análisis pormenorizado del impacto del LAS sobre

distintos grupos funcionales bacterianos supone un novedoso avance en esta línea de investigación.

Un primer estudio general sobre el perfil de biodiversidad del conjunto de la comunidad de las Eubacterias puso de manifiesto un patrón complejo por el elevado número de bandas obtenidas y por la similitud en los perfiles correspondientes a las distintas muestras de suelo (Fig 4.39). El análisis del dendrograma generado de este gel segregó las muestras en tres clusters (Fig 4.40): (i) aquellas que habían sufrido la presencia de *LAS* a elevada concentración (50 mg/l) durante 21 días, (ii) aquellos que habían tenido contacto con el *LAS* a distintas concentraciones y durante diferentes tiempos y, por último, (iii) aquellos otros que no habían mantenido nunca contacto con el surfactante. Son observables variaciones de la intensidad de las bandas, en especial en el suelo tratado con la concentración más alta de *LAS* durante 21 días. No obstante, no se apreciaron cambios drásticos de los patrones de bandas en aquellas muestras de suelo tratadas con *LAS* (microcosmos B) respecto a las muestras no tratadas (microcosmos C). Por todo ello, de este primer análisis podemos concluir que la presencia de *LAS* induce variaciones significativas en los perfiles de biodiversidad (especialmente a la concentración más alta ensayada), si bien no parece tener efectos negativos radicales sobre la comunidad de Eubacterias.

Al objeto de estudiar en mayor profundidad las variaciones producidas en las comunidades microbianas de los microcosmos tratados con *LAS*, se efectuaron estudios de la diversidad de comunidades de grupos específicos de microorganismos del suelo. Estos estudios incluyeron el análisis detallado de 4 de los grupos de microorganismos procariotas considerados más abundantes en el suelo: Alfa y Beta proteobacterias, bacterias Gram-positivas de alto G+C y Acidobacterias (Buckley and Schmidt, 2003).

Las Proteobacterias son con frecuencia referenciadas como el grupo más abundante de bacterias presentes en el suelo (Sun *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2007). Dentro de las Proteobacterias, las Alfa-proteobacterias a su vez se observan usualmente como el grupo dominante (Buckley and Schmidt., 2003, Lipson and Schmidt., 2004). Por esta razón, en este trabajo se incluyó el estudio de las comunidades de las Alfa y Beta-proteobacterias

basado en el empleo de cebadores específicos para estos grupos microbianos, previamente descritos y utilizados con éxito en otros estudios moleculares de la diversidad de suelos (Gomes *et al.*, 2001). Sin embargo, en el curso de este estudio el cebador para las Beta-proteobacterias no proporcionó la especificidad necesaria, a pesar de haber sido aplicadas en las reacciones de PCR las mismas condiciones descritas en trabajos previamente publicados (Gomes *et al.*, 2001). Una de las dificultades existentes para el empleo de dicho cebador en este estudio fue la necesidad de utilizar su reverso complementario para poder abarcar la región hipervariable V3, empleada como diana para la generación de los perfiles de TGGE. Es probable que el empleo del cebador reverso complementario requiera un reajuste adicional de las condiciones de la reacción de PCR para evitar amplificaciones inespecíficas. La puesta a punto de las condiciones de PCR que garanticen una mayor especificidad, o incluso el diseño de nuevos cebadores específicos del grupo de las Beta-proteobacterias que permitan trabajar más adecuadamente con la región V3, son opciones que superan los límites de los objetivos propuestos en este trabajo, aunque serán contempladas en futuros estudios.

En lo referente al estudio de las comunidades de Alfa-proteobacterias en los microcosmos analizados, los perfiles de TGGE obtenidos tuvieron una complejidad considerablemente inferior a la de aquellos generados mediante los cebadores universales para las Eubacterias (Fig 4.43). De este modo, fue posible la identificación de un alto número de las poblaciones representadas en el gel, que demostró la dominancia en el suelo analizado de poblaciones relacionadas con géneros de las familias *Rhizobiaceae*, *Methylocystaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Brucellaceae*, *Bradyrhizobiaceae* y *Caulobacteraceae*, todas ellas consideradas comunes en el suelo (Garrity, 2005; Sait *et al.*, 2002).

En el caso de las Alfa-proteobacterias, el análisis de clusters de los perfiles generados demostró una clara influencia del tratamiento con LAS (a las dos concentraciones ensayadas) sobre la diversidad de las poblaciones microbianas afiliadas a este grupo existentes en el suelo (Fig 4.44). La adición continua de LAS provocó cambios significativos de la composición de esta comunidad microbiana, particularmente en la zona superior de los microcosmos, donde se aprecia el acusado impacto del xenobiótico por el importante

incremento de la intensidad de una de las bandas detectadas (banda 09b). La secuencia de la banda 09b y de todas las que migraron a su misma altura en el gel se identificó como filogenéticamente próxima al género *Phenylobacterium* (Familia *Caulobacteraceae*). La última edición del Manual Bergey's de Sistemática Bacteriana sólo reconoce una especie dentro del género, *P. immobile* (Eberspächer, 2005), aunque actualmente existen otras tres especies validadas (*P. lituiforme*, *P. koreense*, *P. falsum*) y dos no validadas (*P. mobile*, *P. zucineum*) afiliadas al mismo género, todas ellas de muy reciente descripción (Ke *et al.*, 2003, Kanso and Patel, 2004, Aslam *et al.*, 2005, Tiago *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2007). Todas las especies de *Phenylobacterium* descritas hasta la fecha han sido aisladas de suelo o aguas, a excepción de *P. zucineum* que es un patógeno intracelular humano (Zhang *et al.*, 2007).

La secuencia de la región V3 correspondiente a la población representada por la banda 09b se agrupó en el mismo cluster que las especies *Phenylobacterium koreense* y *P. falsum* y la especie no validada *P. mobile*. La secuencia de otra banda presente en todas las muestras analizadas (banda 07a/05b) también se relacionó con el género *Phenylobacterium*, si bien esta banda no sufrió variaciones significativas de su intensidad relacionadas con el tratamiento con LAS, y su secuencia se agrupó en el mismo cluster que la especie tipo *P. immobile* y la especie *P. lituiforme*, aislada de aguas termales (Kanso and Patel, 2004). Por tanto, parece evidente que el efecto del LAS sobre *Phenylobacterium* se limita a determinadas poblaciones de este género.

Aunque el TGGE no es una técnica cuantitativa debido a que está influenciada por la reacción de PCR, las variaciones de la intensidad de una misma banda en las diferentes muestras están directamente relacionadas con cambios en su abundancia relativa en la composición de la comunidad bacteriana (Brüggemann *et al.*, 2000; Stamper *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005). En comunidades microbianas de enorme complejidad y diversidad genética, como es el caso de las existentes en el suelo, los perfiles moleculares generados mediante métodos que se fundamentan en la amplificación con cebadores universales pueden contener bandas sencillas compuestas por varias secuencias diferentes solapadas entre sí. De esta manera, las bandas de gran intensidad pueden no ser causadas por concentraciones elevadas de un solo gen en el ADN molde, sino por contribuciones de más de una población a una sola banda (Schmalenberger and Tebbe, 2003). En nuestro estudio,

hemos de descartar que este sea el caso de la banda 09b correspondiente a los perfiles de TGGE para las Alfa-proteobacterias, puesto que la banda extraída del gel y reamplificada generó una secuencia única, e idéntica a la de las bandas que migraron a la misma altura del gel en otras muestras. Por tanto, la alta intensidad de la banda parece corresponder a una elevada representación de individuos de esa población (relacionada con *Phenylobacterium koreense*/*P. falsum*) en la muestra de suelo correspondiente a la parte superior del microcosmos B tratado con 50 mg/l de LAS durante 21 días. El incremento en la intensidad de la banda correspondiente a la altura de 09b, a medida que aumenta la concentración de LAS aplicada y la duración del tratamiento, sugieren que el LAS actúa favoreciendo el crecimiento selectivo de dicha población, de manera que llega a convertirse en mayoritaria dentro del grupo de las Alfa-proteobacterias, hasta el punto de enmascarar casi por completo al resto de poblaciones de Alfa-proteobacterias, que en estas condiciones parecen suponer porcentajes de la comunidad por debajo del umbral de detección de la técnica TGGE (<1%).%). A destacar que no se aprecia aumento de intensidad de bandas situadas a la misma altura en el gel que la banda 09b en los muestreos realizados en la zona inferior de las columnas, con excepción del muestreo tras 21 días de tratamiento con 50 mg/l de LAS (banda 08b), cuando la concentración del surfactante en el suelo de la zona inferior de las columnas del microcosmos estéril está cercana a los 50 mg/kg suelo, a diferencia del resto de muestreos realizados en la zona inferior de las columnas estériles, donde la concentración de LAS detectada es muy inferior (Figs. 4.24 y 4.25).

Todos estos datos sugieren la posibilidad de que la población representada por la banda 09b en el suelo estudiado tenga capacidad metabólica para consumir LAS como única fuente de C y energía, contando por tanto con una ventaja competitiva en el suelo, que le permite convertirse en una población numéricamente dominante tras el tratamiento prolongado con LAS. Esta hipótesis está además sustentada por el hecho de que la concentración de LAS acumulado en la zona superior de los microcosmos estériles tratados con 50 mg/l del surfactante durante 21 días fue cercana a los 300 mg/kg de suelo, concentración que prácticamente se redujo a cero en los microcosmos no estériles, que estaban enriquecidos considerablemente en la población representada por la banda 09b (Fig. 4.25). Estos datos nos indican igualmente que la población representada por la banda 09b y afiliada al género *Phenylobacterium* puede jugar un papel importante en la

transformación biológica del LAS en el suelo estudiado, bajo las condiciones impuestas en nuestros ensayos, si bien son necesarios estudios adicionales para confirmar completamente esta hipótesis.

La descripción del género *Phenylobacterium* actualmente recogida en la versión más reciente del Manual Bergey's de Sistemática Bacteriana (2005) requiere de una urgente revisión, dado el número de especies recientemente descritas y validadas que no están incluidas en dicha descripción, y las importantes diferencias observadas entre ellas, que sugieren una variabilidad importante de estos microorganismos aún no totalmente conocida (Kanso y Patel, 2004, Aslam *et al.*, 2005, Tiago *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2007). La especie tipo, *P. immobile*, única recogida en el Manual Bergey's, se describe como un microorganismo caracterizado por su alta especialización nutricional, pues se trata de bacterias que no emplean la mayoría de los azúcares, alcoholes, aminoácidos y ácidos carboxílicos como fuentes de C (siendo por tanto incapaces de crecer en medios de cultivo ordinarios), pero que crecen bien utilizando como fuente de C los compuestos aromáticos cloridazón (herbicida) y antipirina (fármaco antipirético), así como el aminoácido fenilalanina (Eberspächer, 2005). No obstante, las especies *P. falsum* y *P. lituiforme* son metabólicamente mucho más versátiles y son capaces de emplear una amplia gama de compuestos como fuentes de C, y ni estas dos especies ni *P. koreense* crecen empleando antipirina como fuente de C (Kanso and Patel, 2004, Aslam *et al.*, 2005, Tiago *et al.*, 2005). Todas las especies descritas destacan por su baja tolerancia al sodio, con óptimos de crecimiento a concentraciones por debajo del 0.05%.

Existe la descripción de una cepa de *Phenylobacterium* (cepa G26) aislada de suelos en China, que comparte las características de alta especialización nutricional de *P. immobile*, estando documentada también su capacidad para utilizar LAS como única fuente de C en cultivo puro (Ke *et al.*, 2003). Esta cepa se ha identificado en el mismo artículo como perteneciente a una nueva especie, *P. mobile*, si bien la publicación correspondiente está disponible solamente en el idioma original (chino), y este nombre hasta la fecha no ha sido adecuadamente validado. En el árbol filogenético generado en este trabajo, la secuencia correspondiente a la banda 09b (y a todas las bandas secuenciadas que migraron

a la misma altura) se agrupa en el mismo cluster que la secuencia de *P. mobile*, junto a *P. falsum*/*P. koreense* (Fig. 4.45).

La escasa versatilidad metabólica de la mayoría de las especies descritas de *Phenylobacterium* y su intolerancia al sodio explicarían la dificultad para aislar los microorganismos correspondientes a la población representada por la banda 09b en los cultivos de enriquecimiento llevados a cabo en otras fases de este trabajo. Los datos proporcionados por los estudios realizados a nivel molecular nos permitirán en el futuro diseñar un método de enriquecimiento y aislamiento adecuado, dirigido a conseguir el cultivo bajo condiciones de laboratorio de cepas aisladas de la población representada por la banda 09b, y determinar si poseen o no la capacidad de biodegradar parcial o totalmente el LAS empleándolo como única fuente de C en cultivo puro. Como se ha mencionado con anterioridad, estudios previos muestran la dificultad de esta molécula para ser degradada por un único microorganismo, siendo lo habitual su degradación por consorcios microbianos complejos (ver apartado 1.4.1.5. de la Introducción), por lo que la caracterización de nuevas cepas capaces de emplear el LAS en cultivo puro como única fuente de C y energía es de gran interés.

Las bacterias Gram positivas de alto G+C corresponde a la clase Actinobacteria, que constituye uno de los grupos bacterianos más amplios y diversos del ecosistema edáfico, en el cual cumplen como principal función ecológica la descomposición de la materia orgánica, incluyendo la lignina y otros polímeros recalcitrantes (Heuer *et al.*, 1997; McCarthy, 1987). Las Actinobacterias comprenden entre otros el orden *Actinomycetales*, que consta hoy día de casi 200 géneros, y muchos de sus miembros desarrollan un micelio filamentoso. Una característica particular de los actinomicetales es que la reproducción lleva a la formación de esporas, que son producidas en hifas especializadas (Taxonomy Browser ncbi).

El análisis de los perfiles de TGGE específicos de este grupo realizados en el curso del estudio indica que las comunidades de bacterias Gram positivas de alto G+C no se ven influenciadas significativamente por el tratamiento continuado con LAS, a ninguna de las dos concentraciones ensayadas (Fig. 4.46). Este resultado es coincidente con la ya conocida resistencia de este grupo de organismos a la presencia de xenobióticos de diferente

naturaleza en el suelo, tales como pesticidas, metales pesados o hidrocarburos derivados del petróleo (Gremion *et al.*, 2003; Saul *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 2006).

Las Acidobacterias son descritas a menudo como las bacterias más abundantes en estudios moleculares del ambiente edáfico (Stephanie *et al.*, 2007; Janssen, 2006). En este grupo, la divergencia del gen ARNr 16S es similar a la que encontramos dentro del grupo metabólicamente diverso de las Proteobacterias (Hugenholtz *et al.*, 1998), lo cual, se traduce en una amplia gama de capacidades metabólicas por parte de las Acidobacterias que aún están pobremente descritas. Debido a esto, la inclusión del grupo de las Acidobacterias en este estudio tiene un especial interés, ya que si bien hasta la fecha tan sólo han sido descritas 4 especies cultivables afiliadas a este grupo, gracias a la introducción de las técnicas moleculares en ecología microbiana en la última década se ha probado que se trata de un Phylum coherente y enormemente diverso, a la vez que de la amplia distribución en ambientes terrestres, teniendo gran relevancia en la composición de las comunidades bacterianas edáficas, de las que llega a constituir del 30 al 50% de los organismos identificados en librerías de clones del gen codificante del ARNr 16S (Ludwig *et al.*, 1997; Barns *et al.*, 1999; Dunbar *et al.*, 1999; Quaiser *et al.*, 2003; Lipson and Schmidt, 2004; Sun *et al.*, 2004). El papel ecológico de las Acidobacterias en los ecosistemas terrestres se intuye por tanto equivalente al de las Proteobacterias y Firmicutes. Sin embargo, el efecto sobre estos microorganismos de un compuesto xenobiótico como el LAS, de extendida utilización y potencialmente tóxico, ha permanecido hasta la fecha totalmente inexplorado.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el LAS aplicado a los microcosmos edáficos de manera continua y a las dos concentraciones ensayadas no tiene un impacto significativo sobre la composición de los perfiles de biodiversidad de este grupo de bacterias (Fig. 4.47). Destaca además el hecho de que todas las secuencias de Acidobacterias identificadas en este estudio se encuentran filogenéticamente alejadas de las 4 especies cultivables descritas en este grupo. Muchos de los estudios realizados en suelos y basados en técnicas independientes de cultivo llegan a idénticas conclusiones, corroborando la gran diversidad potencial de este grupo aún poco conocido de microorganismos (Stephanie *et al.*, 2007). La aparente inocuidad del LAS sobre este grupo

bacteriano a las concentraciones aplicadas en nuestro estudio es por tanto un dato a tener en cuenta en la evaluación de la toxicidad de estos compuestos sobre la microbiota del suelo.

Como colofón a los estudios del impacto del *LAS* sobre las comunidades microbianas del suelo en los microcosmos, se trató de investigar la biodiversidad de las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio aplicando la técnica TGGE, basada en este caso en la amplificación parcial del gen estructural de la enzima amonio-monooxigenasa (gen *amoA*). El estudio de las bacterias nitrificantes en suelos y aguas se ha beneficiado particularmente con la introducción de las técnicas de biología molecular en el campo de la ecología microbiana, dado que este grupo de bacterias presenta algunas particularidades, como es el hecho de que muchos de sus integrantes son especialmente difíciles de cultivar bajo condiciones de laboratorio, y existen numerosos grupos filogenéticos que carecen de representantes cultivables (Prosser, 2007). Por otro lado, la proximidad evolutiva del grupo de las bacterias oxidadoras de amonio facilita el diseño de cebadores específicos de grupo para la amplificación de genes de interés como marcadores. Purkhold *et al.*, (2000) destacaron el valor taxonómico de la filogenia basada en *amoA/AmoA*, equivalente a la obtenida a partir de las secuencias del gen codificante del ARNr 16S.

Diversos autores han empleado con éxito el gen *amoA* como marcador filogenético para las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio en estudios publicados en años recientes (Horz *et al.*, 2000; Layton *et al.*, 2005; Nicolaisen and Ramsig, 2002; Oved *et al.*, 2001), incluyendo trabajos realizados por nuestro propio grupo de investigación aplicados al estudio de estos organismos en biopelículas y fangos empleados para el tratamiento del agua residual urbana (Gómez-Villalba *et al.*, 2006; Molina-Muñoz., 2007). En el curso del presente estudio, sin embargo, los perfiles de las comunidades oxidadoras de amonio obtenidos a partir de suelos tratados o no con *LAS* mostraron escasas bandas y de muy baja intensidad, a pesar de emplear una estrategia de PCR anidada y de concentrar las muestras antes de su separación electroforética, impidiendo sacar conclusiones sobre el efecto del xenobiótico en estas comunidades.

Los resultados obtenidos sugieren que en el suelo empleado en el estudio existía una escasa representación de poblaciones de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio, que ha limitado la amplificación de copias del gen *amoA*. (Fig 4.50). El suelo seleccionado para los estudios era un suelo no cultivado, mantenido en barbecho durante un periodo superior a 7 años, pobre en materia orgánica y macronutrientes (N, P) (Tabla 3.7). Aunque no está totalmente esclarecida la interrelación existente entre la estructura de la población de las oxidadoras de amonio y los factores medioambientales, las concentraciones de nitrato, las tasas netas de nitrificación y las estimaciones del número de bacterias oxidadoras de amonio mediante la técnica del número más probable son por lo general mucho más elevadas en los suelos cultivados que en los no cultivados (Schmidt *et al.*, 1982; Bruns *et al.*, 1999). En el suelo cultivado, las prácticas de labranza y la fertilización incrementan la disponibilidad de oxígeno, reduciendo el C orgánico disponible en el suelo al fomentar su oxidación, y favoreciendo el crecimiento de los organismos autotrofos aerobios respecto a los heterótrofos. Por otra parte, la determinación de las tasas de nitrificación en distintos suelos revela considerables variaciones, que se estiman vinculadas a una serie de factores, entre los que destacan la concentración de amonio del suelo, su temperatura, nivel de humedad y la disponibilidad de oxígeno (Robertson, 1982).



6. CONCLUSIONES

1. La distribución espacial del LAS aplicado al suelo en el experimento de campo fue heterogénea, registrándose siempre mayores concentraciones del compuesto en los primeros estratos edáficos (hasta 10 cm de profundidad). Este patrón resultó especialmente marcado durante la estación estival, mientras que en las estaciones más húmedas (especialmente en invierno) el surfactante alcanzó estratos más profundos. La comunidad microbiana cultivable (heterótrofos aerobios) se distribuyó espacialmente de manera análoga en el perfil vertical del suelo, registrándose siempre los números más elevados de microorganismos en las capas más superficiales del suelo, durante el desarrollo de todos los ensayos de campo.
2. El LAS aplicado a la parcela experimental se vio sometido a un marcado proceso de biotransformación en los ensayos realizados durante las cuatro estaciones del año, alcanzando su práctica extinción en el suelo tras un periodo máximo de 31 días. Las mayores tasas de biotransformación se registraron en verano y primavera, coincidiendo con los recuentos más altos de microorganismos (heterótrofos aerobios) y los valores más elevados de temperatura ambiente. Por el contrario, el proceso de biotransformación resultó menos eficiente en otoño y, sobre todo, en invierno.
3. Las cepas *Pseudomonas* sp. LAS05, *Delftia tsuharatensis* LAS07 y *Enterobacter aerogenes* LAS09, aisladas del suelo a partir de cultivos de enriquecimiento en presencia de 10 mg/l de LAS, se caracterizaron por una elevada resistencia a la presencia del tensioactivo, siendo *Enterobacter aerogenes* LAS09 la cepa que presentó mayor tolerancia (hasta 500 mg/l de LAS).
4. Las cepas LAS05, LAS07 y LAS09 no fueron capaces de utilizar el tensioactivo como fuente de carbono y energía, cuando se incubaron en cultivo puro y en condiciones aeróbicas en medios de dializado de suelo adicionados de 50 mg/l de LAS, aunque el LAS determinó una estimulación del crecimiento de las tres cepas, paralelamente a un incremento de la disponibilidad de los nutrientes fosforados provocada por la acción del LAS sobre el suelo contenido en los medios de cultivo. Este efecto del LAS sobre la disponibilidad de fosfatos se corroboró en los experimentos realizados en los sistemas de microcosmos edáficos.

5. En los sistemas de microcosmos edáficos tratados de manera continua con influentes adicionados de *LAS*, se puso de manifiesto la acumulación del compuesto a lo largo del tiempo en las columnas de suelo autoclavadas, mientras que en las columnas de suelo no autoclavadas se registró una notable biotransformación del surfactante. En todos los casos, el *LAS* se acumuló de forma preferencial en la zona superior de los microcosmos, y en los microcosmos no autoclavados el número de microorganismos cultivables (heterótrofos aerobios) fue siempre más elevado en la zona superior de las columnas. Por tanto, se repitieron los patrones de distribución espacial del *LAS* y de los microorganismos ya observados en los ensayos de campo.
6. El tratamiento de los microcosmos edáficos con un influente adicionado de *LAS* a la concentración de 50 mg/l determinó un incremento significativo en el suelo del número total de microorganismos cultivables (heterótrofos aerobios) y de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y arilsulfatasa, en comparación con los microcosmos no tratados con *LAS*. Sin embargo, se registraron pocas variaciones significativas de estos parámetros cuando se aplicó a los microcosmos el influente adicionado de 10 mg/l de *LAS*.
7. En la zona superior de los microcosmos edáficos tratados con las dos concentraciones de *LAS*, el número de microorganismos cultivables (heterótrofos aerobios) se correlacionó de forma positiva y significativa con los valores de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, alcalina y arilsulfatasa, registrándose por el contrario una relación inversa y estadísticamente significativa con la actividad deshidrogenasa.
8. Bajo las condiciones de este estudio, los perfiles de las comunidades microbianas generados mediante la técnica independiente de cultivo TGGE demuestran que el *LAS* no produjo variaciones significativas de la composición de las comunidades de bacterias Gram positivas de alto G+C y Acidobacterias del suelo en los microcosmos edáficos, a ninguna de las dos concentraciones de surfactante ensayadas y a lo

largo de la duración total de los experimentos (21 días). Por el contrario, las comunidades de Alfa-proteobacterias se vieron significativamente alteradas en su composición en presencia de *LAS*, especialmente en la zona superior de los microcosmos edáficos, donde la adición del surfactante determinó el enriquecimiento selectivo de una población filogenéticamente relacionada con especies del género *Phenylobacterium* (*P.koreense*, *P. falsum*, *P. mobile*). Dicho enriquecimiento fue más pronunciado a medida que se incrementó la concentración de *LAS* y la duración del tratamiento.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbonazi, F., Cachada, A., Tiziana, C., Guerra, R., Raccagni, M., Iacondini, A. (2003). Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation comparison with Microtox assay. *Chemosphere*. 53:889-897.

Abbed, R., Safi, N., Kóster, J., De Beer, D., El-Nahhal, Y., Rullkötter, J., Garcia-pichel, F. (2002). Microbial diversity of heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4):1674-1683.

Acuña, O., Peña, W., Serrano, E., Pocasangre, L., Rosales, F., Delgado, E., Trejos, J., Segura, A. (2006). Importance of microorganisms for soils quality and health. XVII Reunido Internacional da Associação para a Cooperacãonas Pesquisas sobre Banana no Caribe na América Tropical.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*. 25:3389-3402.

APHA, (2001). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edn. Edited by L.S. Clesceri, A.E. Greenberg & A.S. Eaton. Washington DC. American Public Health Association.

Aslam, Z., Im, W.T., Ten, L.N., Lee, S.T. (2005). *Phenylobacterium koreense* sp. nov., isolated from South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2001-2005.

Atlas, Ronald. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental, Madrid. Addison-Wesley Iberoamericana. 677 p.

Atlas, R. M., and Bartha, R. (2001). Microbial ecology, fundamentals and applications. Ed. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Addison Wesley Longman, Inc. Menlo Park California. p: 536.

Atlas, R. M., and Bartha, R. (2002). Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Addison-Wesley, S. A., Madrid. p:696.

Avidano, L., Gamalero, E., Cossa, G. P., Carrazo, E. (2005). Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. Applied Soil Ecology. 30:21-33.

Bardgett, R.D., Novell, R.D., Hobbs, P.J., Jarvis, S.C. (1999). Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grassland. Soil Biology and Biochemistry 31(7): 1021-1030.

Barns, S. M., Takala, S. L., Kuske, C. R. (1999). Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom Acidobacterium in the Environment. Applied and Environmental Microbiology. 65(4):1731-1737.

Barry, A., and Brown, G. O. (1996). Anionic surfactant transport characteristics in unsaturated soil. Soil Science. 161(7):415-425.

Berna, J. L., Ferrer, J., Moreno, A., Prats, D., Ruiz Brevia, F. (1989). The fate of LAS in the environment. Tenside Surfactans Detergents. 26:101-107.

Berna, J. L., Moreno, A., Ferrer, J., Bevia, F. R., Prats, D. (1989). El comportamiento del Alquilbenzeno Sulfonato Sódico (LAS) en el medio ambiente. Ingeniería química. 151-155.

Berna, J. L., and Cavalli, L. (1999). LAS: linear alkylbenzene sulfonate. Facts and figures. European Council on Studies on LAB-LAS, a CEFIC sector group.

Berth, P., and Jeschke, P. (1989). Consumption and fields of application of LAS. *Tenside Surfactants Detergents*. 26:75-79.

Bintein, S., and Devillers, J. (1994). QSAR for organic chemical sorption in soils and sediments. *Chemosphere*. 28(6):1171-1188.

BKH Consulting Engineers. (1993). The use of existing data for estimation of the maximum tolerable environmental concentration of LAS. Part I: main report. Part II: data list, BKH., Delft.(NL).

Bragadin, M., Perin, G., Raccanelli, S., Manente, S. (1996). The accumulation in lysosomes of the anionic detergent linear alkylbenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15:1749-52.

Brandt, K., Hesselsoe, M., Roslev, P., Henriksen, K., Sorensen, J. (2001). Toxic Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate on metabolic Activity, Growth rate, and microcolony Formation of *Nitrosomonas* and *Nitrospira*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2489-2498.

Brandt, K., Pedersen, A., Sorensen, J. (2002). Solid-Phase Contact Assay that uses a lux-marked *Nitrosomonas europaea* Reported strain to estimate toxicity of bioavailable Linear Alkylbenzene Sulfonate in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:30502-3508.

Brandt, K. K., Krogh, P. H., Sorensen, J. (2003). Activity and population dynamics of heterotrophic and ammonia-oxidizing microorganisms in soil surrounding sludge bands spiked with linear alkylbenzene sulfonate: a field study. *Environmental toxicology and chemistry*. 22:821-829.

Brandt, K., Jorgensen, N., Nielsen, T. H., Winding, A. (2004). Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*. 49:229-241.

Brüggemann, J., Stephen, J. R., Chang, Y. J., Macnaughton, S. J., Kowalchuk, G. A., Kline, E., White, D. C. (2000). Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixture of Microbiology and Methods. 49:111-123.

Brümmer, I. H. M., Felske, A., Wagner-Dobler, I. (2003). Diversity and seasonal variability of β -Proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature-gradient gel electrophoresis and cloning. Applied and Environmental Microbiology. 69:4463-4473.

Bruns, M.A., Stephen, J.R., Kowalchuck, G.A., Prosser, J.I., Paul, E.A. (1999) Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled and successional soils. Applied and Environmental Microbiology. 65:2994-3000

Büchs, W. (2003). Bioindicators for biodiversity and sustainable agriculture-introduction and background. Agriculture, Ecosystems and Environment. 98:1-16.

Buckley, D.H., and Schmidt, T.M. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. Environmental Microbiology. 5:441-452.

Buhl, K., and Hamilton, S.J. (2000). Acute toxicity of fire-control chemical, nitrogen chemicals, and surfactants to rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society. 129:408-18.

Campos-García, J., Esteve, A., Vázquez-Duhalt, R., Ramos, J.L., Soberón-Chávez, G. (1999). The branched-chain dodecylbenzene sulfonate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D involves a novel route for degradation of the surfactant lateral alkyl chain. Applied and Environmental Microbiology. 65:3730-3734.

Carrillo, L. (2003). Microbiología agrícola. Universidad Nacional de Salta. Argentina.

Carlsen, L., Metzton, M.B., Kjelsmark, J. (2002). LAS in the terrestrial environment. The Science of the Total Environment. 290:225-230.

Casida, L.E., Jr., Klein, D.A., Santoro, T. (1964). Soil deshydrogenase activity. *Soil Science*, 98:371-376.

Cavalli, L., Gellera, A., Landone, A. (1993). *LAS* removal and biodegradation in wastewater treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 12:1777-1788.

Cavalli, L., Clereci, R., Radici, P., Valtorta, L. (1999). Update on LAB/LAS, Tenside Surfactants Detergents. 36:254-258.

Cavalli, L., Cassani, G., Vigano, L., Pravettoni, S., Nucci, G., Lazzarin, M., Zatta, A. (2000). Surfactants in sediments. *Tenside Surfactants Detergents*. 37:282-288.

CESIO: Comisión europea de surfactantes y sus intermediarios orgánicos. (2000). Statistics, Brussels.

CESIO: Comisión europea de surfactantes y sus intermediarios orgánicos. (2006). General Assembly. Santiago de Compostela. Spain.

Chang, Q.L., Liu, H.Z., Chen, J.Y. (1994). Extraction of lysozyme, alpha-chymotrypsin, and pepsin into reversed micelles formed using an anionic surfactant, isooctane and water. *Enzyme and Microbial Technology*. 16:970-3.

Cheung, P-Y., and Kinkle, B. (2001). Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum –contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5):2222-2229.

Churaev, N.V. (2000). Progress in the studies of surface forces. *Colloids Journal*. 62:517-25.

Coello Oviedo, M.D., Sales Márquez, D., Quiroga Alonso, J.M. (2004). Influence of Linear Alkylbenzene Sulphonates (*LAS*) on Microbial Activity of Activated Sludge. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 18(4):409-415.

COM (2001). The soil protection communication. Commission of the European Communities, Bruselas.

Cortes-Lorenzo, C., Molina-Muñoz, M.L., Gomez-Villalba, B., Vilchez, R., Ramos, A., Rodelas, B., Hontoria, E., y Gonzalez-Lopez, J. (2006). Analysis of community composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. *Biochemical Society Transactions*. 34:165-168.

Cook, A.M. (1998). Sulfonated surfactants and related compounds: facets of their desulfonation by aerobic and anaerobic bacteria. *Tenside Surfactants Detergents* 35:52-56.

Criquet, S., Ferre, E., Farnet, A.M., Le Petit, J. (2004). Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biology and Biochemistry*. 36:1111-1118.

Cserhádi, T., Forgács, E., Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environmental International*. 28:337-348.

Czapla, C., and Bart, H-J. (1999). Characterization and modeling of the extraction kinetics of organic acids considering boundary layer charge effects. *Chemical Engineering and Technology*. 71:1395-9.

Daly, H. (2004). Criterios operativos para el desarrollo sostenible.
<http://www.eumed.net/cursecon/textos/Daly-criterios.htm>.

Decembrini, F., Azzaro, F., Crisafi, E. (1995). Distribution of chemical polluting factors in South Italian seas along Calabria waters (low Tyrrhenian Sea, high Ionian Sea and straits of Messina). *Water Science Technology*. 32:231-8.

De Henau, H., Mathijs, E., Hopping, W.D. (1986). Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sewage sludges, soils, and sediments: analytical determination and environmental safety considerations. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 26:2.

Del Olmo, M., Garbalo, A., Nimer, M., López, I., De Ferrer, J.A., Vílchez, J.L. (2004). Development of methodologies for different degrees of resolution of Linear Alkylbenzene Sulfonates in groundwater and wastewater by Liquid Chromatography using Sodium Dodecyl Sulphate. *Chromatographia*. 60:157-164.

Denger, K., Kertesz, M.A., Vock, E.H., Sshon,R., Magli, A., Cook, A.M. (1996). Anaerobic desulfonation of 4-tolysulfonate and 2(4-sulfophenyl) butyrate a *Clodtridium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:1526-1530.

Denger, K., and Cook, A.M. (1999). *LAS* bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur. *Journal of Applied Microbiology* 86:165-168.

De Wolf, W., and Feijtel, T. (1998). Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (*LAS*) in sludge-amended soils. *Chemosphere* 36:1319-1343.

DiCorcia, A., Samperi, R., Belloni, A., Marcomini, A., Zanette, M., Lemr, K., Cavalli, L. (1994). *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. LXXI:465-475.

Dick, W.A., and Tabatabai, M.A. (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. Metting FB Jr (Ed.). En: *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, New York. p:95-127.

Dick, R.P. (1997). Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. En: CAB International. *Biological indicators of soil health*. USA. p:21-157.

Di Toro, D. M., Dodge, L.J., Hand, V.C. (1990). A model for anionic surfactant sorption. *Environmental Science and Technology*. 24(7):1013-1020.

Dodgson, K.S., White, G.F., Fitzgerald, J.W. (1982). *Sulfatases of microbial origin*. CRC Press, Boca Ratón.

Dong, W., Eichhorn, P., Radajewski, S., Schleheck, D., Dender, K., Knepper, T.P. (2004). *Parvibaculum lavamentivorans* converts linear alkylbenzenesulphonate surfactant to sulphophenylcarboxylates, α,β -unsaturated sulphophenylcarboxylates and sulphophenyldicarboxylates, which are degraded in communities. *Journal of Applied Microbiology*. 96:630-640.

Dominguez, J.J.G. (1986). *Tensioactivos y detergencia*. Editorial Dossat, S. A., Madrid. p:166.

Duarte, G., Soares, A., Seldin, L., Araujo, W., Van Elsas, J. (2001). Analyses of bacterial community structure in sulfurous –oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3):1052-1062.

Duelli, P., and Obrist, M. (1998). Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 98:87-98.

Duineveld, B.M., Kowalchuck, G.A., Keijzer, A., van Elsas, J.D., van Veen, J.A. (2001). Analyses of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:172-178.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., Ruske, C.R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1662-1669.

Eberspächer, J. (2005). Genus IV *Phenylobacterium* Lingens, Blecher, Blecher, Blobel, Eberspächer, Fröhner, Görisch and Layh 1985, 38^{VP}. En: Garrity, G. M. (Ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Ed., Vol. 2, Part C, pp. 316-325. Springer, NY.

Eichhorn, P., and Knepper, T.P. (2002). α,β -Unsaturated sulfophenyl-carboxylate intermediates detected during aerobic degradation of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) surfactant: direct evidence for ω -oxygenation followed by β -oxidations by liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21:1-8.

Eivazi, F., and Tabatabai, M.A. (1977). Phosphatases in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 9:167-172.

Elsgaard, L., Petersen, S., Debozs, K. (2001a). Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 1. Short-term effects on soil microbiology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:1656-1663.

Elsgaard, L., Petersen, S., Debozs, K. (2001b). Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 2. Effects on soil microbiology as influenced by sewage sludge and incubation time. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:1664-1672.

Elsgaard, L., Petersen, S.O., Debozs, K., Kristiansen, I.B. (2001c). Effects of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) on soil microbiology. *Tenside Surfactants Detergents*. 38:94-97.

Elsgaard, L., Pojana, G., Miraval, T., Eriksen, J., Marcomini, A. (2003). Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates in sulfate-leached soil mesocosms. *Chemosphere*. 50:929-937.

Enciclopedia of Industrial Chemistry. (1994). Volumen A25.-Surfactants, Ed. 5°.

Enkerlin, E. (2004). ¿Que es desarrollo sustentable? Publicaciones de la Fundación para el Desarrollo Sustentable. <http://www.fundaciónsustentable.org>.

Esumi, K., Sakagami, K., Kuniyasu, S., Nagata, Y., Sakai, K., Torigoe, K. (2000). Simultaneous adsorption of sugar-persubstituted poly(amidoamine) dendrimers and anionic surfactants at the alumina/aqueous solution interface. *Langmuir*. 16:10264-8.

Ettema, C.H., and Wardle, D.A. (2002). Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution*. 17:177-183.

EUCLID: Base de datos de la Oficina Europea de Productos Químicos. (1994). EU Commission, Data sheet on LAS: CAS No. 68411-30-3.

Federle, T.W., and Schwab, B.S. (1992). Minerallization of surfactants in anaerobic sediment of a laundromat wastewater pond. *Water Research*. 26 (1):123-127.

Feijtel, T.C.J., Matthijs, E., Rottiers, A., Rijs, G.B. J., Kiewiet, A., De Nijs, A. (1995). AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. Part 1: LAS monitoring study in "de Meer" STP and receiving river "Leidsche Rijn". *Chemosphere*. 30:1053-1066.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.

Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., De Vos, W.M., Akkermans, A.D.L. (1999). Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology*. 30:137-145.

Fernández, J., Riu, J., García-Calvo, E., Rodríguez, A., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D. (2004). Determination of photodegradation and ozonation by products of linear alkylbenzene sulfonates by liquid chromatography and ion chromatography under controlled laboratory experiments. *Talanta*. 64:69-79.

Field, J.A., Barber, L.B., Thurman, E.M., Moore, B.L., Lawrence, D.L., Peage, D.A. (1992). Fate of alkylbenzene sulphonates and dialkyltetralin sulphonates in sewage-contaminated ground waters. *Environmental Science and Technology*. 26:1140-1146.

Figge, K., and Schöberl. (1989). *LAS* and the application of sewage sludge in agriculture. *Tenside Surfactants Detergents*. 26:122-128.

Flynn, S., Löffler, F., Tiedje, J. (2000). Microbial community changes associated with a shift from reductive dechlorination of *cis*-DCE and VC. *Environmental Science and Technology*, 34:1056-1061.

Freney, I.R. (1961). Some observations on the nature of organic sulphur compounds in soil. *Austrian Journal of Agricultural Research*. 12:424-432.

Freney, I.R., Melville, G.E., Williams, C.H. (1969). Extraction, chemical nature and properties of soil organic sulphur. *Journal Science, Food and Agriculture*. 20: 440-445.

García, C., Gil, F., Hernández, T., Trasar, C. (2003). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 371 pp.

Garcia, M.T., Campos, E., Dalmau, M., Illán, P., Sánchez-leal, J. (2006). Inhibition of biogas production by alkylbenzene sulfonates (*LAS*) in a screening test for anaerobic biodegradability. *Biodegradation*. 17:39-46.

Garrity, G. M. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Ed. Springer, NY.

Giger, W., Brunner, P.H., Ahel, M., McEvoy, J., Marcomini, A., Schaffner, G. (1989). Organische Waschmittelinhaltstoffe und deren Abbauprodukte in Abwasser und Klarschlamm. *Gaswasser Abwasser*, 67:111-122.

Giger, W., Alder, C., Brunner, H., Marcomini, A., Siegrist, H. (1989). Behaviour of *LAS* in sewage and sludge treatment and in sludge-treated soil. *Tenside Surfactants Detergents*. 26:95-99.

Girvan, M.S., Bullimore, J., Ball, A.S., Pretty, J.N., Osborn, A.M. (2004). Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:2692-2701.

Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schönfeld, J., Costa, R., Mendonca-Hagler, L., Smalla, K. (2001). Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and soil*. 232:167-180.

Gómez-Villalba, B., Calvo, C., Vílchez, C.R., González-López, J., Rodelas, B. (2006). TGGE análisis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Applied microbiology and biotechnology*. 72:393-400.

González-López, J., and Vela, G.R. (1981). True Morphology of the azotobacteraceae-filterable bacteria. *Nature*. 289:588-590.

Gonzalez-Mazo, E., Honing, M., Barceló, D., Gonzalez-Parra, A. (1997). Monitoring Long-Chain Intermediates Products from the Degradation of Linear Alkylbenzene Sulfonates in the Marine Environment by Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography/Ionspray Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology*. 31:504.

González, S., Navarro, M., López, J.I., Rad, C. (2003). Determinación de la actividad arilsulfatasa del suelo. En: García, C., Gil, F., Hernández, T., Trasar, C. (Eds.), *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. p:79-99.

Gremion, F., Chatzinotas, A., Harms, H. (2003). Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy-metal contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environmental Microbiology*. 5:896-907.

Hand, V.C., and Williams, G.K. (1987). Structure activity relationship for sorption of linear alkylbenzene sulphonates. *Environmental Science and Technology*. 21:370-373.

Hartmann, L. (1996). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 219.

Harris, J.A., and Birch, P. (1989). Soil microbial activity in opencast coal mine restorations. Soil use and management. 5(4):155-160.

Harrisoorn, I.M., Candau, F., Zana, R. (1999). Interactions between polyampholytes and ionic surfactants. Colloid and Plymer Science. 277:48-57.

Heinze, J.E., and Brittonm L.N. (1993). Anaerobic degradation: Environmental relevance. Vista Chemical Company at the AOCS 3º World Conference and Exhibition on Detergent. Montreux, Suiza.

HERA. (2004). Human and Environmental Risk Assessment. Risk assessment of LAS, versión nº 2.

Heuer, H., Krsek. M., Baker, P., Smalla, K. (1997). Analysys of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology. 3233-3241.

Hislop, E.C., Brnnaby, V.M., Burchill, R.T. (1977). Aspects of the biological activity of surfactants that are potential eradicanets of apple mildew. Annales of Applied Biology, 87:29-39.

Horz, H., Rotthauwe, J., Lukow, T., Liesack, W. (2000). Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amo A PCR products. Journal of Microbiological Methods. 39:197-204.

Housaindokh, M.R., Moosavi-Movahedi, A.A., Moghadasi, J., Jones, M.N. (1993). Interaction of glucose oxidase with ionic surfactants: a microcalorimetric study. International Journal of Biological Macromolecules. 15:337-41.

Hrsák, D., and Grbic-Galic, D. (1995). Biodegradation of Linear Alkyl Benzene Sulfonates (LAS) by Mixed Methanotrophic-Heterotrophic Cultures. *Journal of Applied Bacteriology*. 78:487.

Hrsák. (1996). Cometabolic transformation of linear alkylbenzenesulphonates by methanotrophs. *Water Research*. 30(12):3092-3098.

Hrsák, D., and Begonja, A. (1998). Growth characteristics and metabolic activities of the methanotrophic-heterotrophic groundwater community. *Journal of Applied Microbiology*. 85:448-456.

Hrsák, D., and Begonja, A. (2000). Possible interactions within a methanotrophic-heterotrophic groundwater community able to transform linear alkylbenzenesulfonates. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4433-4439.

Holmstrup, M., and Krofh P.H. (2001). Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:1680.

Holt, M.S., Matthijs, E. and Waters, J. (1989). The concentration and fate of linear alkylbenzene sulphonate in sludge amended soils. *Water Research* 23:749-759.

Holt, M.S., Waters, J., Comber, M.H.I., Armitage, R., Morris, G., Newberry, C. (1995). AIS/CESIO environmental monitoring program. SDIA sewage treatment pilot study on linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Water Research*. 29:2063-71.

Holt, M.S., Fox, K.K., Daniel, M., Buckland, H. (2003). LAS and Boron monitoring in four catchments in the UK contribution to GREAT-ER. *The Science of the Total Environment*. 314-316:271-288.

Huang, C., Van Bentschoten, J.E., Healy, T.C., Ryan, H.E. (1997). Feasibility study of surfactants used for remediation of organic and metal contaminated soils. *Journal of Soil Contamination*. 6:537-57.

Hugenholz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. 180:4765-4774.

Isam, H. (2001). Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*. 100:389-402.

Jacobsen, A.M., Mortensen, G.K., Hansen, H.C.B. (2004). Degradation and mobility of Linear Alkylbenzene Sulfonate and Nonylphenol in sludge-amended soil. *Journal of Environmental Quality*. 33:232-240.

Jalali-Heravi, M., and Konouz, E. (2000). Prediction of critical micelle concentration of some anionic surfactants using multiple regression techniques. A quantitative structure-activity relationship study. *Journal of Surfactants and Detergents*. 3:47-52.

Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2391-2396.

Jansen, P.H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:1719-1728.

Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23: 403-405.

Jensen, J. (1999). Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. *The Science of the Total Environment*. 226:93-111.

Jensen, J., Lokke, H., Holmstrup, M., Krog, P.H., Elgaard, L. (2001). Effects and risks assessment of linear alkyl-benzene sulfonates in agricultural soils. Probabilistic risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in sludge-amended soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:1690-1697.

Jimenez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T.W., Sayler, G.S. (1991). Mineralización of linear alkylbenzene sulfonate by a 4-member aerobic bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:1566-1569.

Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G. and Lechuga, M. (2006). Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: Applications to the study of primary degradation in aerobic screening tests. *Chemosphere*. 65:278-285.

Kanso, S., and Patel, B.K.C. (2004). *Phenylobacterium lituiforme* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a subsurface aquifer, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:2141-2146.

Kantin, R., Baumgarten, M.G.Z., Cabeda, M., Beaumord, A.C. (1981). Concentration of anionic detergents in Rio Grande water (South Brasil). *Marine Pollution Bulletin*. 12:50-4.

Karsa, D.R., and Porter, M.R. (1995). *Biodegradability of surfactants*. Chapman and Hall. London.

Ke, N., Xiao, C., Ying, Q., Ji, S. (2003). A new species of the genus *Phenylobacterium* for the degradation of LAS (linear alkylbenzene sulfonate). *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 43:1-7.

Kertesz, M.A., Cook, A.M., Leisinger, T. (1994). Microbial metabolism of sulphur- and phosphorous-containing xenobiotics. *FEMS. Microbiology Review* 15:195-215.

Khaled, M., and Khleifat. (2006). Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzyme and microbial technology*. 39(5):1030-1035.

Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58:169-188.

Knaebel, D.B., Federle, T.F., McAvoy, D.C., Vestal, J.R. (1990). Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and linear alcohol ethoxylate (LAE) in 11 contrasting soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9:981-988.

Knaebel, D.B., Federle, T.F., McAvoy, D.C., Vestal, J.R. (1994). The effect of mineral and organic soil constituents on the microbial mineralization of organic compounds in a natural soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 4500-4508.

Knaebel, D.B., Federle, T.F., McAvoy, D.C., Vestal, J.R. (1996). Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: effects of preadsorption to various soil constituents. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15:1865-1875.

Kowalczyk, T.H. (1992). Auswirkungen verschiedener synthetischer Tenside auf die mikrobielle Aktivität von Böden. PhD thesis. Technischen Universität Berlin, Berlin, Germany.

Kristiansen, I.B., De Jonge, H., Nørnberg, P., Mather-Christensen, Ole., Elsgaard, L. (2003). Sorption of linear alkylbenzene sulfonate to soil components and effects on microbial iron reduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (6):1221-1228.

Kruskal, J.B. (1983). An overview of sequence comparison. In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), *Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison*, pp. 1-44 Addison Wesley.

Küchler, T., and Schnaak, W. (1997). Behaviour of LAS in sandy soils with low amounts of organic matter. *Chemosphere*. 35:153-167.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Layton, A.C., Dionisi, H., Kuo, H.W., Robinson K.G., Garret, V.M., Meyers, A., Sayler, G.S. (2005). Emergence of competitive dominant ammonia oxidizing bacterial populations in a full-scale industrial wastewater treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1105-1108.

Larson, R.J., Federle, T.W., Shimp, R.J., Ventullo, R.M. (1989). Behaviour of linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in soil infiltration and groundwater. *Tenside Surfactants Detergents*. 26:116-121.

Lawrence, M.J. (1994). Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vesicles for drug delivery. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 19:257-70.

Lawrence, J.R., Chenier, M.R., Roy, R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhorne, G.D.W., Neu, T.R., Greer, C.W. (2004). Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:4326-4339.

Lee, B.K.H. (1970). The effect of anionic and non-anionic detergents on soil microfungi. *Canadian Journal of Botany*. 48:583-589.

Leon, V.M., Gonzalez-Mazo, E., Forja, J.M. (2001). Vertical distribution profiles of LAS and their long-chain intermediate degradation products on coastal marine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:2171-2178.

Lin, B., Braster, M., Van Breukelen, M.B., Van Verseveld, H.W., Westerhoff, H.V., Röling, W.F.M. (2005). *Geobacteraceae* community composition is related to hydrochemistry and biodegradation in an iron-reducing aquifer polluted by a neighboring landfill. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:5983-5991.

Lipson, D.A., and Schmidt, S.K. (2004). Seasonal changes in an Alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:2867-2879.

Litz, N., Doering, H.W., Thiele, M., Blume, H.P. (1987). The behaviour linear alkyl benzene sulphonate in different soils: A comparison between field and laboratory studies. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 14:103-106.

Lobo, M.C., Sastre, I., Vicente, M.A., (2000). Las enzimas como medida del impacto ambiental en los suelos. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds.), *Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España*. CEBAS-CSIC. p:297-352.

López, L., Pozo, C., Calvo, C., Juárez, B., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J. (2005). Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticides removal capacities. *Ecotoxicology*. 14:299-312.

Luciani, L., Denoyel, R., Rouquerol, J. (2001). Pole(ethoxy)anionic surfactants: micellization and adsorption at the solid/liquid interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 178:297-312.

Ludwig, W., Bauer, S.H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R. (1997). Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiology Letters*. 153:181-190.

Macrae, M. (2000). The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:77-82.

Madsen, P.L., Thyme, J.B., Henriksen, K., Moldrup, P., Roslev, P. (1999). Kinetics of di-(2-ethylhexyl)phthalate mineralization in sludge-amended soil. *Environmental Science and Technology*. 33:2601-2606.

Malkomes, H.P., and Wöhler, B. (1983). Testing and evaluating some methods to investigate side effects of environmental chemicals on soil microorganisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 7:284-294.

Marcomini, A., and Giger, W. (1988). Behaviour of *LAS* in sewage treatment. *Tenside Surfactants Detergents*. 25:226-229.

Marcomini, A., Capel, P.D., Lichtensteiger, Th., Brunner, P.H., Giger, W. (1989). Behaviour of aromatic surfactants and PCBs in sludge-treated soil and landfills. *Journal of Environmental Quality*. 18:523-528.

Marcomini, A., Pojana, G., Sfriso, A., Alonso, J-MQ. (2000). Behavior of anionic and nonionic surfactants and their persistent metabolites in the Venice Lagoon, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19:2000-7.

Marcomini, A., Giacometti, A., Pojana, G. (2002). Aerobic biotransformation of linear alkylbenzene sulphonates under laboratory conditions. *Annali di Chimica*. 92(1-2): 27-40.

Marilley, L., and Aragno, M. (1999). Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*, 13:127-136.

Margesin, R., and Schiner, F. (1998). Biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate at low temperatures. *International biodeterioration and biodegradation*. 41:139-143.

Marques, E., Miguel, M., Dias, R., Melnikov, S., Khan, A., Lindman, B. (2000). Gel formation and association in systems of cationic surfactant vesicles and oppositely charged polymers. *Polymeric Preprint*. 41:737-8.

Marschner, P., Crowley, D., Yang, C.H. (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil*. 261:199-208.

Matthijs, E., and De Henau, H. (1985). Adsorption and desorption of LAS. Tenside detergents. 22(6):299-304.

Matthijs, E., and DeHenau, H. (1987). Determination of LAS. Tenside surfactants detergents. 24(4):193-199.

Matthijs, E., Holt, M.S., Kiewiet, A., Rijs, G.B. (1999). Environmental Monitoring for LAS, AE, AES, AS and soap. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18:2634-2644.

McAvoy, D.C., White, C.E., Moore, B.L., Rapaport, R.A. (1994). Chemical fate and transport in a domestic septic system: sorption and transport of anionic and cationic surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 13(2):213-221.

McAvoy, J., and Giger, W. (1985). Accumulation of linear benzenesulphonate Surfactants in Sewage Sludges. *Naturwissenschaften*. 72:429-431.

Merta, J., and Stenius, P. (1999). Interactions between cationic starch and mixed anionic surfactants. *Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects* 149:367-77.

Miyazaki, M., Torigoe, K., Esumi, K. (2000). Interactions of sugar per-substituted poly(amidoamine) dendrimers with anionic surfactants. *Langmuir*. 16:1522-8.

Mogensen, A.S., Haagensen, F., Ahring, B.K. (2003). Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22(4):706-711.

Molona-Muñoz, M. (2007). Estudio de los procesos microbianos implicados en el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante biorreactores de membrana sumergida. Departamento de Microbiología. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Molina-Muñoz, M., Poyatos, J. M., Vilchez, R., Hontoria, E., Rodelas, B., González-López, J. (2007). Effect of the concentration of suspended solids on the enzymatic activities and biodiversity of a SMB for aerobic treatment of domestic wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73:1441-1451.

Mortensen, G.K., Elsgaard, H., Ambus, P., Jensen, E. S., Groen, C. (2001). Influence of plant growth on degradation of LAS in sludge-amended soil. *Journal of Environmental Quality* 30:1266-1270.

Muramoto, S., Aoyama, I., Hashimoto, K., Kungolos, A. (1996). Distribution and fate of surface active agents in river and lake water, affected by domestic and agricultural wastewater, in an area in Japan. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Environmental Science and Engineering and Toxic and Hazardous Substance Control*. 31:721-30.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695-700.

Muyzer, G., and De Vaal, S. (1994). Determination of the genetic diversity of microbial communities using DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA. In: L. J. Stal and P. Caumette (Eds). *Microbial mats: structure development and environmental significance*. Springer-Verlag-Heidelberg, Germany. pp:207-214.

Muyzer, G., and Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73:127-141.

Muyzeer, G. (1999). DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 2:317-322.

Nannipieri, P., Pechozzini, F., Arcada, P. G., Pioranelli, C. (1979). Changes in aminoacids, enzyme activities and biomasa during soil microbial growth. *Soil Science*. 127:26-34.

Neefs, J., Van de Peer, Y., Hendriks, L., Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acid Res.* 18:2237-2242.

Neptune, A.M.L., Tabatabai, M.A., Hanway, J.J. (1975). Sulfur fractions and carbon-nitrogen-sulfur-phosphorus relationships in some Brazilian and Iowa soils. *Soil Science Society of America Proceedings* 39:51-55.

Nicolaisen, M.H., and Ramsing, N.B. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 50:189-203.

Nielsen, A.D., Borch, K., Westh, P. (2000). Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1479:321-31.

Nielsen, K.B., Brandt, K.K., Jacobsen, A.M., Mortensen, G., Sorensen, J. (2004). Influence of soil moisture on linear alkylbenzene sulfonate-induced toxicity in ammonia-oxidizing bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23:63-370.

Nimer, M., Ballesteros, O., navalón, G., Crovetto, C., Verge, C., López, I., Berna, J.L., Vílchez, J.L. (2007). New simple treatment for determination of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in agricultural soils by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analitical and Bioanalitical Chemistry*. 387:2175-2184.

Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. Nº 2.

Nunan, N., Wu, K., Young, I. M., Crawford, J. W., Ritz, K. (2003). Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 44:203-215.

Odokuma, L.O., and Okpokwasili, G.C. (1997). Seasonal influences of the organic pollution monitoring of the New Calaber river, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*. 45:43-57.

Olalde, V., and Aguilera Gómez, L.I. (1998). Microorganismos y biodiversidad. *Terra* 16(3): 289-292.

Oliveira Rodrigues, D. (2004). Evaluación de los efectos de los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales sobre la Calidad Biológica de sus cauces receptores en las cercanías de Granada. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal y Ecología, Universidad de Granada.

Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R., Minz, D. (2001). Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:3426-3433.

Overneck, J. (1991). Early studies on ecto- and extracellular enzymes in aquatic environments. En: Chróst, R.J. (Ed.), *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer. New York. p:1-5.

Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (1982). *Methods of soil Analysis: Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin USA. p:1159.

Painter, H.A. (1992). Anionic surfactants. *The Handbook of Environmental Chemistry*. 3:2-88.

Painter, H.A., and Zabel, T. (1989). The behaviour of LAS in sewage treatment. *Tenside Surfactants Detergents*. 26:108-115.

Painter, H.A., and Mosey, F.E. (1992). The anaerobic biodegradability of linear alkylbenzene sulfonate (LAS). In Third CESIO International Surfactant Congress. 34-43.

Park, J.W., and Jaffe, P.R. (1993). Partitioning of three nonionic organic compounds between adsorbed surfactants, micelles, and water. *Environmental Science and Technology*. 27:2559-66.

Patra, D.D., Brookes, P.C., Coleman, K., Jenkinson, D.S. (1990). Seasonal changes of soil microbial biomass in an arable and grassland soil which have been under uniform management for many years. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 739-742.

Paul, D., Pandey, G., Meier, C., van de Meer, J.R., Jain, R.K. (2006). Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*. 57:116-127.

Paul, E.A. (2006). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Elsevier. Third Edition. p:552.

Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 85:2444-2448.

Peix, A., Rivas-Boyer, A.A., Mateos, P.F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velásquez, E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil. Biology and Biochemistry*. 33:103-110.

Perales, J.A., Manzano, M. A., Sales, D., Quiroga, J. M. (1999). Biodegradation kinetics of surfactants in sea water. *Chemosphere*. 19 (11):1957-1969.

Perales, J.A., Manzano, M.A., Garrido, M.C., Sales, D., Quiroga, J.M. (2007). Biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulphonates in sea water. *Biodegradation*. 18:63-70.

Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C. (2003). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi-Prensa. Tercera edición. p: 281

Pozo, C., Martínez-Toledo, M.V., Salmeron, V., Rodelas, B., Gonzalez-Lopez, J. (1995). Effect of chlorpyrifos on soil microbial activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14 (2):187-192.

Pozo, C., Rodelas, B., De La Escalera, S., González-Lopez, J. (2002). D,L-Hydantoinase activity of an *Ochrobactrum anthropi* strain. *Journal of Applied Microbiology*. 92:1028-1034.

Pozo, C., Rodelas, B., Calvo, C., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J. (2003). Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) on soil microbial activity. *Scientific Journal of Food, Agriculture and Environment*. 1:348-350.

Prats, D., López, C., Vallejo, D., Varó, P., León, V.M. (2006). Effect of temperature on the biodegradation of Linear Alkylbenzene Sulfonate and Alcohol Ethoxylate. *Journal of surfactants and detergents*. 9:1.

Prosser, J.I. (2007). The ecology of nitrifying bacteria. En : *Biology of the Nitrogen Cycle*, Bothe, H, Ferguson, S.J. and Newton, W.E. (Eds.), pp. 223-243. Elsevier, The Netherlands.

Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M., Koops, H., Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and AmoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:5386-5382.

Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S.C., Treusch, A.H., Eck, J., Schleper, C. (2003). Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology*. 50(2):563-575.

Quiroga, J.M., Perales, J.A., Romero, L.I. and Sales, D. (1999). Biodegradation kinetics of surfactants in sea water. *Chemosphere* 19(11):1957-1969.

Rasiah, V., and Voroney, R.P. (1993). Assessment of selected surfactants for enhancing C mineralization of an oily waste. *Water, Air and Soil Pollution*. 71:347-56.

Reich, C., and Robbins, C. R. (1993). Interactions of cationic and anionic surfactants on hair surfaces: light scattering and radiotracer studies. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 44:263-78.

Riechers, D.E., Wax, L.M., Liebl, R.A., Bullock, D.G. (1995). Surfactant effects on glyphosate efficacy. *Weed Technology*. 9:281-5.

Riesner, D., Steger, G., Zimmat, R., Owens, R.A., Wagenhofer, M., Hillen, W., Vollbach, S., Henco, K. (1989). Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis*. 10:377-389.

Ritz, K., and Robinson, D., (1988). Temporal variations in soil microbial biomass C and N under a spring barley crop. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 625-630.

Robertson, G.P. (1982). Factors regulating nitrification in primary and secondary succession. *Ecology* 63:1561-1573.

Roberts, DW. (1991). Application of QSAR to biodegradation of LAS isomers and homologues. *Science of the Total Environment*. 109/110:301-6.

Rocha, C., and Infante, C. (1997). Enhanced oily sludge biodegradation by tensio - active agent isolated from *Pseudomona aeruginosa* USB – CS1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47:615 - 619.

Rodier. (1989). Análisis de aguas. Ed Omega Barcelona. Barcelona. p: 1059.

Romano, J.C., and Garabetian, F. (1996). Photographic records of sea-surface microlayers as a survey of pollution daily rhythm in coastal waters. *Marine Environmental Research*. 41:265-80.

Ross, D.J., Speir, T.W., Kettles, H.A., Mackay, A.D. (1995). Soil microbial biomass, C and N mineralization and enzyme activities in a hill pasture: influence of season and slow-release P and S fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1431-1433.

Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural genes *amoA* as functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:4704-4712.

Roy, D. (1988a). Effect of an anionic detergent on the lipid moieties of various cell types in the opercular epidermis of *Rita rita*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 41:352-60.

Roy, D. (1988b). Impact of detergents on the protein histochemistry of various cell types of the gill epithelium of *Rita rita*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 15:206-12.

Roy, D. (1988c). Toxicity of an anionic detergent, dodecylbenzene sodium sulfonate, to a freshwater fish, *Rita rita*: determination of LC50 values by different methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 15:186-95.

Ruff, J., Hitzler, T., Rein, U., Ritter, A., Cook, A.M. (1999). Bioavailability of water-polluting sulfonoaromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52:446-450.

Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, P.H. (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology*, 4:654-666.

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.

Sanchez Leal, J., Garcia, M.T., Tomás, R., Ferrer, J., Bengoechea, C. (1994). Linear Alkylbenzene Sulfonate removal. *Tenside Surfactants Detergents*. 31:253-256.

Sarathchandra, S.U., Perrott, K.W., Boase, M.R., Waller, J.E. (1988). Seasonal changes and the effects of fertiliser on some chemical, biochemical and microbiological characteristics of high-producing pastoral soil. *Biology and Fertility of Soils* 6: 328-335.

Saul, D.J., Aislabie, J.M., Brown, C.E., Harris, L., Foght, J.M. (2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*. 53:141-155.

Schleheck, D., Dong, W., Denger, K., Heinzle, E. and Cook, A.M. (2000). An α -proteobacterium converts linear alkylbenzenesulfonate (LAS) surfactants into sulfophenylcarboxylates, and linear alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants into sulfodiphenylethercarboxylates. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1911-1916.

Schleheck, D., Lechner, M., Schönenberger, R., Suter, M.J.F., Cook, A.M. (2003). Desulfonation and degradation of sulfodiphenylethercarboxylates from linear alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:938-944.

Schmalenberger, A., and Tebbe, C.C. (2003) Bacterial diversity in maize rhizosphere: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*. 12:251-262.

Schmidt, G., and Laskowski, M. (1961). Phosphate ester cleavage (survey). P. 3-55. In P. D. Boyer et al. (Ed). *The enzymes*. 2nd ed. Academic Press, Inc., New York.

Schmidt, E.L., and L.W. Belser. (1982). Nitrifying bacteria, p. 1027–1041. En: A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney (Ed.), *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

Schöberl, P., Bock, K.J., Huber, L. (1988). Ökologisch relevante Daten von tensiden Wasch und Reinigungsmitteln. *Tenside Surfactants Detergents*. 25:86-98.

Schöberl, P. (1989). Basic principles of *LAS* biodegradation. *Tenside Surfactants Detergents*. 26:86-94.

Schönkaes, U. (1998). *LAS*-A modern classic surfactant. *Chimica Oggi*. 9-13.

Schulz, S., Dong, W., Groth, U and Cook, A.M. (2000). Enantiometric degradation of 2-(4-sulfophenyl)butyrate via 4-sulfocatechol in *Delftia acidovorans* SPB1. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1905-1910.

Schwuger, M.J., and Bartnik F.G. (1999). Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes and membranas. In Gloxhuber C. Ed, *Anionic Surfactants-Biochemistry, Toxicology, Dermatology*, Marcel Dekker, NY, USA. 1-49.

Scott, M.J., and Jones M.N. (2000). The biodegradation of surfactans in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomenbranes*. 1508:235-251.

Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H., Kandeler, E. (2001). Microbial population structure in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:4215-4224.

Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S., Kida, K (2003). *Delftia tsuruhatensis* sp.nov., a terephthalete – asimilating bacterium isolated from activated sludge. *International.Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1479-1483.

SIDS: srceening information data set. (1999). Sponsor country: USA, Dossier on *LAS*.

SIDS: screening information data set. (2005). Sponsor country: USA, Dossier on *LAS*.

Sigoillot, J.C., and Nguyen, M.H. (1990). Isolation and characterization of surfactant degrading bacteria in a marine environment. *FEMS Microbiology Ecology*. 73(1):59-68.

Sigoillot, J.C., and Nguyen, M.H. (1992). Complete oxidation of linear alkylbenzene sulfonate by bacterial communities selected from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:1308-1312.

Simkins, S., and Alexander, N. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Applied and Environmental Microbiology*. 47:1299-1305.

Sinsabaugh, R.L. (1994). Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Biogeochemistry* 14:575-581.

Skujins, J. (1976). Extracellular enzymes in soil. *Critical Reviews in Microbiology*. 4:383-421.

Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heder, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebee, C.C. (2007). Bacterial diversity of soil assessed by DGGE, T-RFLP and SCCP fingerprint of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological methods*. 69(3):470-479.

Smith, J.L., Papendick, P.L., Bezdicek, J.F., Lynch, J.M. (1993). Soil organic matter dynamics and crop residue management. In: Meeting, F. B. Jr. (Ed). *Soil Microbial Ecology. Applications in agricultural and environmental management*. Maecell Dekker. New York. 627p.

Somasundaran, P., and Huang, L. (2000). Adsorption/aggregation of surfactants and their mixtures at solid-liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 88:179-208.

Somerville, H.J. (1978). *Pesticide, Microorganism and the environment*, Spain, 21: 1.

Speir, T.W., and Ross, D.J. (1978). Soil phosphatase and sulphatase. En: Burns, R.G. (Ed.), Soil enzymes. Academic Press, London. p:197-250.

Spencer, B. (1958). Studies on sulphatases: 20. Enzymic cleavage of arylhydrogen sulphates in presence of H₂¹⁸ O. Biochemical Journal. 69:155-159.

Stamper, D.M., Walch, M., Jacobs, R.N. (2003). Bacterial population changes in a membrane bioreactor for greywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. Applied and Environmental Microbiology. 69:852-860.

Stephanie, A.E., John, A.B., Thomas, M.S. (2007). Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the Phylum Acidobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 73(8):2708-2717.

Stevenson, J., and Leonardson, L. (1992). Effect of agricultural pesticide on denitrification in lake sediment, Proceeding of the international Symposium of environmental aspect of pesticide microbiology, swedish of agricultural sciences, Upsala, Sweden.

Stewart, W.D.E. (1991). The importance to sustainable agriculture of biodiversity among invertebrates and microorganisms. In: D L, Hawksworth (Ed). The biodiversity of microorganims and invertebrates: Its role in sustainable agriculture. Redwood Press, Melksham, UK. pp: 3-5.

Stryler, L. (1995). Biochemistry. 4th Edition. Freeman and Company, New York. p: 632.

Sun, H.Y., Deng, S.P., Raun, W.R. (2004). Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. Applied and Environmental Microbiology 70:5868-5874.

Swisher, R.D. (1963). The chemistry of surfactant biodegradation. The Journal of the American Oil Chemists Society. 40:137-140.

Swisher, R.D. (1987). *Surfactants Biodegradation* (2º Ed). Marcel-Dekker Inc. New York. E.E.U.U.

Tabatabai, M.A., and Bremner, J.M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1:301-307.

Tabatabai, M.A., and Bremner, J.M. (1970). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Proceedings*34:225-229.

Tabatabai, M.A., and Bremner, J.M. (1972). Forms of sulphur, and carbon, nitrogen, and sulphur relationships in Iowa soils. *Soil Science*. 114:380-386.

Tabatai, M. (1994). Soil enzymes. En: SSSA. *Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and biogeochemical properties* (Book series N° 5). p:775-833.

Taylor, E.W., and Nickless, G. (1999). Taired-ion high performance liquid chromatography of partially biodegraded linear alkylbenzenesulfonate. *Journal of Chromatography*. 178:259-269.

Tiago, I., Mendes, V., Pires, C., Morais, P. V., Veríssimo, A. (2005). *Phenylobacterium falsum* sp. nov., an Alphaproteobacterium isolated from a nonsaline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *Systematic and applied Microbiology*. 28: 295-302.

Tkalin, A.V. (1993). Background pollution characteristics of the N. E. Sakhalin Island shelf. *Marine Pollution Bulletin*. 26:704-6.

Toledo, F.L., Calvo, C., Rodelas, B., González-López, J. (2006). Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*. 29:244-252.

Tong, J., Nakajima, M., Nabetani, H., Kikuchi, Y. (2000). Surfactant effect on production of monodispersed microspheres by microchannel emulsification method. *Journal of Surfactants and Detergents*. 3:285-93.

Toniutti, M. A., Fornasero, L. V., Tenorio, D., Mollo, J. (1999). Evaluación de la biomasa microbiana en el proceso de recuperación de suelos. *Fave* 13(2):5-11.

Topp, E., and Starratt, A. (2000). Rapid mineralization of the endocrine-disturbing chemical 4-nonylphenol in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19:313-318.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., Ovreas, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64:53-62.

Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (3):782-787.

Turco, R.F., Kennedy, A., Jawson, M.D. (1994). Defining soil quality for a sustainable environment. *Soil Society of America (Edición especial 35)*, Madison, WI, USA.

Valtorta, L., Radici, P., Calcinai, D., Cavalli, L. (2000). Recent development of LAB/LAS. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. LXXVII:73-76.

Vann Beelen, P., and Doelman, P. (1997). Significance and application of microbial toxicity test in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere*. 4:455-499.

Van de Peer, Y., Chapelle, S., De Wachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*. 24:3381-3391.

Van Ginkel, C.G. (1996). Complete degradation of xenobiotics surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegradation*. 7(2): 151-164.

Van Straalen, N.M. and Van Gestel, C.A.M. (1993). Soil invertebrates and micro-organisms. En: Calow, P. (Ed.), Handbook of Ecotoxicology, Vol. 1. Blackwell Scientific, Oxford, U.K. p:251-277.

Van Verseveld, H.W. and Röling W.F.M. 2004. Cluster analysis and statistical comparison of molecular community profile data, p. 1-24. En G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, J. M. Head, A. D. L. Akkermans, and J. D. van Elsas (ed.), Molecular Microbial Ecology Manual, 2nd Ed.

Verge, C., Moreno, A., Bravo, J., Berna, J.L. (2001). Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). Chemosphere. 44:1749-1757.

Vílchez, R., Pozo, C., Gómez, M.A., Rodelas, B., González-López, J. (2007). Structure, biological activity and species diversity of biofilms for the removal of Cu (II) from groundwater: dominance of Sphingomonads in the copper-exposed bacterial community. Microbiology SGM. 153:325-337.

Vinther, F.P., Mortensen, G.K., Elsgaard L. (2003). Effects of linear alkylbenzene sulfonates on functional diversity of microbial communities in soil. Environmental Toxicology and chemistry. 22(1):35-39.

Vinuesa, P., Rademaker, J.I.W., De Bruijn, F.J., Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S.23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. Applied and Environmental Microbiology. 64:2096-2104.

Wang, J., Zeng, B., Fang, C., Zhou, X. (2000). The influence of surfactants on the electron-transfer reaction at self-assembled thiol monolayers modifying a gold electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry. 484:88-92.

Ward, B.B., and O'Mullan, G.D.O. (2002). Worldwide distribution of *Nitrosococcus ooceani*, a marine ammonia-oxidizing γ -proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:4153-4157.

Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., Harayama, S. (1998). Molecular detection, isolation, and physiological characterisation of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated-sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4396-4402.

Watanabe, K., Teramoto, M., Harayama, S. (1999). An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2813-2819.

Waters, J., Holt, M.S., Matthijs, E. (1989). Fate of LAS in sludge amended soils. *Tenside Surfactants Detergents*. 26:29-135.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173:697-703.

Wieland, G., Neumann, R., Backhaus, H. (2001). Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:5849-5854.

Wilke, B.M. (1997). Effects of non-pesticides organic pollutants on soil microbial activity. *Journal of Advances in Geo-Ecology*. 30:117-132.

Wuyts, J., Van de Peer, Y., Winkelmans, T., De Wachter, R. (2002). The European database on small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acid research*. 30:183-185.

www.ebi.ac.uk European Bioinformatics Institute web site.

www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc169.htm. International programme on chemical safety. Environmental Health criteria 169- Linear Alkylbenzene sulfonates and related compounds.

www.lasinfo.org.

www.ncbi.nlm.nih.gov.

www.petresa.es. PETRESA web site.

Yadav, J.S., Lawrence, D.L., Nuck, B.A., Federle, T.W., Reddy, C.A. (2001). Biotransformation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by *Phanerochaete chrysosporium*: oxidation of alkyl side-chain. *Biodegradation*. 12:443-53.

Ying, G.G. (2006). Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*. 32:417-431.

Yoshimura, K. (1984). Adsorption and biodegradation of LAS by microorganisms. *Jornadas del Comité Español de Detergencia*. 15:103-121.

Zhang, K., Han, W., Zhang, R., Xu, X., Pan, Q., Hu, X. (2007) *Phenylobacterium zucineum* sp. nov., a facultative intracellular bacterium isolated from a human erytroleukemia cell line K562. *Systematic and Applied Microbiology* 30:207-212.

Zhou, J.P., Gu, Y.Q., Zou, C.S., Mo, M.H. (2007). Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Ghizou province, east of China. *The Journal of Microbiology*. 45:105-112.

Zürrer, D., Cook, A.M., Leisinger, T. (1987). Microbial desulfonation of substituted naphthalenesulfonic acids and benzene sulphonic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:1459-1463.