

Departament de microbiologia. Facultat de biologia.

Universitat de Barcelona

# BIODEGRADACIÓ I BIOREMEDIACIÓ DE FUEL DEL *PRESTIGE*

CARACTERITZACIÓ QUÍMICA  
I COMUNITATS MICROBIANES IMPLICADES

Memòria de tesi presentada per Núria Jiménez García.

Dirigida per:

Dra. Anna Maria Solanas  
Cánovas  
Professora titular  
Dpt. de Microbiologia  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

Dr. Josep Maria Bayona  
Térmens  
Professor d'investigació  
Institut de diagnosi  
ambiental i estudis de  
l'aigua  
CSIC

Dr. Joan Albaigés Riera  
Professor d'investigació  
Institut de diagnosi  
ambiental i estudis de  
l'aigua  
CSIC

Programa de doctorat: "Microbiologia Ambiental i Biotecnologia".

Bienni 2004-2006.

# PART III





## Capítol 4

Assaig de degradació in vitro de fuel del *Prestige* per part de dos consorcis microbians al·lòctons



Díez et al. (2005) van estudiar la biodegradabilitat in vitro del fuel del *Prestige*, fent servir els consorcis microbians TD i AM, especialitzats en la degradació de gasoil i HAP, respectivament (Viñas et al., 2002), i emprant un nutrient oleofílic comercial (*S200*), com a font de nitrogen i fòsfor. En el present estudi, s'ha dut a terme un assaig de biodegradabilitat del fuel envellit en el mar (*chapapote*) per aquells mateixos consorcis, amb i sense el fertilitzant oleofílic.

## 4.1. Introducció

Tot i que els resultats de laboratori poden diferir en gran mesura dels obtinguts en experiments de camp, els assajos de biodegradabilitat in vitro són útils per determinar el tipus, concentració i freqüència de l'addició de nutrients a abocaments de petroli per aconseguir la màxima estimulació de la flora bacteriana heteròtrofa (Venosa, 1998). Fins ara s'han dut a terme nombrosos estudis de laboratori, alguns dels quals recopilats per Venosa i Zhu (2003), per tal de provar l'efectivitat de l'ús de fertilitzants comercials com l'*Inipol EAP-22* o el *Max Bac* (Lacotte et al., 1995; Swannell et al., 1995).

Així mateix, aquests experiments ajuden a predir, en un període de temps relativament curt, el grau de biodegradació d'un producte en aplicar-li diferents tipus de tractaments i contribueixen, d'aquesta manera, a conèixer el destí ambiental del producte vessat (Sigiura et al., 1997; Prince et al., 2003). També poden servir per escollir marcadors moleculars que ens permetran fer un seguiment de la biodegradació, tant en experiments posteriors de laboratori com al camp (Prince et al., 1994).

## 4.2. Degradació de les mostres

Una primera constatació en els experiments in vitro realitzats, fou que el perfil d'alcans dels controls abiòtics analitzats al cap de 20 dies d'incubació presentaven una certa degradació respecte de la mostra original, que no podia ser atribuïda exclusivament a un envelliment fisicoquímic (Figura 4.1 A). Així doncs, s'ha procedit al càlcul del seu grau de biodegradació.

### 4.2.1. Degradació de les mostres control

La biodegradació de les mostres control es veu reflectida en un canvi en les proporcions dels *n*-alcans heptadecà (C17) i octadecà (C18) respecte dels isoprenoides pristà i fità (Figura 4.1 B). Les relacions C17/pristà i C18/fità passen de 1,33 a 0,97 i de 1,19 a 0,92, respectivament, a causa de la major biodegradabilitat dels alcans linials (Wang et al., 1998). El quocient pristà/fità, en canvi, es manté inalterat (0,89).

Aquests resultats suggereixen que la mostra de fuel utilitzada, que, recordem, es tracta de *chapapote* marí, conté població microbiana degradadora d'hidrocarburs i que, per tant, els controls utilitzats no s'han comportat com a veritables controls abiòtics (estèrils).

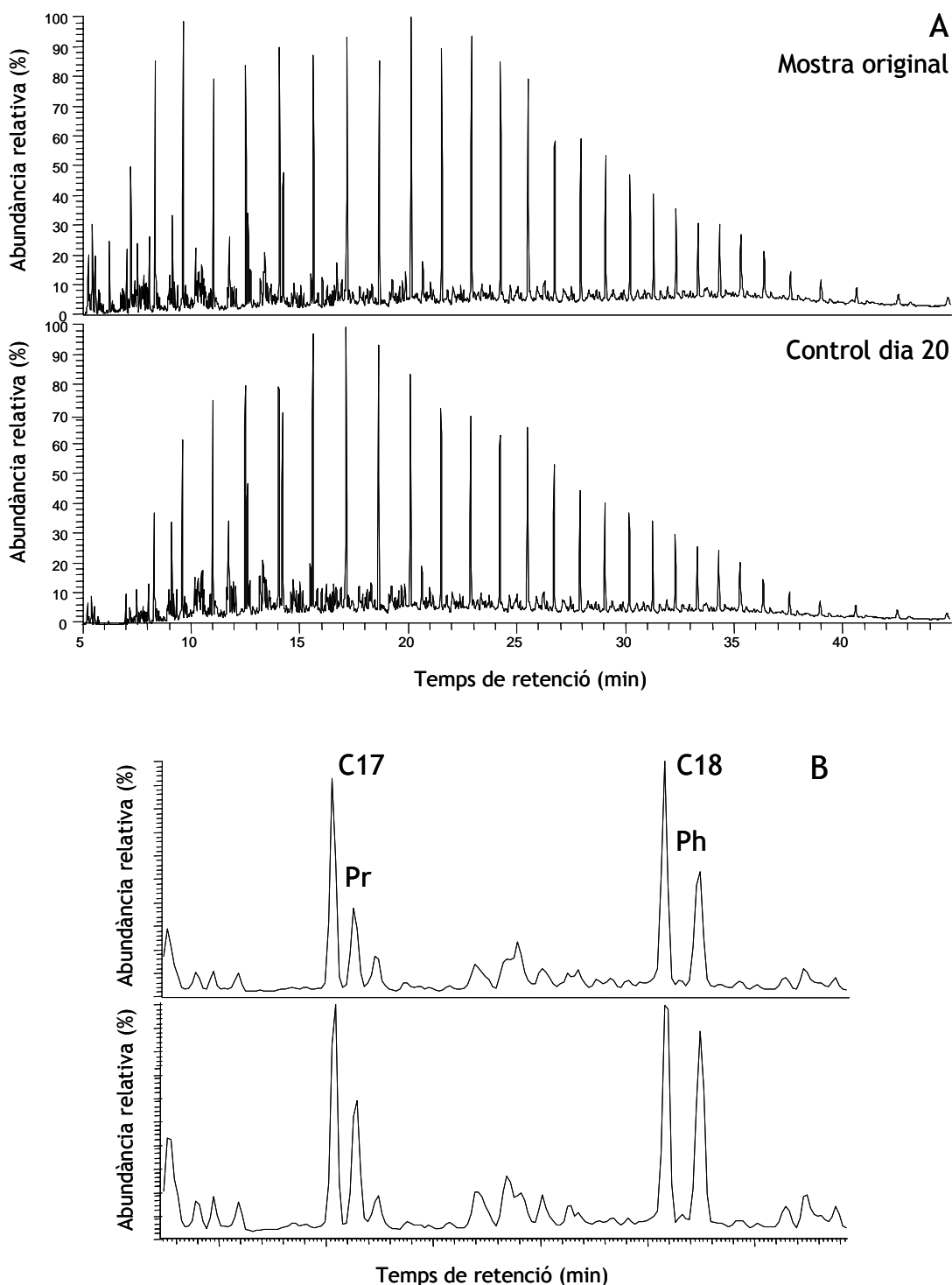


Figura 4.1. A. Fragmentograma característic dels alcans ( $m/z$ : 85) a la mostra original i la mostra control al cap de 20 dies d'incubació. B: Detall. Els pics corresponen a *n*-heptadecà, C17; pristà, Pr; *n*-octadecà, C18 i fità, Ph.

Això no obstant, en les mostres incubades amb els consorcis al·lòctons, la degradació tant d'alcans com dels hidrocarburs aromàtics policíclics s'incrementa significativament (Figures 4.2 i 4.7).

#### 4.2.2. Fracció alifàtica

Pel que fa a la fracció alifàtica, en tots els tractaments desapareixen els compostos més lleugers (<C20), en percentatges superiors al 90% (Figura 4.2). En els microcosmos amb el consorci AM i nutrients hidrofílics, la degradació dels alcans linials minva progressivament en augmentar el pes molecular, de manera que en els compostos més pesants (>C30), se situa entorn del 30% i no s'observen diferències significatives amb el control.

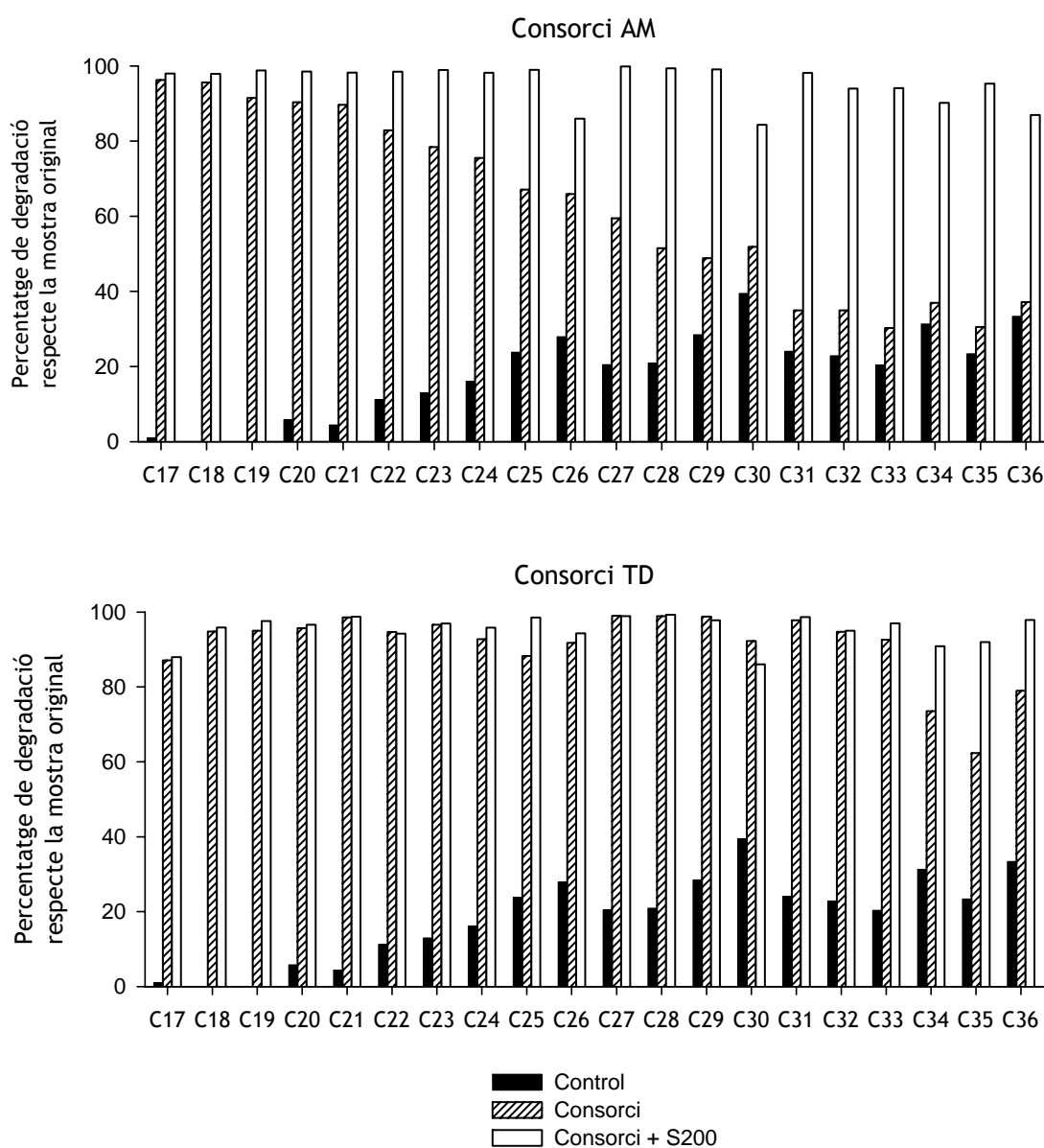


Figura 4.2. Percentatge de degradació dels alcans linials de les mostres abiòtiques amb nutrients hidrofílics: control; amb inòcul i nutrients hidrofílics: consorci, i amb inòcul i S200: consorci + S200; respecte la mostra original. Cada barra representa la mitjana de 2 rèpliques.



Ara bé, la substitució dels nutrients hidrofílics pel fertilitzant augmenta significativament la degradació produïda per aquest consorci. És probable que el fertilitzant dugui a terme un efecte tensioactiu, incrementant la solubilitat de les parafines de cadena més llarga, de manera que aquestes esdevinguin més biodisponibles per als microorganismes.

En altres estudis s'han obtingut resultats similars emprant, per exemple, biotensioactius rhamnolípid de *Pseudomonas* sp. en cru de petroli (Karpenko et al., 2006) o gasoil (Whang et al., 2007), o surfactina de *Bacillus subtilis* (Whang et al., 2007). En un treball previ dut a terme al nostre grup de recerca (Ábalos et al. 2004) es va detectar un increment en la biodegradació del cru Casablanca duta a terme, precisament, per aquest mateix consorci, en afegir un rhamnolípid de *Pseudomonas aeruginosa*.

Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, s'han efectuat mesures de la tensió superficial de solucions del producte *S200* en aigua destil·lada. La corba resultant (Figura 4.3) permet afirmar que, efectivament, el fertilitzant oleofílic actua de tensioactiu. A més, poden calcular-se la concentració micel·lar crítica en aigua ( $\approx 0,03 \text{ mg g}^{-1}$ ) i la tensió superficial a la concentració micel·lar crítica ( $\approx 34 \text{ mN m}^{-1}$ ).

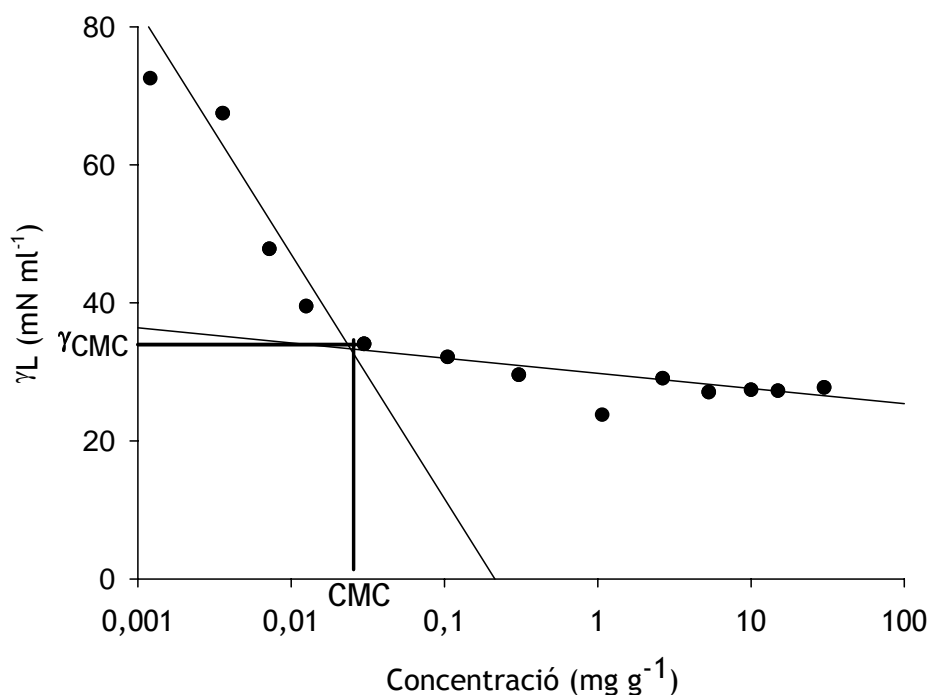


Figura 4.3. Corba de tensió superficial del producte *S200* en aigua Mil·liQ.

Tot i que aquest efecte no el produeixen els nutrients hidrofílics, cal tenir present que únicament amb l'augment de biodisponibilitat no s'incrementa la biodegradació. És necessària, també, l'aportació de N i P per compensar la manca d'aquests elements en els productes del petroli. McKew i col·laboradors (2007b) provaren l'addició d'un rhamnolípid en un experiment de bioremediació i constataren que només incrementava la biodegradació en aplicar-se de manera conjunta amb nutrients.

A diferència del consorci AM, el consorci TD amb nutrients hidrofílics és capaç de degradar els alcans de manera extensiva (en la major part dels compostos més del 80%) i no s'observen diferències significatives en afegir el fertilitzant oleofílic (Figura 4.2).

Aquests resultats són consistents amb els obtinguts per Viñas et al. (2002) en la degradació de cru de petroli i reflecteixen la diferent composició microbiana resultat de les diverses procedències dels consorcis utilitzats. De fet, el consorci AM havia estat obtingut mitjançant l'enriquiment en cultiu líquid discontinu d'una mostra de sòl contaminada amb cru de petroli, utilitzant una mescla de cinc HAP com a única font de carboni i energia. El consorci TD, en canvi, havia estat enriquit emprant gasoil, producte que presenta una fracció alifàtica majoritària, com a font de carboni i energia. Aquesta diferència explicaria un enriquiment en degradadors d'hidrocarburs alifàtics, amb especial afinitat per les parafines, en el consorci TD, tal com es pot veure a la figura 4.4.

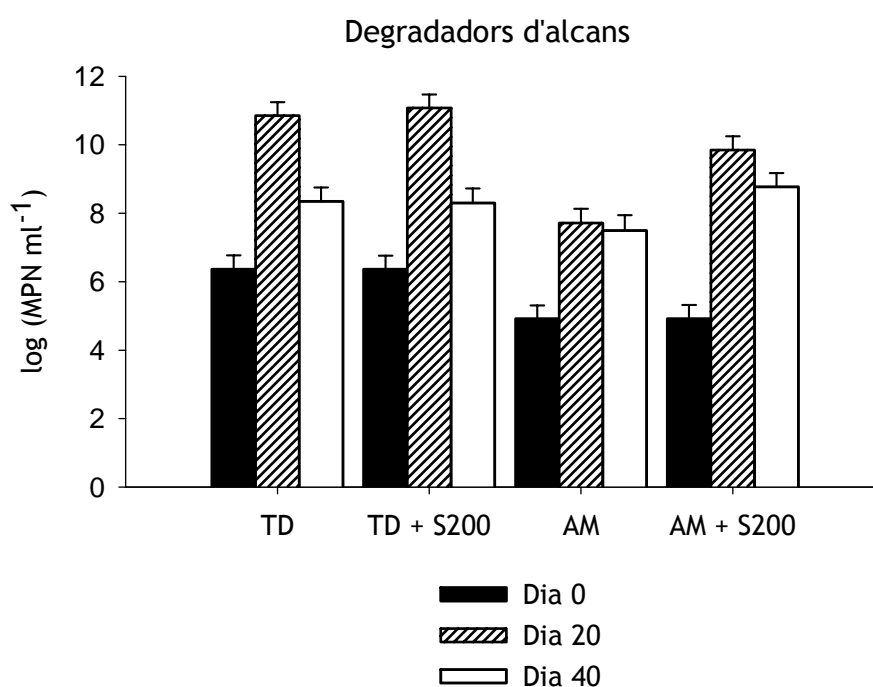


Figura 4.4. Recòmptes de degradadors d'alcans al llarg de l'experiment. Les barres representen el log (MPN) i les barres d'error l'interval de confiança al 95%.

Així mateix, és probable que el consorci TD presenti una població productora de biotensioactius, la qual cosa es reflecteix en l'emulsió del fuel i la formació d'escuma en els microcosmos amb aquest consorci (Figura 4.5). La presència dels tensioactius afavoriria la solubilització dels alcans d'elevat pes molecular. La relació entre degradació d'alcans i producció de biotensioactius ha estat provada a bastament (Ron i Rosenberg, 2002; Johnsen et al., 2005; Rahman i Gapke, 2008) i substrats com el gasoil o el mateix cru de petroli es consideren bones fonts de carboni per a la seva producció (Ilori et al., 2005; Johnsen et al., 2005; Gogotov i Khodakov, 2008).

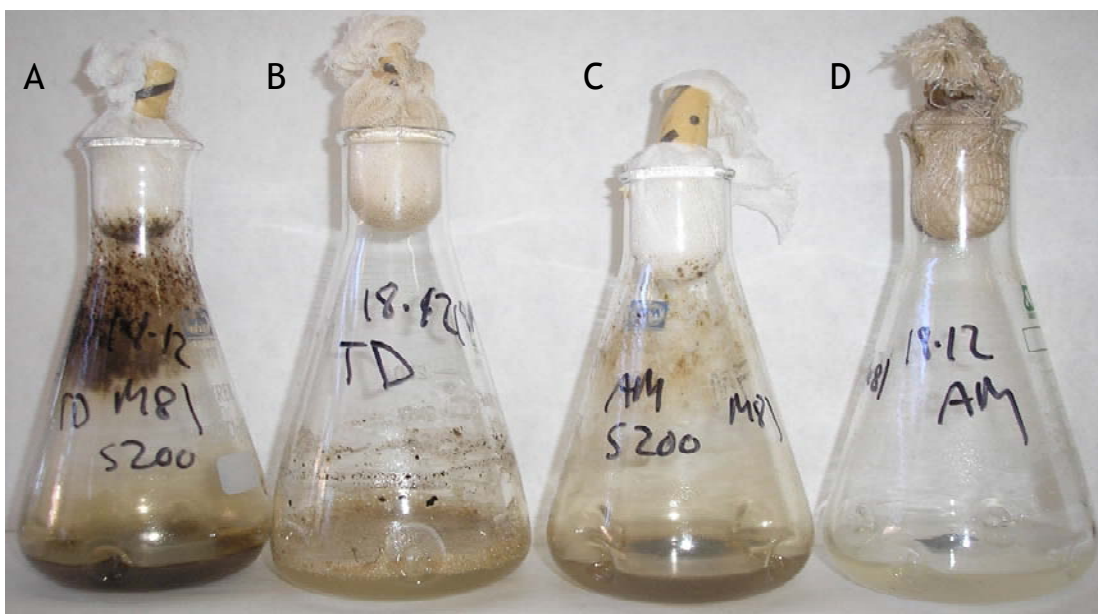


Figura 4.5. Aspecte dels microcosmos al cap de 40 dies d'experiment: A) TD + S200, B) TD, C) AM + S200, D) AM.

A la Figura 4.6 es representen les tensions superficials mesurades al dia 40 de l'experiment a cadascun dels diversos microcosmos. Els valors són significativament inferiors en el cas del consorci TD, cosa que reflecteix la producció de tensioactius per part d'aquest consorci.

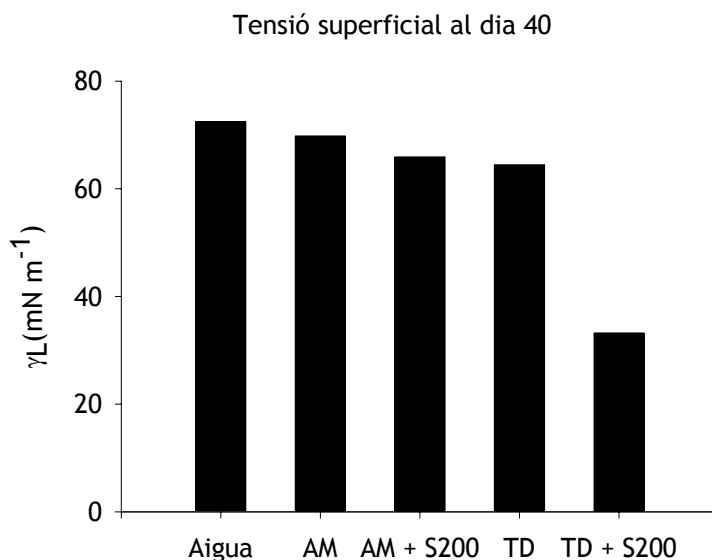


Figura 4.6. Tensió superficial dels diversos cultius al dia 40 d'experiment. Per tal de poder comparar, s'ha afegit, també, la de l'aigua destil·lada.

#### 4.2.3. Fracció aromàtica

Pel que fa a la fracció d'HAP, en tots els casos la degradació disminueix en augmentar el nombre d'anells i el grau d'alquilació (Figura 4.7), d'acord amb el que ha estat descrit en estudis previs (Cerniglia, 1984; Solanas et al., 1986; Elmendorf et al., 1994; Wang et al., 1998; Prince et al., 2003; entre d'altres).

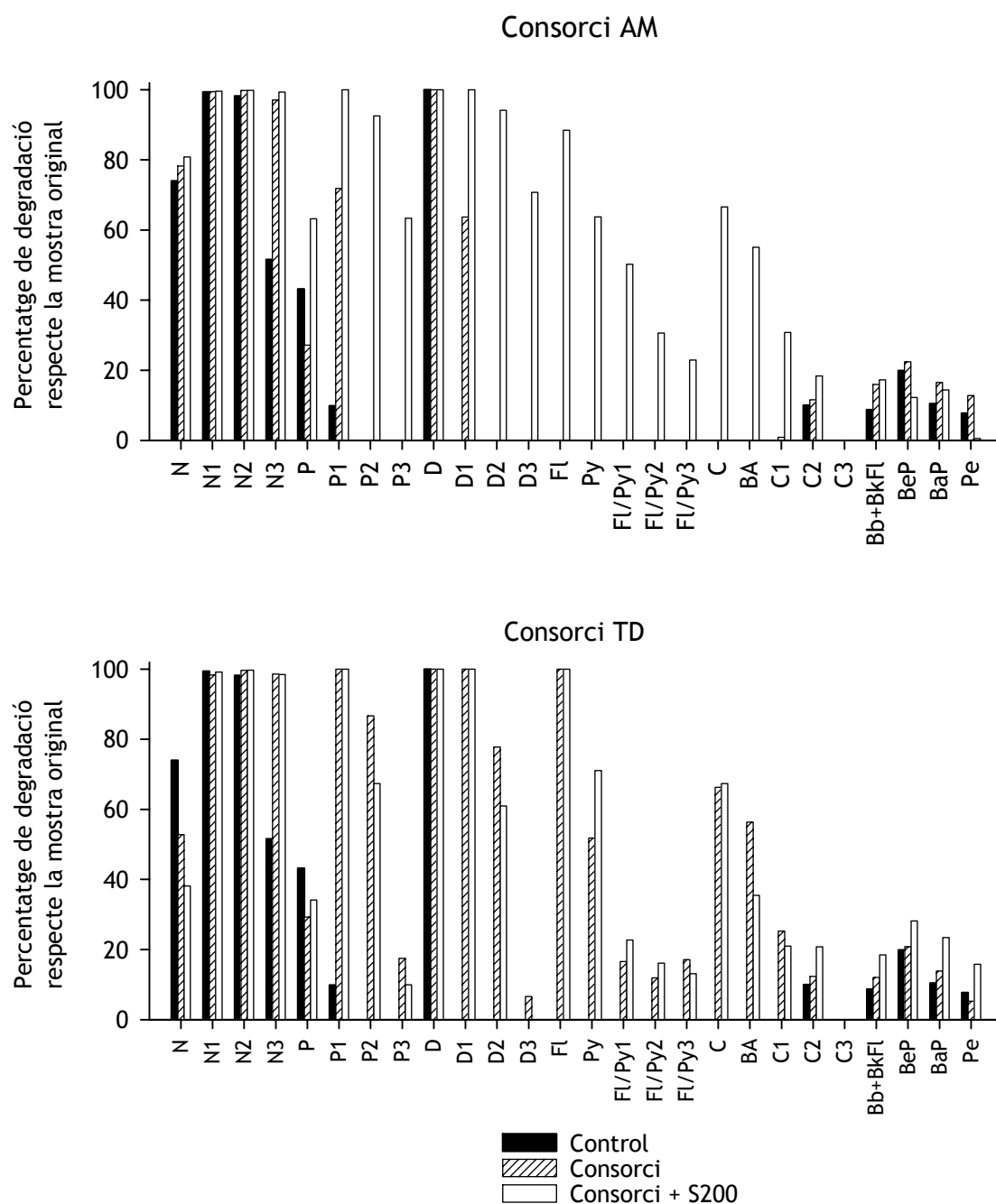


Figura 4.7. Percentatge de degradació dels hidrocarburs aromàtics policíclics (HAP) de les mostres abiòtiques amb nutrients hidrofílics, control; amb inòcul i nutrients hidrofílics, consorci, i amb inòcul i *S200*, consorci + *S200*; respecte la mostra original. Cada barra representa la mitjana de 2 valors.

#### *Degradació sense fertilitzant lipofílic*

Si bé el tipus de substrat emprat en l'enriquiment dels diversos consorcis feia pensar en una major degradació de la fracció aromàtica per part de l'AM, a la pràctica no ha estat així (Figura 4.7). En absència del fertilitzant lipofílic, el consorci TD ha assolit uns percentatges de degradació majors en els dibenzotiofens i fenantrens alquilats, fluorantens i en els compostos de quatre anells aromàtics (crisens i pirens). En canvi, no s'aprecien diferències importants en la degradació dels més lleugers, com els naftalens o en la dels compostos de cinc anells.

Una possible explicació podria ser l'existència d'una població microbiana superior en el consorci TD. Tot i que en el fuel del *Prestige* la proporció d'aromàtics és major que la d'alifàtics, la presència de compostos alifàtics afavoriria el ràpid creixement del consorci TD i facilitaria la degradació dels aromàtics. Per contra, en el consorci AM hi hauria menys densitat de microorganismes, ja que, si bé el substrat al qual estan més adaptats, els HAP, és majoritari, el creixement microbià tindria una cinètica més lenta. Ara bé, els recomptes de degradadors d'aromàtics efectuats (Figura 4.8) ens obliguen a descartar aquesta hipòtesi, ja que no s'han observat diferències significatives entre els MPN obtinguts en ambdós consorcis en absència de fertilitzant *S200*.

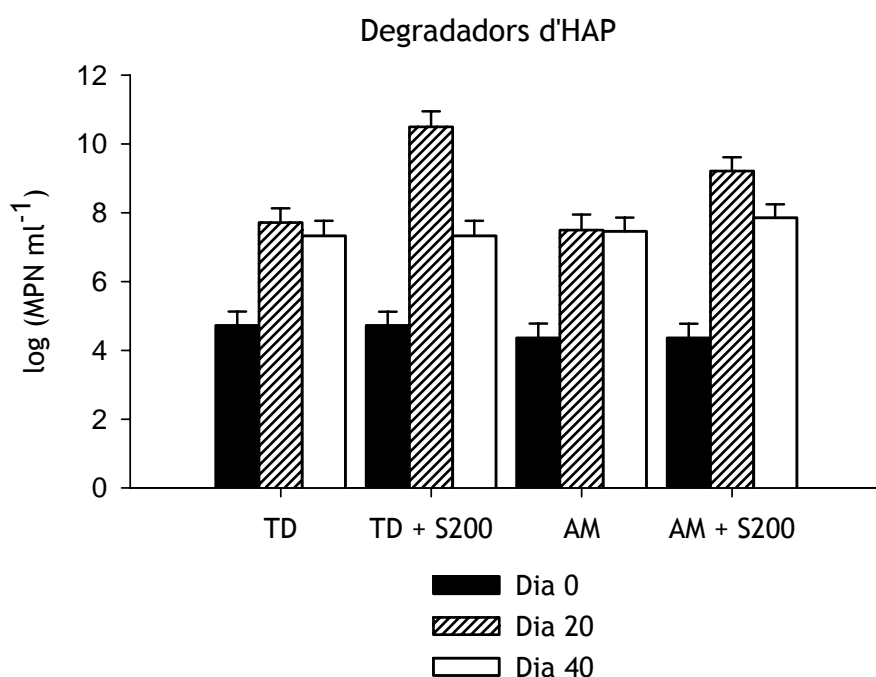


Figura 4.8. Recòmptes de degradadors d'aromàtics al llarg de l'experiment. Les barres representen el log (MPN ml<sup>-1</sup>) i les barres d'error l'interval de confiança al 95%.

Les diferències observades, doncs, podrien ser degudes a la diferent biodisponibilitat dels hidrocarburs. Tal com s'ha esmentat, la presència d'una població microbiana productora de tensioactius en el consorci TD, absent en el consorci AM, podria ser la responsable d'una major solubilització i, doncs, biodegradació dels HAP més pesants.

Mentre que els degradadors d'alcans s'han relacionat habitualment amb la producció de biotensioactius, no sembla que aquesta sigui una estratègia comuna entre els degradadors d'HAP, com és el cas del consorci AM (Johnsen i Karlson, 2004; Johnsen et al., 2005), els quals tendeixen a formar biofilms sobre les fonts (Johnsen et al., 2005).

#### *Efecte del fertilitzant lipofílic*

L'addició del fertilitzant lipofílic fa augmentar la biodegradació dels HAP per part del consorci AM (Figura 4.7). Per contra, en el consorci TD no es produeix aquest efecte, si bé és cert que la població microbiana augmenta significativament, especialment als 20 dies (Figura 4.8). En presència de fertilitzant *S200*, el consorci AM presenta una major capacitat per degradar HAP més alquilats i, doncs, més recalcitrants. Especialment important és la

diferència en el cas dels dimetil i trimetil-fenantrens i dibenzotiofens i metil-fluorantens/pirens, els quals són els HAP més abundants en el fuel.

Ábalos et al. (2004) trobaren el mateix tipus de resultats en l'estudi en què utilitzaren rhamnolípid. Així mateix, s'ha observat que l'addició de tensioactius afavoreix la biodegradació d'hidrocarburs aromàtics policíclics poc solubles, com l'antracè (Das et al., 2008) o l'ús d'HAP d'elevat pes molecular (pirè, benzo[*a*]pirè) subministrats com a única font de carboni i energia (Boonchan et al., 1998). L'augment de la solubilitat o la interacció entre les micel·les de biotensioactius que engloben els hidrocarburs i les membranes cel·lulars contribueix a la incorporació dels hidrocarburs hidrofòbics (Beal and Betts, 2002; Noordman i Janssen, 2002).

### 4.3. Proves d'esterilitat del fuel

Com hem vist en l'apartat precedent, l'evidència de degradació dels controls al llarg de la incubació ha fet pensar en l'existència de microorganismes degradadors d'hidrocarburs dins de la mostra de *chapapote*. Amb tot, podria haver-se donat el cas que el fertilitzant emprat també hagués estat contaminat. Per tal de comprovar-ho, s'han dut a terme proves de biodegradabilitat utilitzant fuel esterilitzat i fertilitzant esterilitzat, els resultats de les quals es mostren a continuació.

A la fracció alifàtica, els alcans s'han degradat de manera extensiva (percentatges superiors al 70% en tots els compostos excepte els més pesants) quan no s'ha esterilitzat el *chapapote* (Figura 4.8), mentre que en el *chapapote* esterilitzat només es detecten pèrdues dels compostos més lleugers, probablement per volatilització.

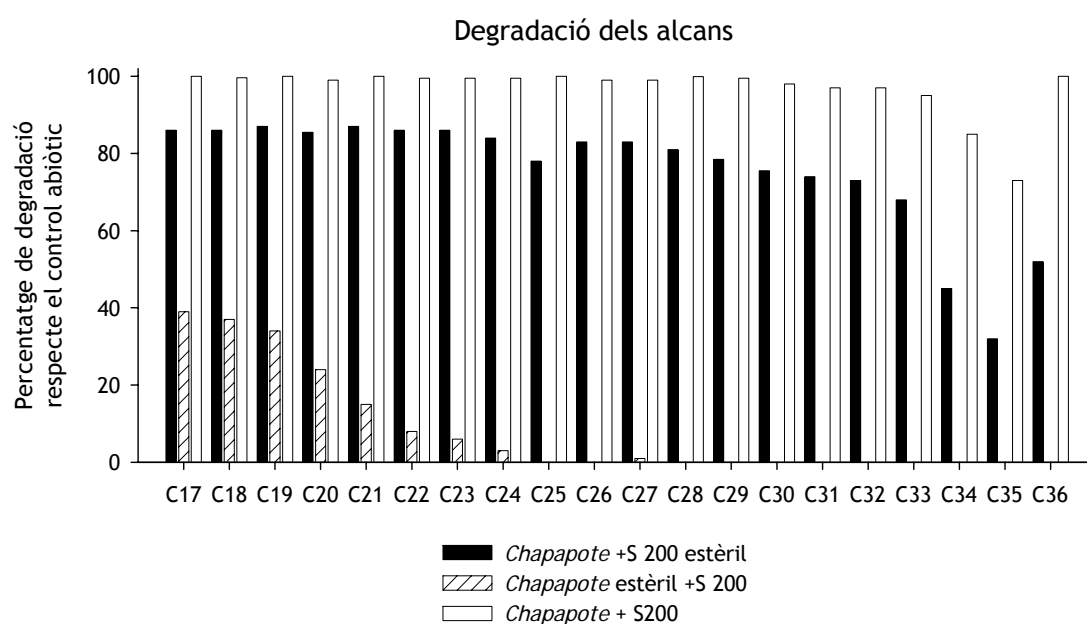


Figura 4.8. Degradació de les parafines: percentatge respecte el control estèril. Cada barra representa la mitjana de 2 valors.

A la fracció aromàtica (Figura 4.9) els resultats són molt similars: mentre que en els microcosmos amb *chapapote* no estèril els hidrocarburs aromàtics policíclics de tres anells (fenantrens i dibenzotiofens) es degraden significativament, amb percentatges superiors al 40%, quan s'esterilitza el *chapapote* únicament desapareixen els naftalens i possiblement per volatilització.

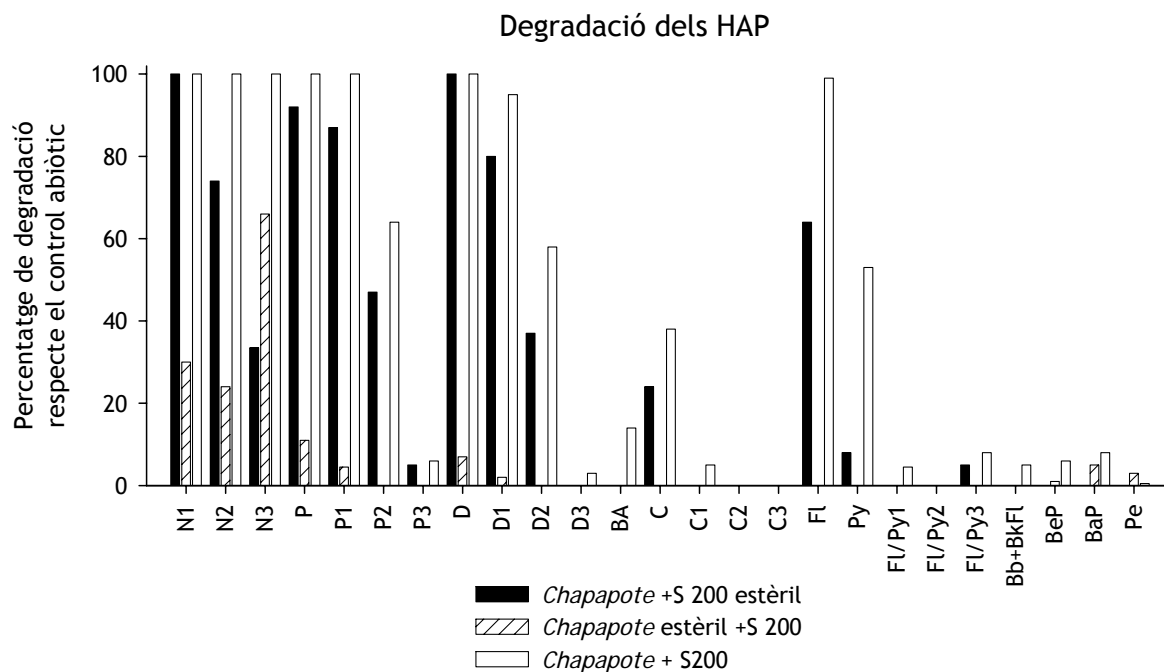


Figura 4.9. Degradació dels HAP: Percentatge respecte el control estèril. Cada barra representa la mitjana de 2 valors.

Pot sorprendre que la biodegradació assolida en aquest experiment sigui tan elevada en relació a l'experiment anterior (Figures 4.2 i 4.7). L'explicació més raonable estaria relacionada amb un canvi poblacional. Mentre que el primer experiment s'ha dut a terme amb *chapapote* recent, colonitzat per diverses espècies de microorganismes marins, el segon s'ha realitzat 4 mesos després, amb la mateixa mostra de *chapapote*, que s'hauria pogut anar enriquint en microorganismes degradadors tant d'hidrocarburs alifàtics com d'aromàtics.

Els resultats, doncs, permeten afirmar que la degradació dels controls respecte de la M81 original ha estat causada, majoritàriament, per la presència de microorganismes degradadors d'hidrocarburs a la mateixa mostra.

Tal com s'ha esmentat a l'inici d'aquest apartat, el procediment correcte hauria estat esterilitzar la mostra M81 prèviament al seu ús com a única font de carboni i energia. No obstant això, aquesta no és una pràctica habitual quan es tracta de productes petrolífers que no acostumen a presentar contaminació microbiana. Ara bé, la M81 corresponia a una mostra de *chapapote*, la qual fou colonitzada, durant la seva deriva, per poblacions microbianes marines. Diversos estudis evidencien l'existència al medi marí de comunitats microbianes degradadores d'hidrocarburs després de l'accident del *Prestige* (Medina-Bellver et al., 2005; Alonso-Gutiérrez et al., 2007).

La presència de microbiota degradadora a la mostra M81 dificulta la quantificació acurada de la capacitat degradadora dels consorcis TD i AM. Amb tot, s'observen clares diferències entre la degradació obtinguda en aquells microcosmos en presència dels consorcis especialitzats, respecte d'aquells en què no n'hi ha (controls) (Figures 4.3 i 4.4); és a dir, tant el consorci AM com el TD duen a terme una degradació superior a la produïda únicament per la població microbiana present a la mostra M81.

El més probable, doncs, és que la degradació sigui duta a terme, majoritàriament, pels consorcis AM i TD, adaptats a viure en condicions de laboratori, tot i que, de ben segur, la presència conjunta dels consorcis amb la microbiota existent al fuel, donarà lloc a sinèrgies que podrien augmentar la taxa i l'extensió de la biodegradació. Per tal de confirmar-ho, caldria fer proves amb els consorcis TD i AM emprant *chapaote* estèril com a font de carboni i energia.

Els resultats obtinguts en aquest experiment han obert noves línies de recerca, les quals són objecte d'estudi dels següents capítols:

- D'una banda, pel que fa a l'ús del fertilitzant oleofílic, fóra bo comprovar-ne l'eficàcia in situ.
- D'altra banda, la mostra de chapapote M81 reuneix les característiques idònies per ser utilitzada com inòcul per obtenir un consorci autòcton especialitzat en la degradació de fuel, ja que ha patit un procés d'enriquiment natural en microorganismes degradadors del mateix fuel.





## Capítol 5

Assaig de bioremediació in situ en una  
platja contaminada per fuel del  
*Prestige*



Els resultats obtinguts in vitro ens han dut a realitzar un experiment al camp, per veure els efectes del fertilitzant oleofílic en condicions ambientals i el seu potencial ús com a agent en la bioremediació de les platges afectades pel vessament del *Prestige*.

Les característiques de la platja i l'estratègia experimental de l'estudi pilot es troben descrites a l'apartat 3.2. En aquest capítol es descriuran els resultats sobre l'evolució química del fuel i la comunitat microbiana del medi, que ja han estat publicats, respectivament, a *Environmental Science and Technology* (Jiménez et al., 2006) i *Applied Microbiology and Biotechnology* (Jiménez et al., 2007), com es mostra en els annexos 1 i 2.

## 5.1. Anàlisi química

### 5.1.1. Fracció alifàtica

Les mostres preses a l'inici de l'experiment (10 mesos després del vessament) a les parcel·les experimentals presenten concentracions dels alcans de menor pes molecular ( $<n$ -C20) més baixes que les del fuel original, a causa de l'envelliment que han sofert. Amb tot, al llarg de l'experiment també s'ha produït una disminució significativa ( $p < 0,05$  en el test  $U$  de Mann-Whitney) dels  $n$ -alcans respecte l'hopà de referència, tant a la parcel·la control com a la tractada, la qual cosa podria ser atribuïda a un procés de biodegradació. Així doncs, es pot dir que part de la degradació es produeix de manera intrínseca, a causa de la presència de microbiota degradadora autòctona, comuna en localitats que han patit contaminació crònica per hidrocarburs (Harayama et al., 1999), una mostra de la qual ha estat trobada en altres localitats contaminades per fuel del *Prestige* (Medina-Bellver et al., 2005).

Tot i l'existència de degradació intrínseca, la qual decreix en augmentar la longitud de la cadena, s'han trobat diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ) entre les dues parcel·les pel que fa a la proporció d'alguns dels  $n$ -alcans respecte el 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-hopà. En concret, l'addició del fertilitzant ha suposat un increment en la degradació dels compresos entre  $n$ -C25 i  $n$ -C35, especialment durant els primers 60 dies (figura 5.1). En un experiment dut a terme per Outdot et al. (1998) s'arribaren a obtenir resultats similars: la degradació a les parcel·les tractades fou major que a les controls, si bé, en aquest cas, únicament s'observaren diferències significatives a les quatre setmanes.

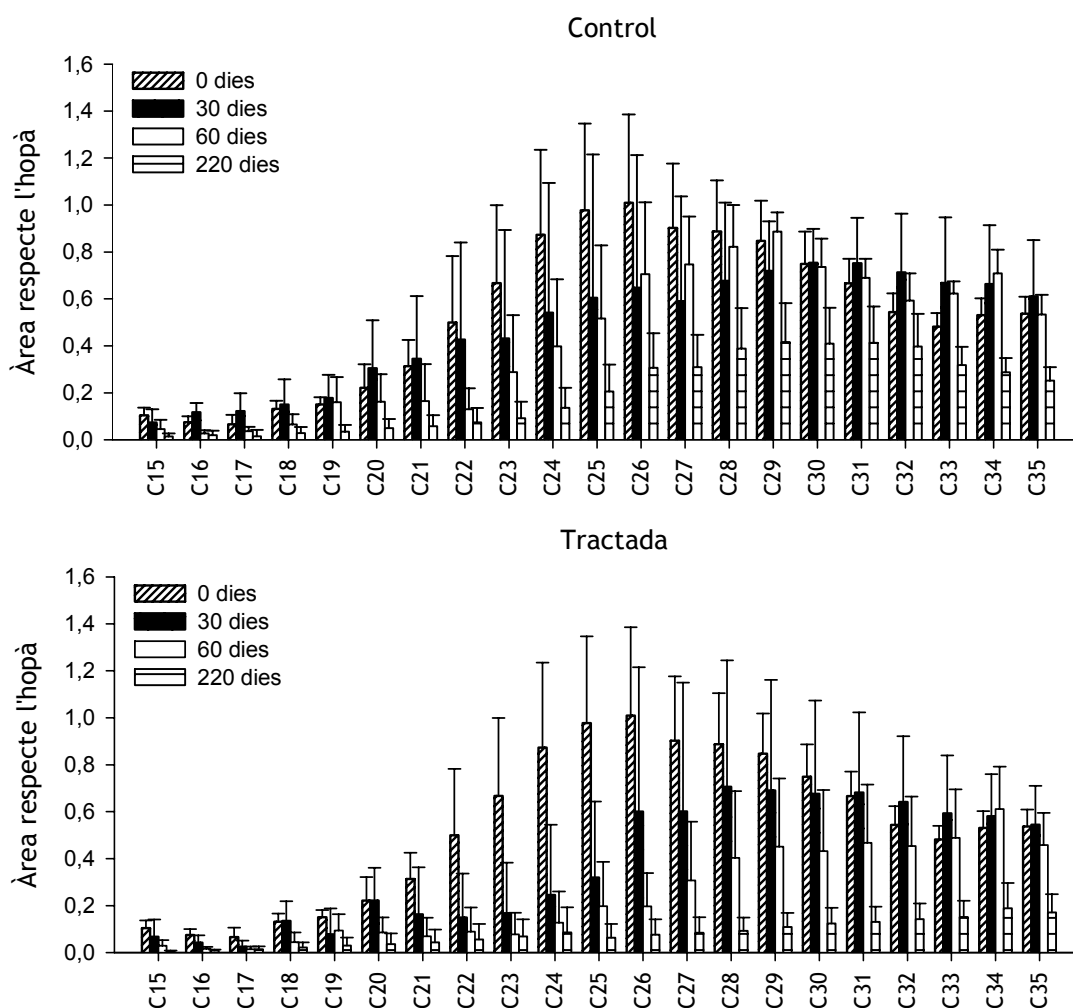


Figura 5.1. Distribució relativa dels *n*-alcans respecte al 30αβ-hopà al llarg de l'experiment a ambdues parcel·les.

Així mateix, les semivides dels diversos compostos han disminuït entre 1,6 i 3,2 vegades en la parcel·la fertilitzada (taula 5.1). Una explicació plausible a aquest efecte selectiu enfront dels alcans més pesants podria estar en la formulació del fertilitzant. Un dels components té propietats tensioactives (vegeu el capítol 4), la qual cosa augmentaria la solubilitat, i en conseqüència, la biodisponibilitat i subsegüent degradació dels alcans de major pes molecular. Aquest fenomen ja ha estat observat tant *in vitro* (Ábalos et al., 2004) com també *in situ* (McKew et al., 2007b).

Altres sèries de *n*-alquilderivats de cadena llarga que elueixen en aquesta fracció, els *n*-alquilociclohexans (*m/z* 82) i benzens (*m/z* 92), també s'han degradat extensivament al cap de 60 dies en la parcel·la fertilitzada, mentre que a la parcel·la control encara romanen a la fi de l'experiment (220 dies) (Figures 5.2 i 5.3). A banda de les diferències evidents en els perfils, l'anàlisi estadística de les concentracions de cadascun dels compostos de la sèrie en relació a l'hopà ha confirmat l'efecte del fertilitzant als 60 dies ( $p=0,001-0,027$ ).

Taula 5.1. Semivides ( $t_{1/2}$ ) dels *n*-alcans C25-C35 i el corresponent interval de confiança al 95% en les parcel·les control i fertilitzada i els percentatges de degradació als 220 dies d'experiment.

<i>n</i> -alcà	$t_{1/2}$ (dies)	Control		Fertilitzada		
		int. conf. 95 %	% degradació	$t_{1/2}$ (dies)	int. conf. 95 %	% degradació
C25	92	71-133	79	57	44-81	93
C26	137	90-168	70	63	49-88	92
C27	135	94-165	66	61	48-83	91
C28	167	118-197	56	67	54-89	90
C29	179	130-206	51	73	59-97	87
C30	208	145-229	45	81	65-110	83
C31	234	166-265	38	88	71-115	80
C32	317	228-453	31	99	80-130	74
C33	328	230-478	35	113	91-150	69
C34	242	183-318	46	131	107-168	66
C35	241	188-300	47	136	113-171	66

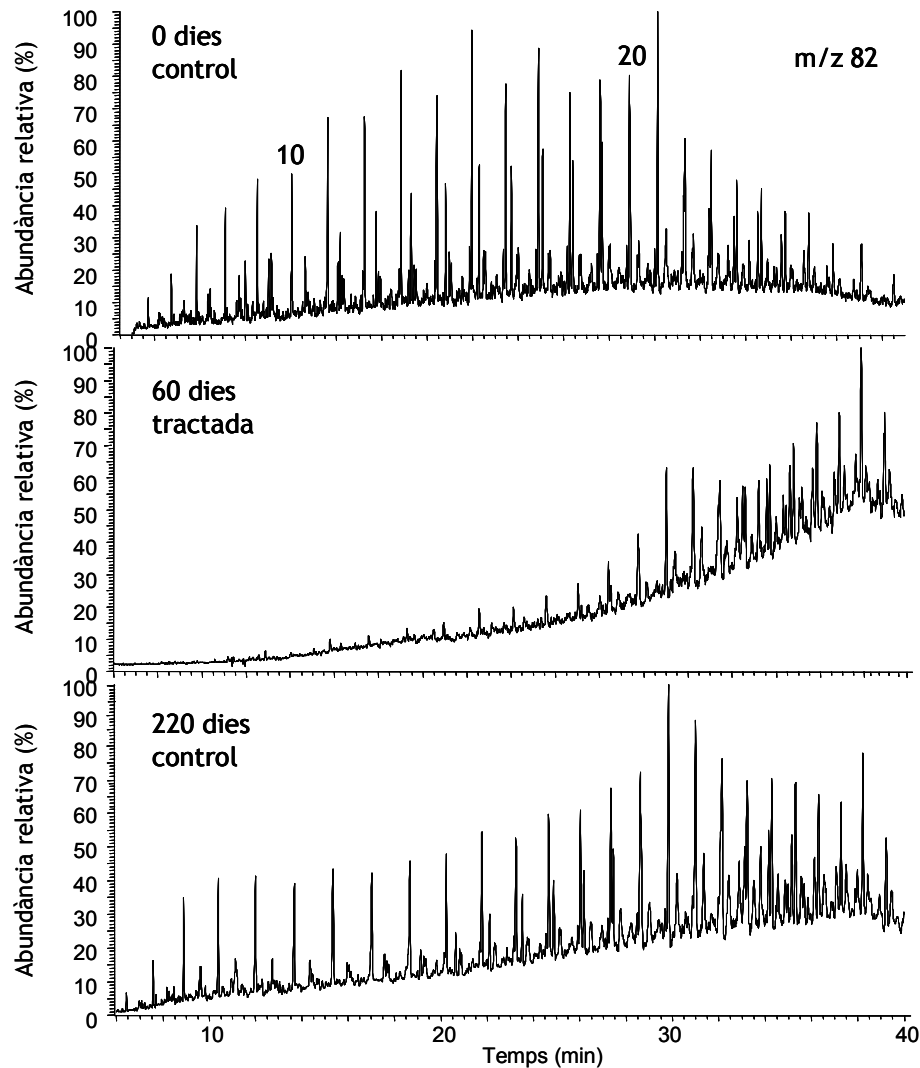


Figura 5.2. Alquilcicloalcans ( $m/z$  82) de les mostres preses al llarg de l'experiment. Els números indiquen el nombre d'àtoms de carboni de la cadena lateral.

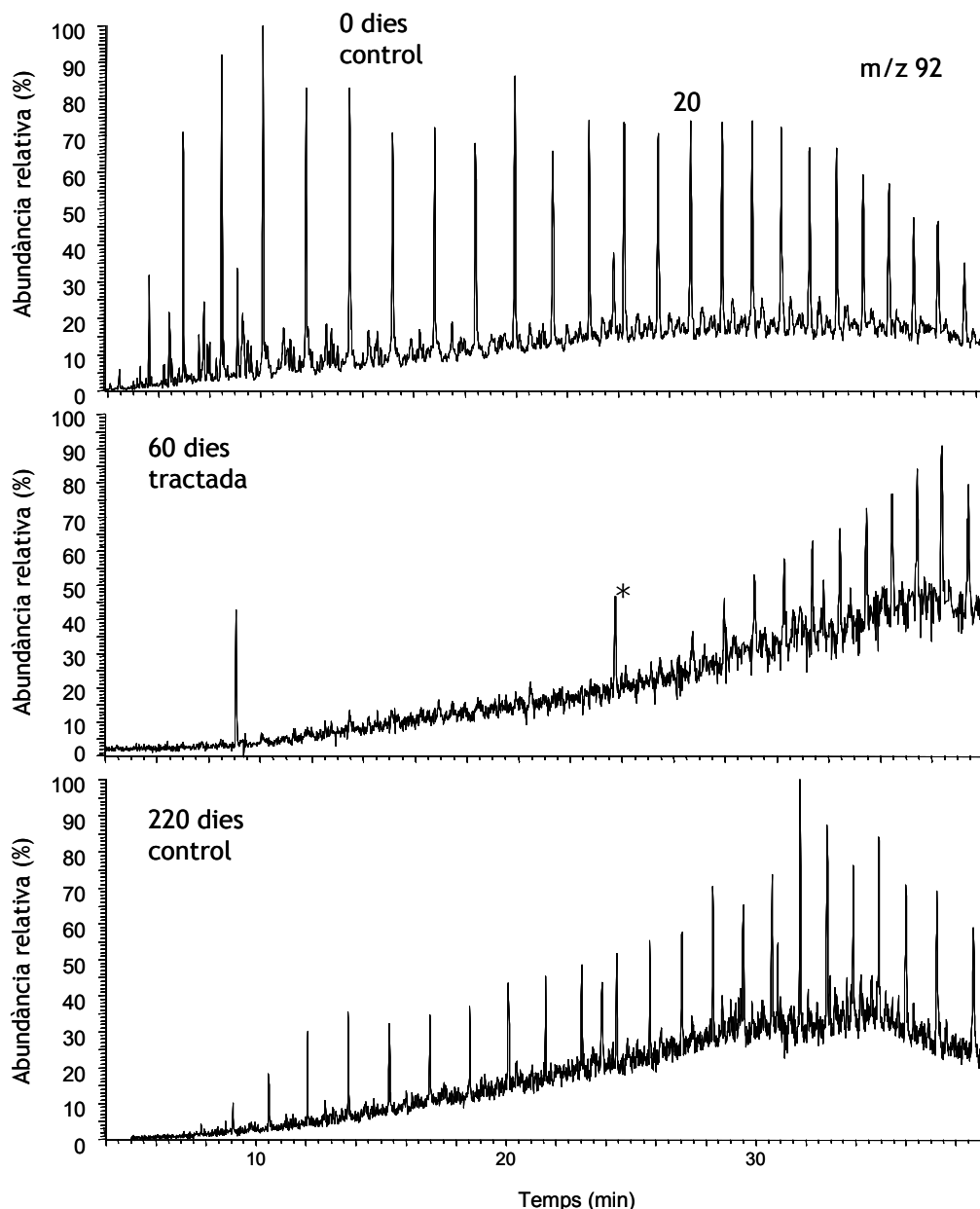


Figura 5.3. Alquilbenzens ( $m/z$  92) de les mostres preses al llarg de l'experiment. Els números indiquen el nombre d'àtoms de carboni a la cadena lateral. \* fitanilbenzè.

En la sèrie dels *n*-alquiltoluens ( $m/z$  106) (figura 5.4) s'ha detectat la següent seqüència de degradació dels diferents isòmers en els primers estadis: *m*- > *o*-. Aquests patrons suggereixen que la biodegradació té lloc no només per atac enzimàtic i posterior  $\beta$ -oxidació de la cadena alquílica lateral, sinó també per ruptura de l'anell aromàtic, la qual cosa pot reflectir la presència a la comunitat microbiana tant de microorganismes degradadors amb activitats metabòliques diferents, com de soques capaces de degradar els compostos per vies diverses (Mahajan et al., 1994; Sabaté et al., 2003).

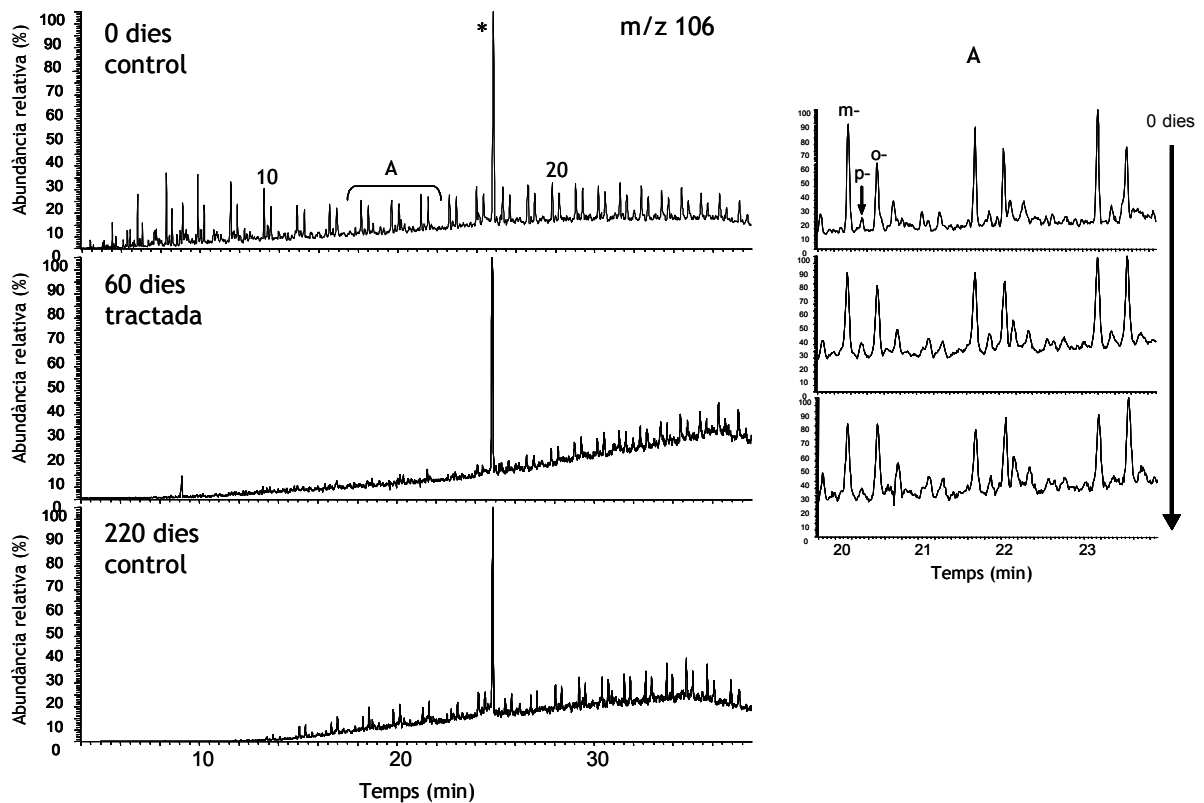


Figura 5.4. Alquiltoluen (m/z 106) de les mostres preses al llarg de l'experiment. Els números indiquen el nombre d'àtoms de carboni a la cadena lateral. \* 1-metil-3-finatanilbenzè. A: evolució de la secció ampliada del perfil amb biodegradació creixent.

### *Marcadors moleculars*

Tal com ja s'ha comentat anteriorment (vegeu 1.5.2), els marcadors moleculars s'han utilitzat a bastament per avaluar l'origen i el grau d'envelliment de mostres de petroli trobades al medi. Els esterans i els terpan són els que més s'empren (Wang i Fingas, 2003). En aquest cas hem utilitzat alguns dels índexs llistats a la taula 3.2, l'evolució dels quals es troba representada a la figura 5.5. Les tendències observades són consistents amb les trobades en experiments de laboratori (Díez et al., 2005) i responen a patrons de biodegradació descrits en estudis anteriors.

En primer lloc, destaca la degradació dels diasterans (27dia). Així mateix, s'ha produït una davallada dels C27 esterans (27BB) respecte dels de cadena més llarga. Muñoz et al. (1997) proposaren per a aquest tipus de compostos el següent ordre de degradació (decreixent): C26>C27>C28>C29>C30, observat també en altres estudis (Pastor et al., 2001; Wang et al., 2001).



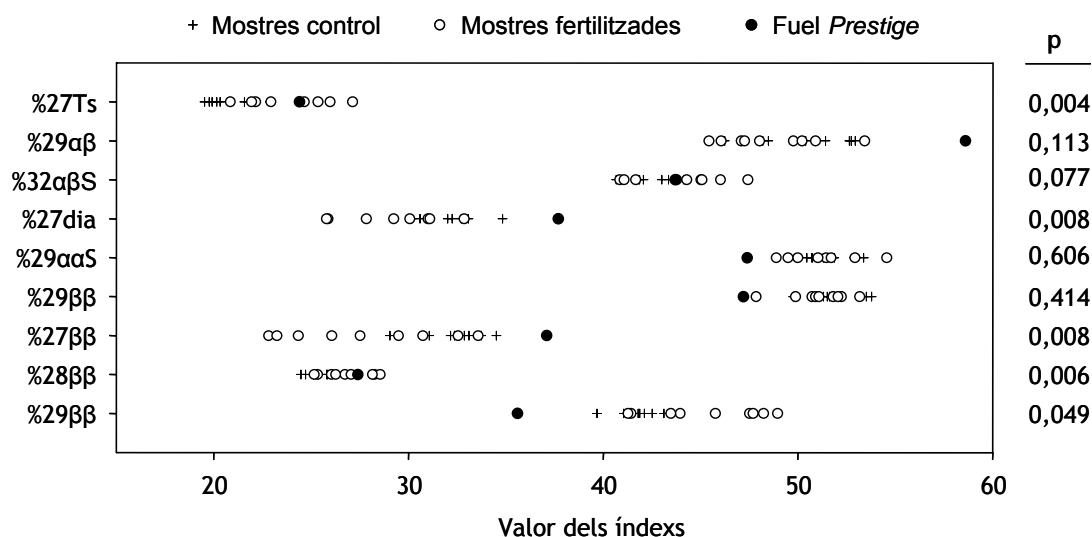


Figura 5.5. empremta digital de les mostres del dia 220 comparades amb la del fuel original i efecte del fertilitzant oleofílic S200, reflectit en el valor p obtingut en el test U de Mann-Whitney. Les definicions dels índexs s'indiquen a la taula 3.2.

D'altra banda, els 14α(H),17α(H) esterans (29αα) s'han degradat més que els 14β(H),17β(H), així com els enantiòmers 20R (29ααR) més que els 20S, corroborant els resultats obtinguts per Pastor et al. (2001). Segons Peters et al. (1996), la conformació S (també anomenada d'escorpí) podria resultar en un impediment estèric a l'atac microbià del grup metil C-25 (figura 5.6).

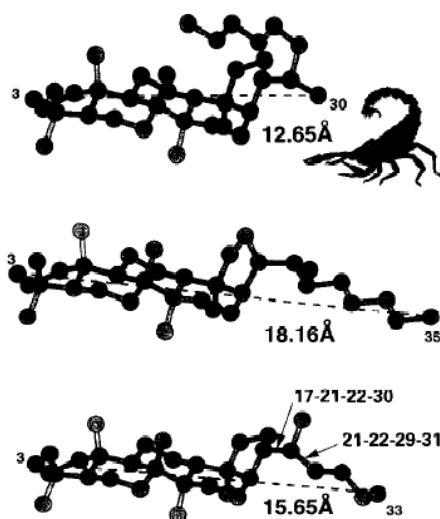


Figura 5.6. Exemples d'epímers de C35 S i R. C35 22S hopà (17α(H),21β(H)-homohopà), part superior, conformació d'escorpí; C35 22R hopà, centre, conformació de rail II; C35 22R, part inferior, conformació de rail I. De Peters et al., 1996.

És interessant destacar que en el cas de les relacions %27dia, %27ββ i %28ββ s'han observat diferències significatives entre ambdues parcel·les al final de l'experiment. En la parcel·la fertilitzada la degradació és significativament superior. Aquests resultats contribueixen a establir bons indicadors de la bioremediació al camp, així com a identificar l'origen de mostres molt envellides que puguin recollir-se a la zona.

## 5.1.2. Fracció aromàtica

Si bé en el fuel original predominava la família d'alquilnaftalens, les mostres preses a l'inici de l'experiment presenten concentracions baixes d'aquests compostos, a causa de les pèrdues per evaporació i rentat. Per això, en aquest estudi únicament s'han considerat els homòlegs més pesants (a partir de tres anells). Com en el cas de l'experiment in vitro, la degradació dels aromàtics ha seguit patrons que han estat ben establerts en estudis previs (Cerniglia, 1984; Solanas et al., 1984; Elmendorf et al., 1994; Wang et al., 1998; Prince et al., 2003; entre d'altres), com ara minvar en augmentar l'aromaticitat i el grau d'alquilació (figura 5.7).

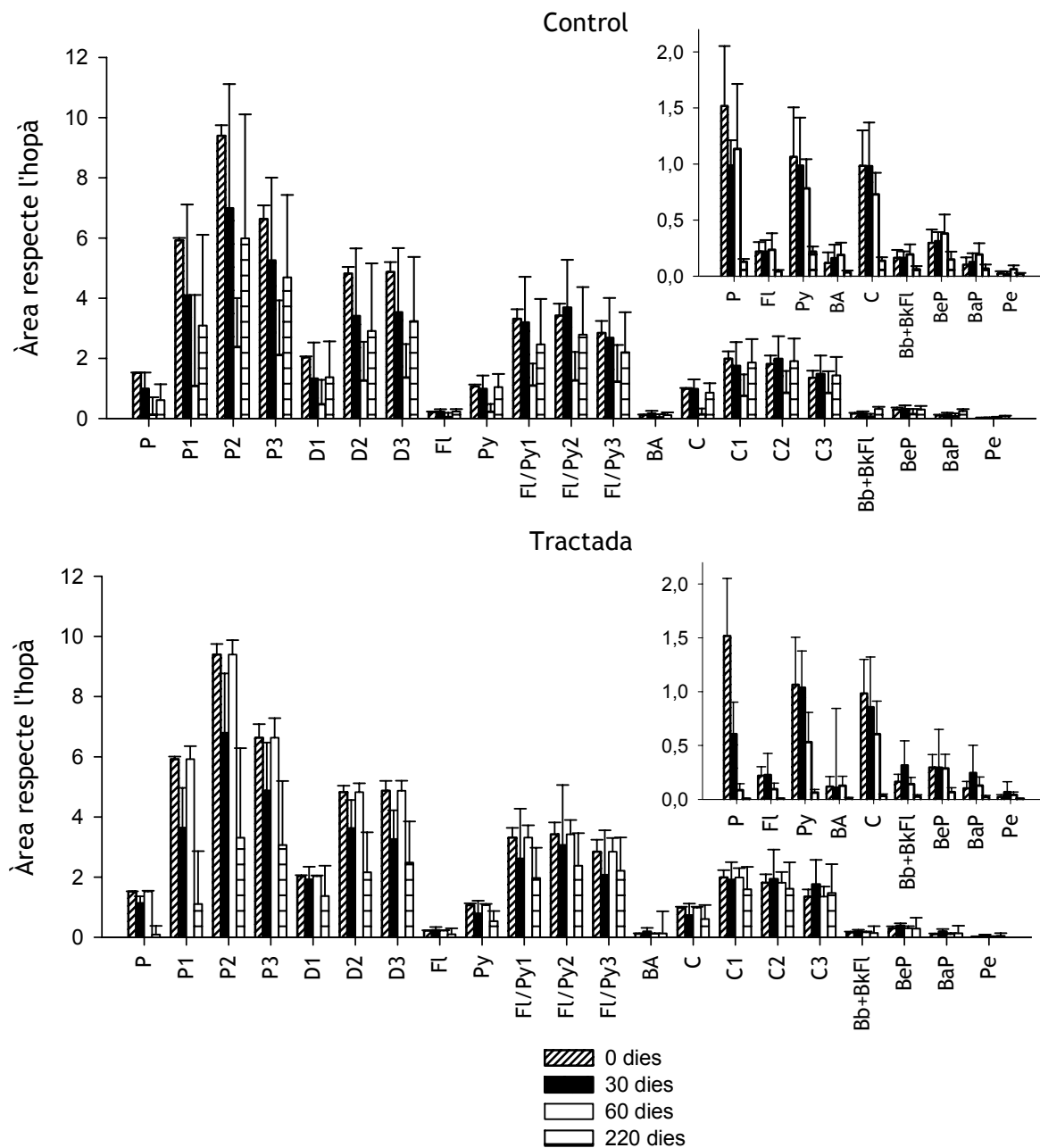


Figura 5.7. Distribució relativa dels HAP respecte del 30αβ-hopà al llarg de l'experiment a ambdues parcel·les.

Tot i existir certa degradació intrínseca, com en el cas dels compostos alifàtics, ja que en ambdues parcel·les s'han observat reduccions significatives ( $p < 0,05$ ) en la majoria dels compostos amb el temps (figura 5.7), s'ha tornat a produir una degradació selectiva. Així, s'ha constatat un augment en la degradació dels hidrocarburs aromàtics més alquilats en la parcel·la fertilitzada, de manera que als 220 dies els grups de mostres d'ambdues parcel·les eren significativament diferents (valors de  $p$  d'entre 0,0001 i 0,0078).

L'addició de fertilitzant ha comportat, també, una disminució de les semivides dels diversos compostos d'entre 1,8 i 3,6 vegades (taula 5.2). Cal destacar, així mateix, l'augment en el percentatge de degradació dels trimetil-crisens (de 21% a la parcel·la control al 79% en la tractada). Com en el cas de la fracció alifàtica, aquest increment podria ser degut a un augment de la biodisponibilitat dels components més pesants, afavorit per la presència del tensioactiu present a la formulació del fertilitzant.

Taula 5.2. Semivides ( $t_{1/2}$ ) dels HAP i el corresponent interval de confiança al 95% en les parcel·les control i fertilitzada i els percentatges de degradació als 220 dies d'experiment.

HAP	Control			Tractada		
	$t_{1/2}$ (dies)	int. conf. 95 %	% degradació	$t_{1/2}$ (dies)	int. conf. 95 %	% degradació
P	64	52-82	91	23	20-28	99
P1	97	64-198	82	41	33-55	99
P2	118	88-177	75	47	40-58	96
P3	135	99-217	68	56	46-73	93
D	*	*	64	42	31-69	98
D1	105	77-163	77	37	30-49	98
D2	120	88-190	74	49	40-61	96
D3	131	96-207	72	56	45-73	93
FI	91	74-120	80	46	38-58	96
Py	95	76-128	80	54	44-70	94
FI/Py1	128	93-209	67	61	48-87	90
FI/Py2	135	93-247	64	65	49-93	88
FI/Py3	141	93-293	63	67	51-99	87
BA	*	*	71	66	44-127	91
C	79	69-93	76	45	37-58	97
C1	143	107-214	62	66	51-92	88
C2	173	121-302	41	74	57-108	84
C3	317	141-464	21	89	63-120	79

\* Dada no disponible.

Aquests resultats difereixen dels obtinguts per Maki et al. (2003), els quals, en un estudi dut a terme després de l'accident del *Nakhodka*, trobaren que la degradació es produïa principalment en alcans i naftalens, tant en les mostres fertilitzades com en les no fertilitzades i que s'arribava fins al 90-95% en les primeres i fins al 79-83% en les segones. L'eficiència en la degradació de fluorens, dibenzotiofens i fenantrens arribava al 54-77%, tant en la parcel·la tractada com en la control. En canvi, no observaren degradació en els HAP

d'una massa molecular més elevada. Apuntaven que la causa seria la baixa solubilitat dels mateixos, la qual afavoriria la tendència a l'adsorció en el sediment (Harayama, 1997).

En un altre estudi similar, Röling et al. (2004), emprant fertilitzants hidrofílics en una zona intermareal, únicament observaren degradació en els alquilnaftalens, mentre que, al cap d'un any, els alquilfenantrens i dibenzotiofens no s'havien degradat de manera significativa a cap de les parcel·les tractades.

Cal destacar la importància dels resultats obtinguts en aquest estudi, donada l'elevada proporció dels hidrocarburs alquilats en qualsevol producte petrolífer i, en particular, en el fuel del *Prestige*. Però encara són més rellevants si tenim en compte que els HAP alquilats constitueixen el principal grup de compostos dins la fracció mutagènica dels productes petrolífers (Griest et al., 1979). En aquest sentit, mentre que el fluorè, el fenantrè i l'antracè són inactius en el test d'Ames, els derivats metilats s'han mostrat mutagènics enfront la soca TA 100 de *Salmonella typhimurium* (LaVoie et al., 1979).

Les relacions entre C2 i C3-alquilfenantrens, crisens i dibenzotiofens s'han proposat com a índexs per a identificar la font del petroli o per determinar-ne el grau d'envelliment (Douglas et al., 1996). Els valors corresponents a les dues parcel·les es mostren a la figura 5.8. Com en el cas dels índexs de la fracció alifàtica, les tendències corroboren els resultats obtinguts in vitro (Díez et al., 2005).

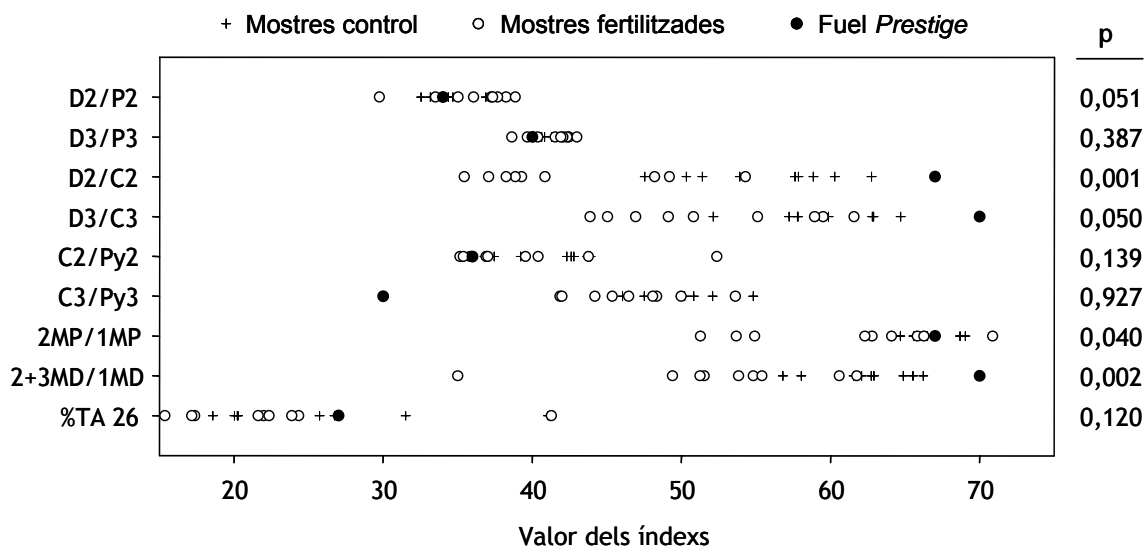


Figura 5.8. Índexs moleculars dels HAP de les mostres del dia 220 comparades amb la del fuel original i efecte del fertilitzant oleofílic S200, reflectit en el p valor obtingut en el test *U* de Mann-Whitney. Les definicions dels índexs s'indiquen a la taula 3.2. XMP i MD indiquen la posició dels substituents dels metil fenantrens i dibenzotiofens, respectivament.

Les relacions D2/P2 i D3/P3 s'han conservat en gran mesura i presenten una dispersió menor, d'acord al similar comportament d'ambdues sèries. En canvi, les relacions D2/C2 i D3/C3 han minvat considerablement, tant amb el temps com amb l'addició de fertilitzant. Per contra, les relacions C2/Py2 i C3/Py3 han augmentat com a conseqüència d'una major degradació dels pirens respecte dels crisens.

Dins de la mateixa sèrie, s'ha trobat que alguns dels isòmers es degraden més fàcilment (Bayona et al., 1986; Rowland et al., 1986; Budzinski et al., 1998), de manera que la pèrdua relativa pot aportar evidències addicionals del procés de degradació. Entre els C1- i C2-fenantrens, dibenzotiofens, pirens i crisens podem trobar indicadors de degradació primerenca.

De manera general, es pot dir que existeix una degradació preferent dels isòmers amb substituents B, com els 2-/3-metilfenantrens i dibenzotiofens, els índexs emprats dels quals es troben representats a la taula 3.2. Així mateix, els 4-metilpirè i 3-metilcrisè (m/z 242) resulten ser més recalcitrants que els 2-metilcrisè i 2-metilpirè (figura 5.9).

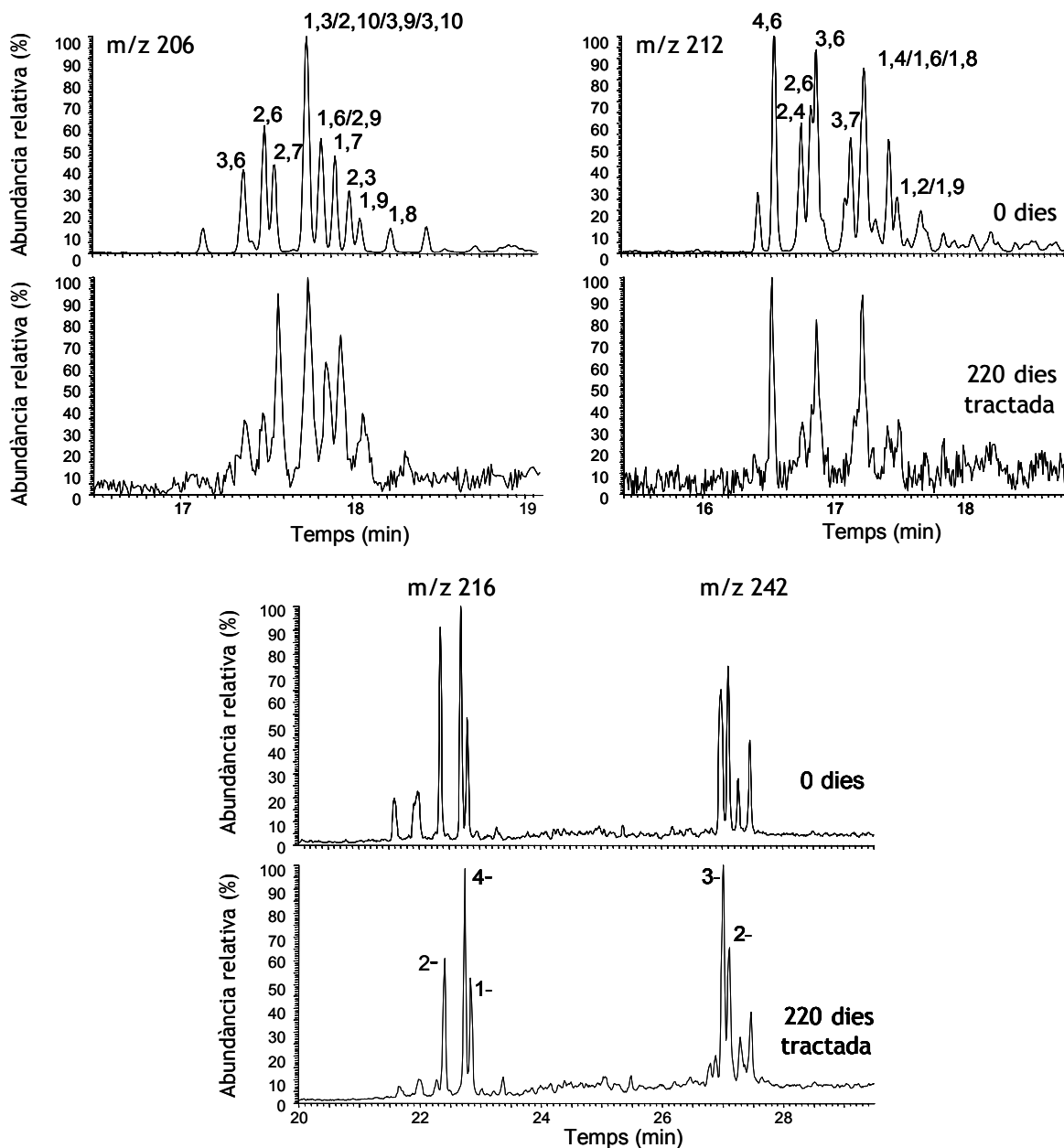


Figura 5.9. Evolució dels C2-fenantrens (m/z 206), C2-dibenzotiofens (m/z 212), C1-pirens (m/z 216) i C1-crisens (m/z 242) del fuel del *Prestige* en la parcel·la tractada en el moment inicial (superior) i als 220 dies (inferior). Cadascun dels perfils es presenta en una escala relativa al pic més gran. Els nombres indiquen les posicions amb substituent (grup metil) a cadascun dels HAP.

La preferència pels substituents  $\beta$  en la degradació també seria aplicable als dimetils. A més, en aquest cas, els compostos amb posicions  $\alpha\beta$  lliures es cooxiden amb més facilitat que aquells amb els substituents adjacents (Solanas et al., 1984; Rowland et al., 1986). Aparentment, els 3,6-, 2,6- i 2,3-dimetilfenantrens ( $m/z$  206) (figura 5.9) són més susceptibles a la degradació, mentre que els 1,7- i 2,7- serien més recalcitrants. Aquest comportament també ha estat observat anteriorment (Hostettler et al., 1994; Buzinski et al., 1998.; Díez et al., 2005).

En referència als dimetildibenzotiofens ( $m/z$  212) (figura 5.9), cal dir que existeix una degradació preferencial dels 2,4-, 2,6-, 3,7- i 1,3-, respecte dels 4,6-, 3,6- i 1,4- + 1,6 + 1,8, determinada per la presència dels substituents  $\beta$ .

### Marcadors moleculars

La fracció aromàtica també conté marcadors moleculars que s'utilitzen en l'establiment de l'empremta digital del petroli, entre els quals destaquen els esterans i triterpens totalment o parcialment aromatitzats (Peters i Moldowan, 1993). Els perfils de les sèries dels esterans triaromàtics ( $m/z$  231) (figura 5.10) han revelat uns patrons de degradació similars als seus homòlegs saturats (esterans), que consisteix en la degradació relativa dels compostos més lleugers: C26>C27>C28. En aquest cas l'efecte del fertilitzant fou menor que en el cas dels esterans.

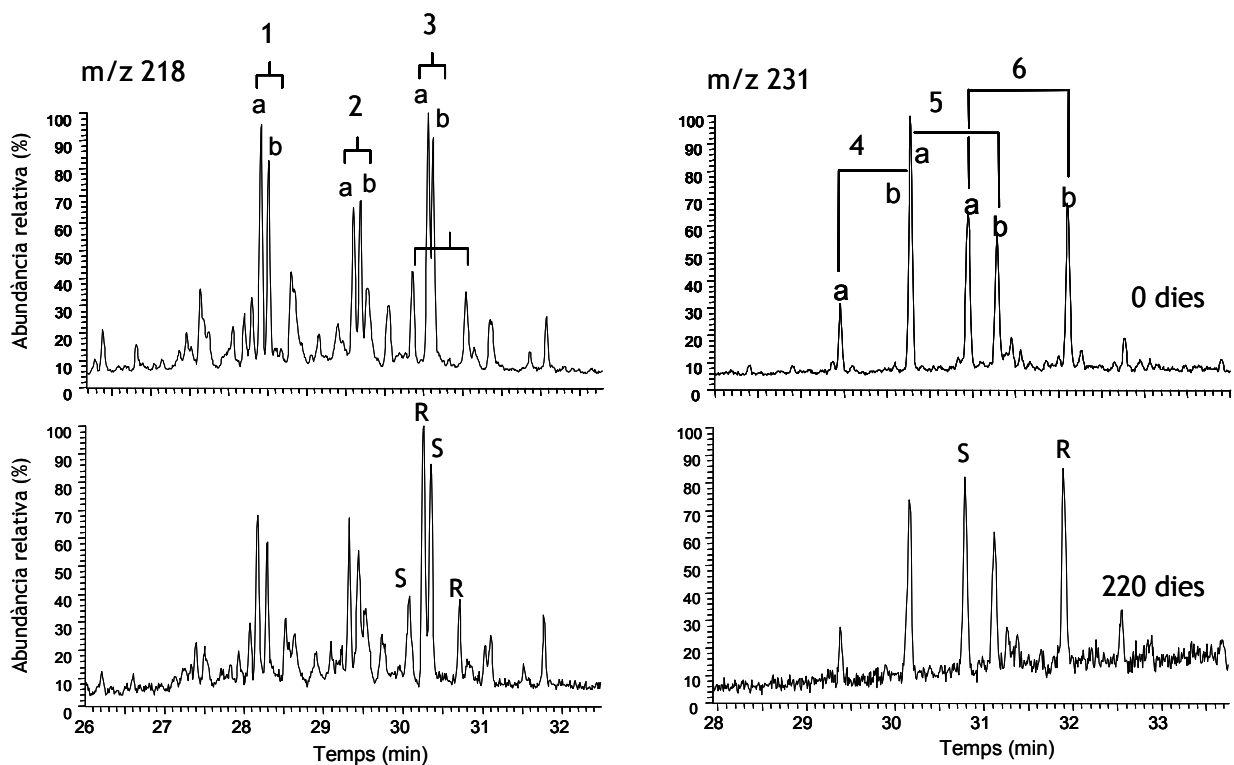


Figura 5.10. Evolució dels esterans ( $m/z$  218) i esterans triaromàtics ( $m/z$  231) de les mostres del fuel del *Prestige* a la parcel·la fertilitzada en el moment inicial (superior) i als 220 dies (inferior). 1a,b: 278B; 2a,b: 288B; 3a,b: 298B; 4a,b: 26TA; 5a,b: 27TA; 6a,b: 28TA (Vegeu taula 3.2).

## 5.2. Estudi de la comunitat microbiana

A banda de conèixer els canvis que el fertilitzant oleofílic provoca en la degradació del fuel, s'ha volgut fer un seguiment de la comunitat microbiana present en el medi, per conèixer quins microorganismes poden estar relacionats amb aquesta degradació.

La caracterització s'ha dut a terme per DGGE. Malgrat els inconvenients que presenta una tècnica dependent de PCR, que ja han estat discutits en capítols anteriors (vegeu 1.6.1), el fet que en totes les mostres i al llarg del tot el procés hàgim utilitzat el mateix protocol, ens fa suposar que la DGGE permetrà detectar els canvis que s'han produït en la comunitat bacteriana d'una manera senzilla.

Per avaluar la reproductibilitat de la tècnica, s'han dut a terme set amplificacions de l'ADN total d'una mostra presa a Galícia (FLR). La similitud dels amplicons del gen 16s rRNA, que s'han utilitzat també com a marcadors per a la DGGE, s'ha avaluat calculant el coeficient de correlació de Pearson,  $r$ , que ha estat de  $0,978 \pm 0,008$ . La similitud entre els patrons de DGGE de cadascuna de les mostres independents de cada parcel·la i període de mostreig (3 rèpliques), en canvi, ha estat baixa ( $r$  de  $0,46 \pm 0,20$  a  $0,85 \pm 0,10$ ), excepte en les mostres del dia 30 de la parcel·la tractada ( $r=0,93 \pm 0,01$ ). Si bé les PCR han estat repetitives, doncs, s'ha vist una elevada heterogeneïtat dins de les parcel·les, la qual cosa ha justificat l'ús de rèpliques en l'experiment, com ha passat en altres estudis (Powell et al., 2003).

En els perfils dels gens 16S rRNA de mostres preses al llarg de l'experiment (figura 5.11), s'han trobat 43 bandes diferents (de 17 a 23 per mostra), 34 de les quals, un 80-95% de la intensitat total del carril, s'han escindit i seqüenciat. Els amplicons seqüenciats han estat en tots els casos llargs (més de 430 parells de bases, taula 5.3) i han comprès tres regions hipervariables del gen 16s rRNA. En estudis previs (Yu i Morrison, 2004), s'havia establert la necessitat d'estudiar bandes llargues, que compreguessin com a mínim dues regions hipervariables, per poder caracteritzar acuradament les comunitats microbianes. Així doncs, s'ha considerat que aquests fragments són suficients per a l'estudi filogenètic que s'ha dut a terme.

Un cop seqüenciades les bandes, s'han identificat membres de Rhodobacteriaceae i Sphingomonadaceae (pertanyents al grup  $\alpha$ -Proteobacteria), de Chromatiales i Halomonadaceae ( $\gamma$ -Proteobacteria), de Flavobacteriaceae (Bacteroidetes) i de Nocardiaceae i Corynebacteriaceae (Actinobacteria) (taula 5.3).

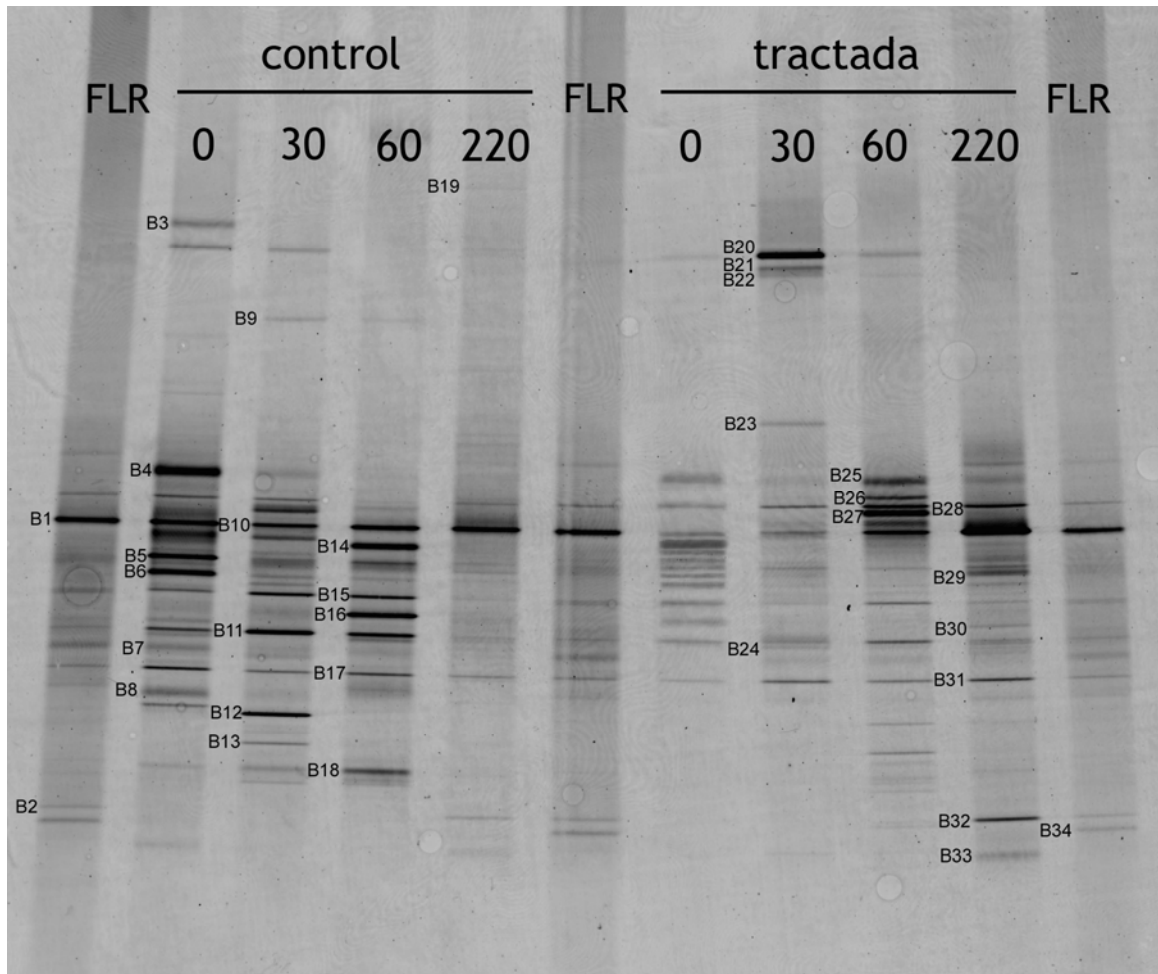


Figura 5.11. Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rDNA de les mostres preses als dies 0, 30, 60 i 220 a les parcel·les control i fertilitzada i a la mostra de referència (FLR), utilitzada com a marcador.

Taula 5.3. Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades.

Banda	Long. (pb)	Mostra on s'ha detectat <sup>a</sup>	Organisme més proper al GenBank (nº d'accés)	% similitud <sup>b</sup>	Grup filogenètic <sup>c</sup>
B1=B10	588	totes	Chromatiales no cultivat (EU375155)	99,0	Chromatiales ( $\gamma$ )
B2	522	C60, T60, C220, T220	<i>Rhodococcus fascians</i> (AJ576249)	99,8	Nocardiaceae (Bacteris gram+ d'elevat contingut G+C)
B3	568	C0, T30	<i>Mesonium motilonis</i> (DQ367409)	99,3	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
B4	603	totes excepte FLR	Bacteri de l'Àrtic (AF468353)	97,3	Sphingomonadaceae ( $\alpha$ )
B5	591	totes	<i>Salinisphaera shabanense</i> (AJ421425)	99,0	g proteobacteri desconegut
B6	554	totes excepte T220	<i>Rhodobacteraceae</i> CL-SP27 (AY906863)	97,5	Rhodobacteraceae ( $\alpha$ )
B7	454	totes excepte C60	<i>Thalassospira</i> sp. (EU239915)	99,1	Rhodospirillaceae ( $\alpha$ )
B8	548	totes excepte T30 i C220	<i>Thalassospira xianheensis</i> (EU017546)	95,8	Rhodospirillaceae ( $\alpha$ )
B9	532	C30, C60, T60, C220, T220	Bacteri no cultivat (AB062687)	98,0	<i>Bacteroidales</i> sense classificar (Bacteroidetes)
B10=B1	586	totes	Chromatiales no cultivat (EU375155)	99,0	Chromatiales ( $\gamma$ )



Taula 5.3. Continuació.

Banda	Long. (pb)	Mostra on s'ha detectat <sup>a</sup>	Organisme més proper al GenBank (nº d'accés)	% similitud <sup>b</sup>	Grup filogenètic <sup>c</sup>
B11	560	totes	<i>Roseobacter</i> sp. (AY349459)	99,3	Rhodobacteraceae (α)
B12	535	totes excepte C220	<i>Cobetia marina</i> (AY628694)	100	Halomonadaceae (g)
B13	536	C30	<i>Halomonas</i> sp. 7020 (AM111022)	99,4	Halomonadaceae (g)
B14	560	C60, T60, C220, T220, FLR	<i>Pseudoruegeria</i> sp. (FJ436725)	100	Rhodobacteraceae (α)
B15	440	totes	Bacteri del sòl no cultivat (DQ123693)	86,9	Rhodobacteraceae (α)
B16	586	totes excepte T220 i FLR	Bacteri no cultivat (DQ001707)	99,6	Chromatiales (γ)
B17=B31	560	totes	<i>Roseobacter</i> sp. (EU374898)	100	Rhodobacteraceae (α)
B18	571	C60, T60, FLR	<i>Corynebacterium variabile</i> (AJ783438)	98,8	Corynebacteriaceae (Bacteris gram+ d'elevat contingut G+C)
B19	579	C220	<i>Krokinobacter genikus</i> (AB198085)	98,8	Bacteroidetes desconegut
B20	578	C0, C30, T30, T60, C220	<i>Mesonía algae</i> (AF536386)	99,0	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
B21	551	T30	<i>Mesonía algae</i> (AF536386)	99,8	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
B22	473	T30	<i>Mesonía algae</i> (AF536386)	100	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
B23	547	totes excepte T0 i C60	<i>Salegentibacter mishustinae</i> (AY576653)	92,8	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
B24a	455	totes excepte T0, C60 i FLR	<i>Catellibacterium terrae</i> (DQ479950)	96,0	Rhodobacteraceae (α)
B24b	521	totes excepte T0, C60 i FLR	<i>Rhodovulum</i> sp. 3Vi (AJ891122)	93,1	Rhodobacteraceae (α)
B25	576	C30	<i>Flexibacter tractuosus</i> (AB078076)	98,9	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
B26a	584	totes	Chromatiales no cultivat (AM934735)	99,9	Moraxellaceae (γ)
B26b	560	totes	<i>Sphingopyxis baekryungensis</i> (AY608604)	99,6	Sphingomonadaceae (α)
B27	512	C60, T60, C220	<i>Sphingopyxis baekryungensis</i> (AY608604)	99,8	Sphingomonadaceae (α)
B28	519	totes	<i>Erythrobacter</i> sp. MOLA 72 (AM990847)	97,3	Sphingomonadaceae (α)
B29	545	totes excepte FLR	<i>Roseovarius crassostrae</i> (AF114484)	99,1	Rhodobacteraceae (α)
B30	558	C0, T0, C220, T220	Rhodobacteraceae CL-SP27 (AY906863)	95,3	Rhodobacteraceae (α)
B31=B17	561	totes	<i>Roseobacter</i> sp. (EU374898)	100	Rhodobacteraceae (α)
B32	567	FLR	<i>Rhodococcus fascians</i> (AJ576249)	99,1	Nocardiaceae (Bacteris gram+ d'elevat contingut G+C)
B33	558	C0, T30, T60, C220, T220	<i>Rhodococcus</i> sp. (AJ002093)	98,5	Nocardiaceae (Bacteris gram+ d'elevat contingut G+C)
B34	559	T30, T60, C220, FLR	<i>Rhodococcus</i> sp. (AJ002093)	100	Nocardiaceae (Bacteris gram+ d'elevat contingut G+C)

<sup>a</sup> Mostres en què la banda suposa més d'un 2% de la intensitat relativa.

<sup>b</sup> A l'organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>c</sup> De l'organisme més proper trobat al Ribosomal Database Project II (Cole et al., 2005). α i γ representen α i γ-Proteobacteria, respectivament.

Això no obstant, la representació dels diversos grups filogenètics no ha estat homogènia i han predominat les  $\alpha$ -Proteobacteria, a diferència d'en estudis anteriors, com els duts a terme per Kasai i col·laboradors (2001) en el cas del *Nakhodka*, en què  $\alpha$ -Proteobacteria fou únicament un grup minoritari. La importància relativa d'aquest grup, però, ha minvat al final de l'experiment a la parcel·la control, paral·lelament a l'aparició del grup Actinobacteria (dia 60) i a l'augment de  $\gamma$ -Proteobacteria (figura 5.12).

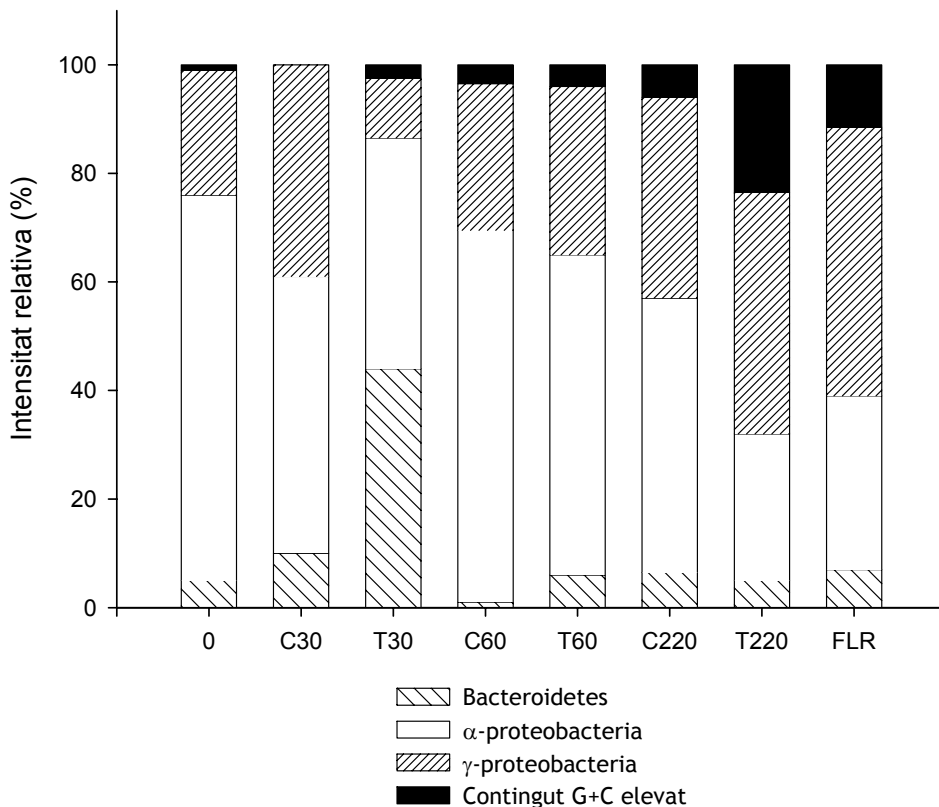


Figura 5.12. Evolució de la comunitat microbiana al llarg de l'experiment, en funció de la intensitat relativa de cada grup filogenètic. C i T indiquen parcel·la control i tractada, respectivament; 0-220, el nombre de dies.

Com a la parcel·la control, a la fertilitzada  $\alpha$ -Proteobacteria decreix i  $\gamma$ -Proteobacteria augmenta, si bé en aquest cas els canvis són més apreciables. El grup Actinobacteria apareix abans (dia 30) i al final de l'experiment és més abundant.

El grup Bacteroidetes és minoritari en ambdues parcel·les, excepte a la parcel·la fertilitzada al dia 30 (T30), en què hi ha un increment dràstic, que podria estar relacionat amb la presència del fertilitzant oleofílic. Cal recordar que únicament se n'han fet dues aplicacions, als dies 0 i 20 de l'experiment, ja que en les campanyes posteriors la presència d'aquest grup minva de nou.

Sorprenentment, el perfil de DGGE de la mostra de Galícia (FLR) que s'ha utilitzat com a marcador mostra una elevada similitud amb els perfils del final del experiment als 220 dies, especialment amb el de la parcel·la control. Donat que la mostra FLR va ser recollida als 16

mesos de produir-se el vessament i que quan es va acabar l'experiment en feia 18, aquestes similituds podrien ser degudes a una possible adaptació de les comunitats al fuel amb graus similars d'envelliment. També podria ser que es recuperessin les poblacions indígenes presents abans de l'accident, hipòtesi que, malauradament, no pot comprovar-se ja que no es disposa de mostres prèvies a la contaminació per petroli.

Pel que fa a la diversitat microbiana, representada per l'índex de Shannon-Wiener, no s'han observat canvis significatius entre l'inici ( $1,1 \pm 0,1$ ) i el final de l'experiment ( $0,75 \pm 0,25$ ), ni en la parcel·la control ni en la tractada (figura 5.13). L'hipotètic impacte de la bioremediació en la diversitat microbiana encara s'està debatent. Mentre que en alguns treballs se n'han descrit fortes reduccions (Ogino et al., 2001; Röling et al., 2002; Viñas et al. 2005) durant i després de tractaments de fertilització, en d'altres (Zucchi et al., 2003; Kaplan i Kitts, 2004) se n'han detectat increments.

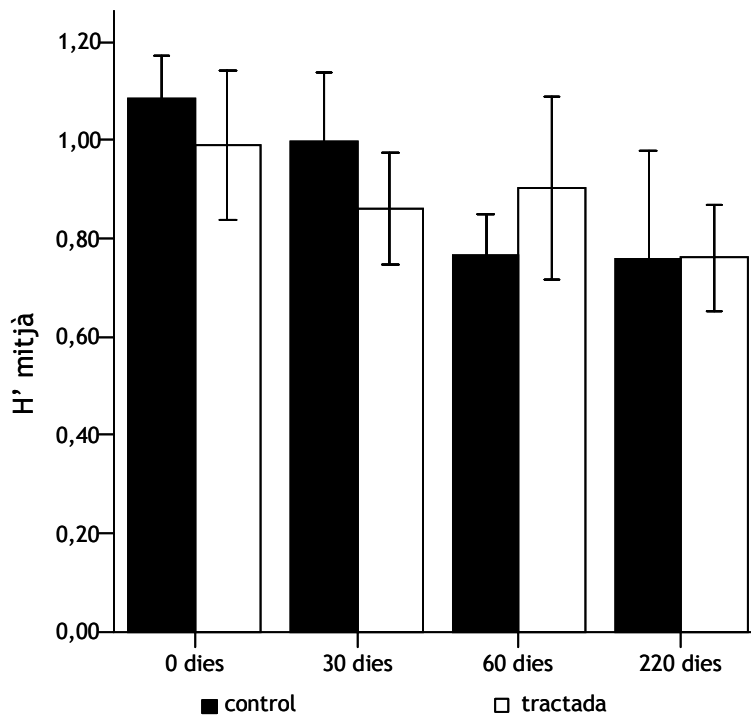


Figura 5.13 Índex de Shannon-Wiener ( $H'$ ) de la diversitat bacteriana estimada, basat en els perfils de DGGE. Les barres d'error representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents.

### 5.2.1. Anàlisi de components principals

Tot i el clar predomini d'algunes de les bandes (per exemple B4 en ambdues parcel·les a l'inici, i B20 a la parcel·la tractada el dia 30, figura 5.11) resulta difícil analitzar l'evolució de l'estructura de la comunitat microbiana només a partir de la intensitat relativa de cada banda. A més, no pot apreciar-se si hi ha canvis significatius. Així doncs, s'han avaluat els canvis temporals de l'estructura poblacional per anàlisi de components principals (PCA). Representant gràficament les dues primeres components (les quals expliquen el 55,8% de la variabilitat), s'han detectat dos clústers significativament diferents ( $p < 0,05$ ): un amb les

mostres del dia 30 de la parcel·la fertilitzada (T30) i l'altre amb la resta de les mostres (figura 5.14).

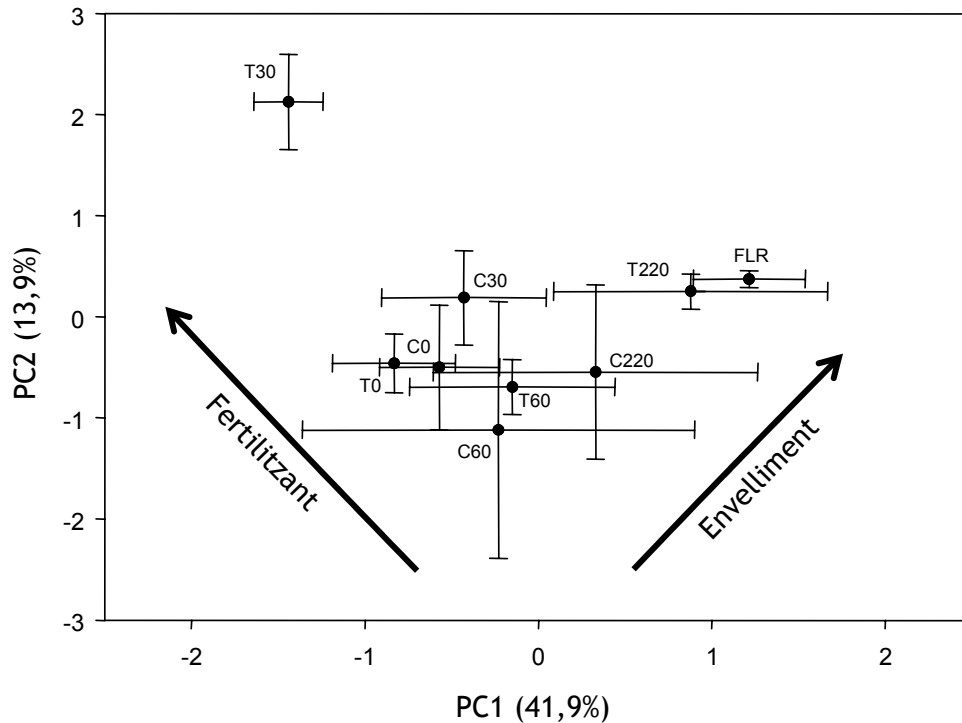


Figura 5.14. Diagrama de dispersió per a les dues primeres variables (PC1 i PC2) obtingudes en l'anàlisi de components principals. Cada punt representa la mitjana de tres mostres i les barres d'error la desviació estàndard. Les fletxes mostren graus d'envelliment de les mostres creixents i quantitat de fertilitzant disponible.

Pel que fa a la primera component (PC1), l'anàlisi de variància ha permès detectar diferències significatives ( $P < 0,05$ ) entre les mostres FLR i les de Cantàbria dels dies 0 a 60. I també entre les mostres tractades del dia 220 (T220) i les mostres dels dies 0 a 30. No se n'han trobat, en canvi, entre les mostres FLR i les de Cantàbria del final de l'experiment, ni per l'anàlisi de variància ( $P > 0,05$ ), ni per l'anàlisi del coeficient de correlació de Pearson ( $r = 0,68 \pm 0,20$  per a FLR vs parcel·la control i  $r = 0,81 \pm 0,13$  per a FLR vs parcel·la tractada).

És probable que aquesta component reflecteixi els canvis deguts a l'envelliment del petroli ja que, tot i que no hi ha diferències significatives, es veu una ordenació d'esquerra a dreta; és a dir, les mostres més tardanes presenten valors més alts. L'única excepció és la mostra T30, però aquesta divergència pot ser més atribuïble a la selecció a curt termini causada pel fertilitzant oleofílic. És important, doncs, conèixer quines són les bandes que permeten explicar la variabilitat en aquesta component, ja que, en cas de contribuir-hi positivament, podrien indicar la participació del microorganisme en els darrers estadis de la biodegradació.

La banda amb més pes en aquesta component (amb un coeficient de 0,99) ha estat la banda B1 (o B10) (figura 5.15), la qual ha estat detectada tant en les mostres de Cantàbria com en les mostres FLR (46% de la intensitat de pic). Aquesta banda es manté al llarg de l'experiment i incrementa la intensitat relativa, del 14% inicial al 30-37% al final.

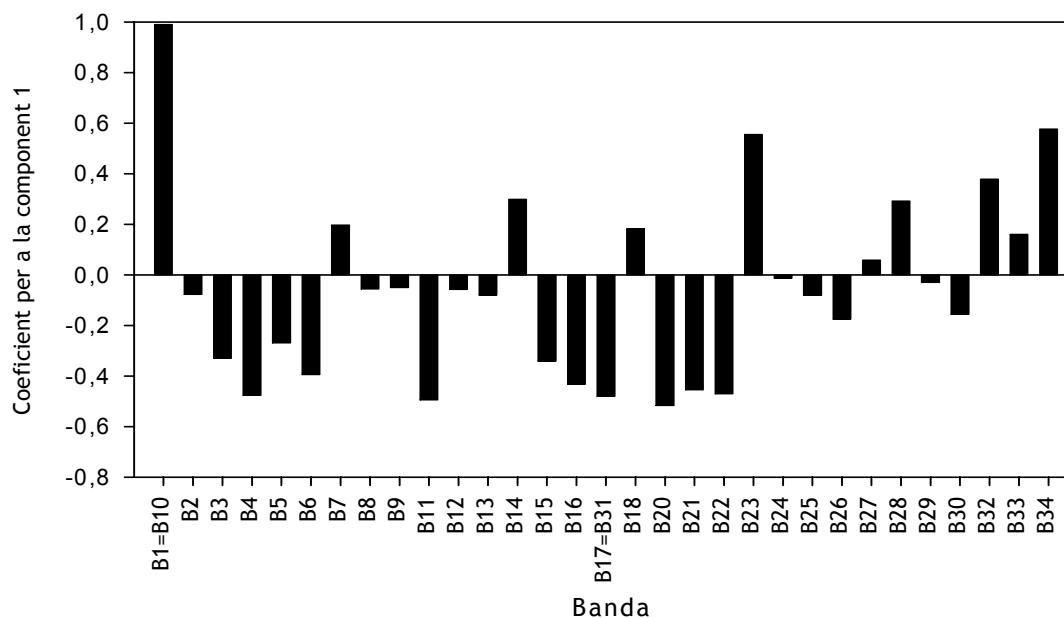


Figura 5.15. Coeficients de cada banda en la component 1.

Si bé no s'ha pogut establir el paper que juga aquest bacteri (afiliat a Chromatiales,  $\gamma$ -Proteobacteria, taula 5.3), no pot descartar-se que participi, d'alguna manera, en la degradació del petroli. Kim i Crowley (2007) trobaren representants de les famílies Ectothiorhodospiraceae i Chromaticeae, les més properes filogenèticament (figura 5.16), en dipòsits d'asfalts. Així mateix, Gomes i col·laboradors (2008) identificaren membres d'Ectothiorhodospiraceae en un manglar contaminat per hidrocarburs, en què hi havia evidències de processos de biodegradació.

Destaquen, també, les bandes B32 i B34, que pertanyen al gènere *Rhodococcus* i apareixen a les mostres d'ambdues parcel·les del final de l'experiment i a les de Galícia (FLR), respectivament. Alonso-Gutiérrez aïllà una soca de *Rhodococcus* pertanyent al clúster filogenètic de *R. fascians* de les mostres de FLR en plaques d'agar mineral amb *n*-hexadecà com a única font de carboni i energia (resultats no publicats). La soca era idèntica a la banda B34, que únicament presenta quatre bases diferents respecte B32.

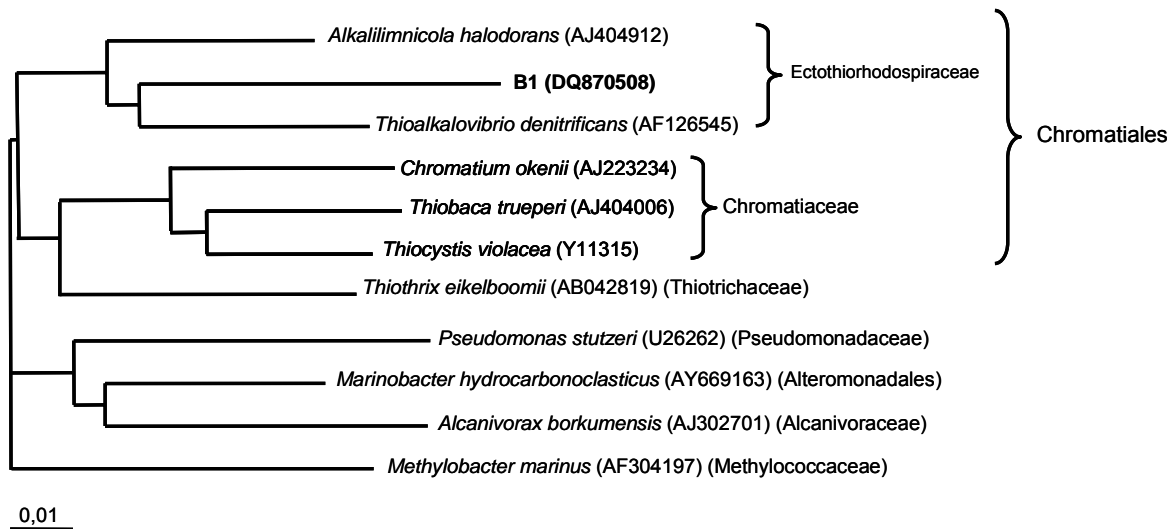


Figura 5.16. Arbre filogenètic que mostra les relacions entre soques tipus de  $\gamma$ -Proteobacteria i la banda B1. Entre parèntesis hi ha el codi d'accés. L'arbre s'ha generat emprant el mètode de *neighbour joining* amb anàlisi de *bootstrap* de 1.000 rèpliques.

*Rhodococcus* s'ha associat a la degradació d'*n*-alcans de fins a 36 carbonis (Yuste et al., 2000; Whyte et al., 2002; Quatrini et al., 2008) i d'alcans ramificats (Whyte et al., 1998). Així mateix, s'ha detectat en localitats amb petroli envellit, contaminades de fa temps (Quatrini et al., 2008). Cal recordar (vegeu 1.2.1) que el fuel del *Prestige* conté una proporció elevada d'alcans pesants que augmenta amb l'envelliment. Podria ser, doncs, que el gènere *Rhodococcus* estigués duent a terme la degradació d'aquests alcans, que són els que es degraden més tard (vegeu 5.1.1).

Altres bandes rellevants han estat la B23, identificada com a membre de Flavobacteriaceae relacionat amb *Salagentibacter mishustinae*; la banda B4, de l'ordre Sphingomonadaceae, propera a *Citricella*, que també ha estat trobada mitjançant una llibreria de clons del gen 16S rRNA a Galícia (Alonso-Gutiérrez et al., 2009); les bandes B11 i B17 (o B31), properes a *Roseobacter* i trobades també a per llibreria de clons per Alonso-Gutiérrez et al. (2009); la banda B16, que correspon a un organisme de l'ordre Chromatiales sense classificar, proper també a Ectothiorhodospiraceae, o el clúster de bandes B20-B22, que corresponen a *Mesonía algae* (99-100% de similitud), organisme afiliat a Flavobacteriaceae (Bacteroidetes).

A la segona component (PC2), gran part de la variabilitat s'explica per la presència de les bandes B20-B22 (amb coeficients de 0,75, 0,67 i 0,69 i intensitats relatives de 29,7, 6,9 i 2%, respectivament) (figura 5.17), identificades com a *Mesonía algae*. Aquesta espècie s'ha detectat després de l'addició de S200 (mostres de la parcel·la tractada al dia 30), creix en pocs substrats (cap dels quals hidrocarbur) i s'ha associat a l'alga *Achrosiphonia sonderi* (Nedashkovskaya et al., 2003). La seva presència podria indicar la resposta de la comunitat a l'addició de N i P als dies 0 i 20, reflectit en un creixement algal. Maki et al. (2003) observaren que l'addició d'un fertilitzant d'alliberament lent incrementava la clorofil·la

present a les mostres fertilitzades. Així doncs, valors alts en aquesta component podrien indicar presència del fertilitzant oleofilic.

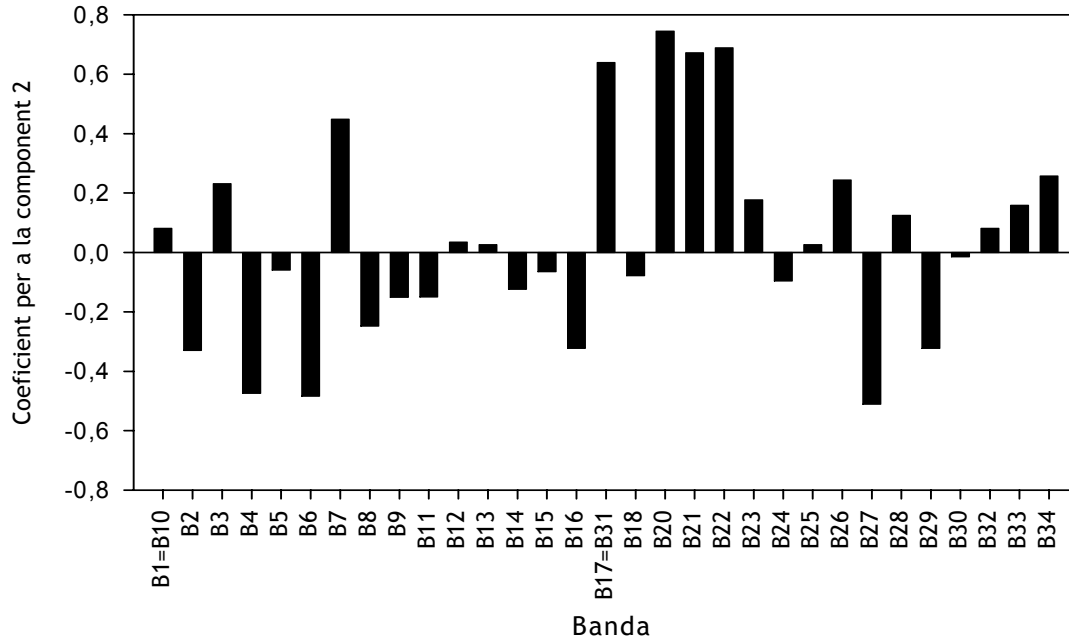


Figura 5.17. Coeficients de cada banda en la component 2.

Altres bandes destacables són la B7, que correspon a *Thalassospira* sp. (99,1% de similitud), gènere potencialment degradador d'HAP (Cui et al., 2008), la B17, Rhodobacteraceae trobat i aïllat també a Galícia per Alonso-Gutiérrez et al.(2009), la B4, la B6, Rhodobacteraceae proper a *Maribius pelagius*, i la B27, identificada com a *Sphingopyxis baekryungensis* (99,8% de similitud). Les dues primeres hi contribueixen positivament i les altres de manera negativa. Si bé no es tenen dades per poder-ho afirmar, podria ser que els primers microorganismes tinguessin preferència per ambients eutròfics, mentre que els darrers preferissin els oligotròfics.

Afegint una tercera component (PC3) de l'anàlisi de components principals, podem arribar a explicar el 66,7% de la variabilitat de les mostres. La figura 5.18 mostra el diagrama de dispersió per a les components primera i tercera, en el qual no s'observa un patró de distribució clar de les mostres. Malgrat això, s'ha mirat quines són les bandes amb major pes, per tal d'intentar assignar un significat a aquesta component.

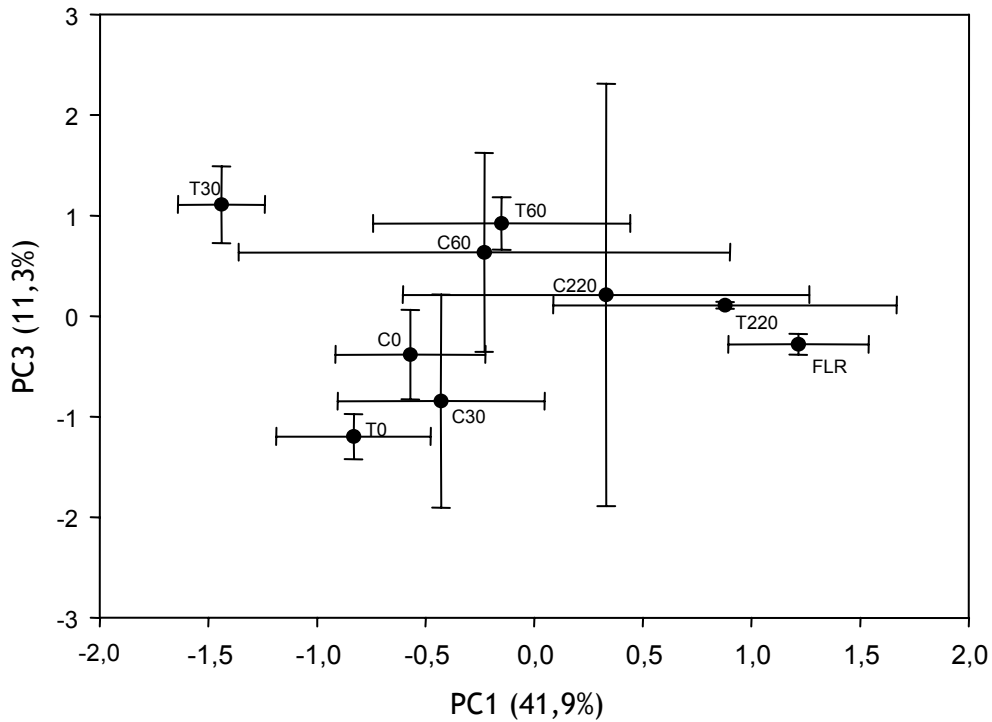


Figura 5.18. Diagrama de dispersió per a les variables primera i tercera (PC1 i PC3) obtingudes en l’anàlisi de components principals. Cada punt representa la mitjana de tres mostres i les barres d’error la desviació estàndard.

En aquest cas, les bandes amb major pes són la banda B27, identificada com a *Sphingopyxis baekryungensis* (99,8% de similitud); en menor mesura, el clúster de *Mesonía Algae* (B20-B22), i les bandes B11 i B15, que corresponen a un membre de l’ordre Rhodobacteraceae que també ha estat identificat a Galícia per Alonso-Gutiérrez et al. (2009) (figura 5.19). Malauradament, la informació sobre aquestes soques de què disposem és molt escassa, de manera que no ha estat possible atribuir una explicació a aquesta component.

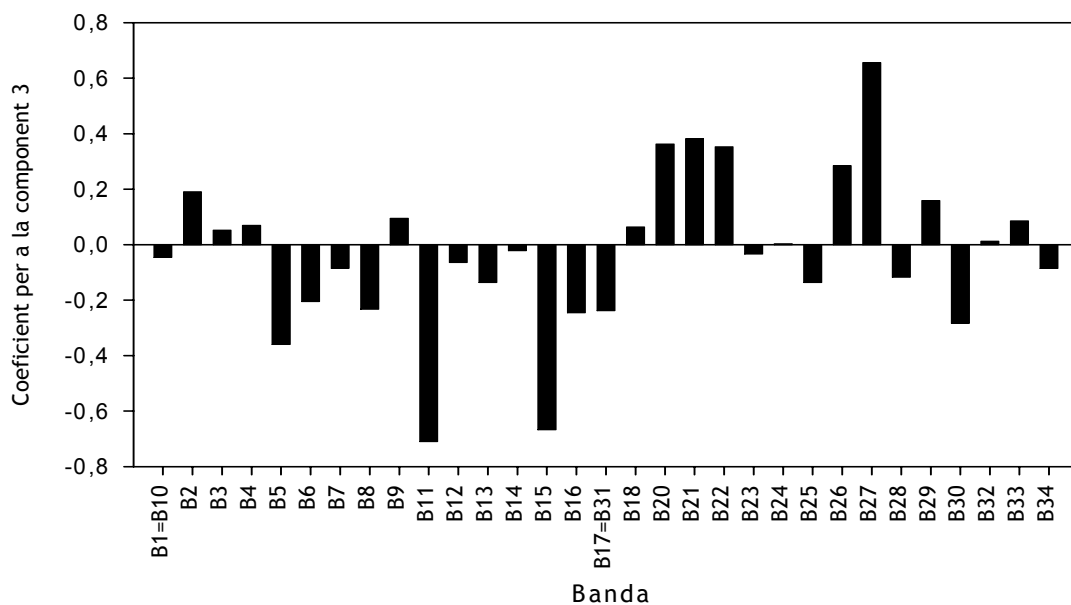


Figura 5.19. Coeficients de cada banda en la component 3.



### 5.3. Conclusions

L'anàlisi química de les mostres ha posat de manifest l'existència de patrons que ja havien estat observats in vitro (vegeu el capítol 4). La degradació de les parafines en les parcel·les experimentals decreix en augmentar la longitud de la cadena, i la dels HAP minva en augmentar el nombre d'anells i el grau d'alquilació. Les semivides augmenten segons aquests patrons.

Si bé s'ha produït una degradació intrínseca d'ambdues fraccions en ambdues parcel·les, l'addició de fertilitzant *S200* l'ha incrementat i accelerat significativament, especialment en aquells compostos amb un nombre més elevat de carbonis (parafines) i de substituents alquílics (aromàtics). La causa, probablement, és un increment de la biodisponibilitat, propiciat per la presència d'un tensioactiu en la formulació del producte.

Les relacions  $\%27\text{dia}$ ,  $\%27\text{BB}$  i  $\%29\text{BB}$ ,  $\text{D2/C2}$ ,  $\text{D3/C3}$ ,  $\text{2MP/1MP}$ ,  $\text{2+3MD/1MD}$  poden resultar molt útils com a índexs d'envelliment, mentre que d'altres relacions, com  $\text{D3/P3}$  i  $\%27\text{BB}$ , per exemple, s'han conservat més, de manera que serien més útils com a índex d'origen, si més no a l'escala temporal en què s'ha dut a terme l'experiment.

Pel que fa a la comunitat microbiana, cal destacar la presència del grup *Rhodococcus*. Aquests microorganismes s'han associat a la degradació dels *n*-alcans de fins a 36 carbonis així com a la d'alcans ramificats. Donat que la seva presència augmenta al final del experiment i que el fuel del *Prestige* presenta un alt contingut en alcans d'alt pes molecular, aquest grup podria tenir un paper important en la degradació del fuel. Amb tot, fóra necessari dur a terme estudis específics per determinar-ho de manera fefaent

Un altre fet a destacar és la similitud entre les poblacions de Cantàbria del present estudi i les trobades a la costa de Galícia també afectada pel *Prestige* i amb un grau d'envelliment del fuel similar.

En aquest capítol s'ha estudiat l'efecte que produeix la biodegradació in situ sobre el fuel del *Prestige*. Ara bé, a l'ambient intervenen simultàniament altres processos que n'afecten la composició, com ara la fotooxidació, de manera que l'envelliment observat és el resultat de l'acció conjunta de tots aquests processos.

D'altra banda, si bé s'han caracteritzat de manera exhaustiva les fraccions lleugeres del fuel (alifàtica i aromàtica), seria interessant analitzar-ne les fraccions més polars i pesants (p. ex. resines i asfaltens), atès l'elevat contingut en el fuel.

Pel que fa a les comunitats microbianes, tot i que s'han identificat una sèrie de microorganismes que poden intervenir en la degradació del fuel, no s'ha pogut concretar quin paper hi desenvolupen.

Per tot això, s'ha vist necessari dur a terme un experiment in vitro utilitzant, en aquest cas, un consorci microbià autòcton, procedent de la mostra M81 (vegeu el capítol 4).

- En el capítol 6 es descriurà la caracterització tant de l'inòcul inicial, com del procés d'enriquiment i del consorci autòcton resultant.
- En els capítols 7 i 8 s'estudiaran els processos de degradació tant des del punt de vista químic com microbiològic.

