

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.

Capítol 6

Obtenció d'un consorci microbià autòcton degradador de fuel

Tenint en compte els resultats del primer experiment in vitro (vegeu el capítol 4), s'ha procedit a l'obtenció d'un consorci degradador autòcton a partir de la mostra de *chapapote* (M81) amb la qual s'havia efectuat l'assaig de biodegradació amb els consorcis al·lòctons. Per tal d'avaluar els canvis en la comunitat microbiana al llarg del procés d'enriquiment, s'ha caracteritzat tant la mostra inicial com el consorci resultant. A més, s'ha dut a terme un seguiment de la capacitat catabòlica de la comunitat al llarg del període d'enriquiment.

6.1. Inòcul. Caracterització inicial

S'ha caracteritzat l'estructura de la comunitat microbiana present a la mostra M81, utilitzada com a inòcul per obtenir el consorci, mitjançant dues tècniques independents de cultiu (DGGE i llibreria de clons del gen 16sRNA) i amb l'obtenció de soques degradadores d'hidrocarburs.

6.1.1. Anàlisi per llibreria de clons

S'han analitzat 50 clons ja que, atenent a la corba de rarefacció obtinguda (figura 6.1), s'ha considerat que la riquesa d'espècies no augmentaria significativament si amplièssim el mostreig. A més, aquest nombre de clons garanteix que s'obtindrà una sensibilitat a la detecció de diversitat similar a l'obtinguda per DGGE, mètode que pot detectar organismes que representen al voltant del 2% de la població total de la mescla (Muyzer et al., 1993; Stephen et al., 1999). La riquesa (S) estimada de la comunitat, calculada a partir de l'observada, ha estat d'aproximadament 11 espècies. Les relacions filogenètiques dels clons es troben representades a la figura 6.2.

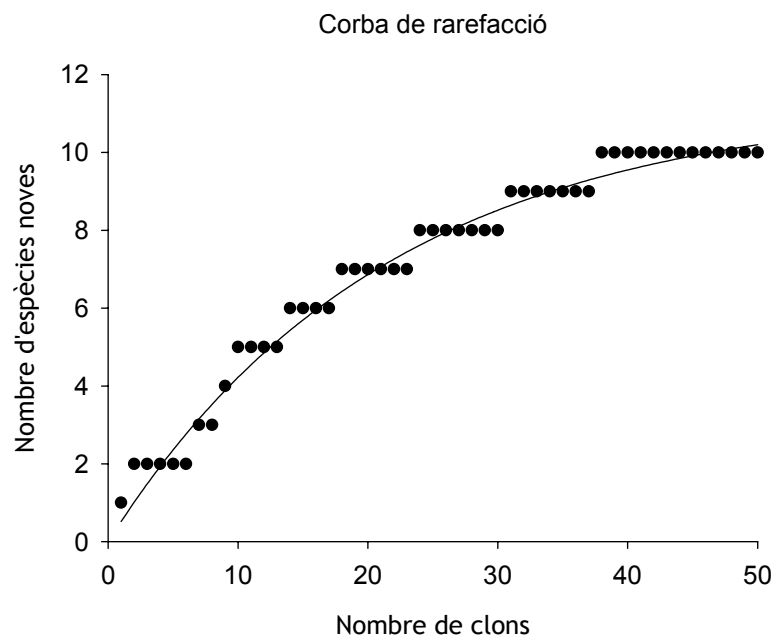


Figura 6.1. Corba de rarefacció per a la llibreria de clons (n=50).

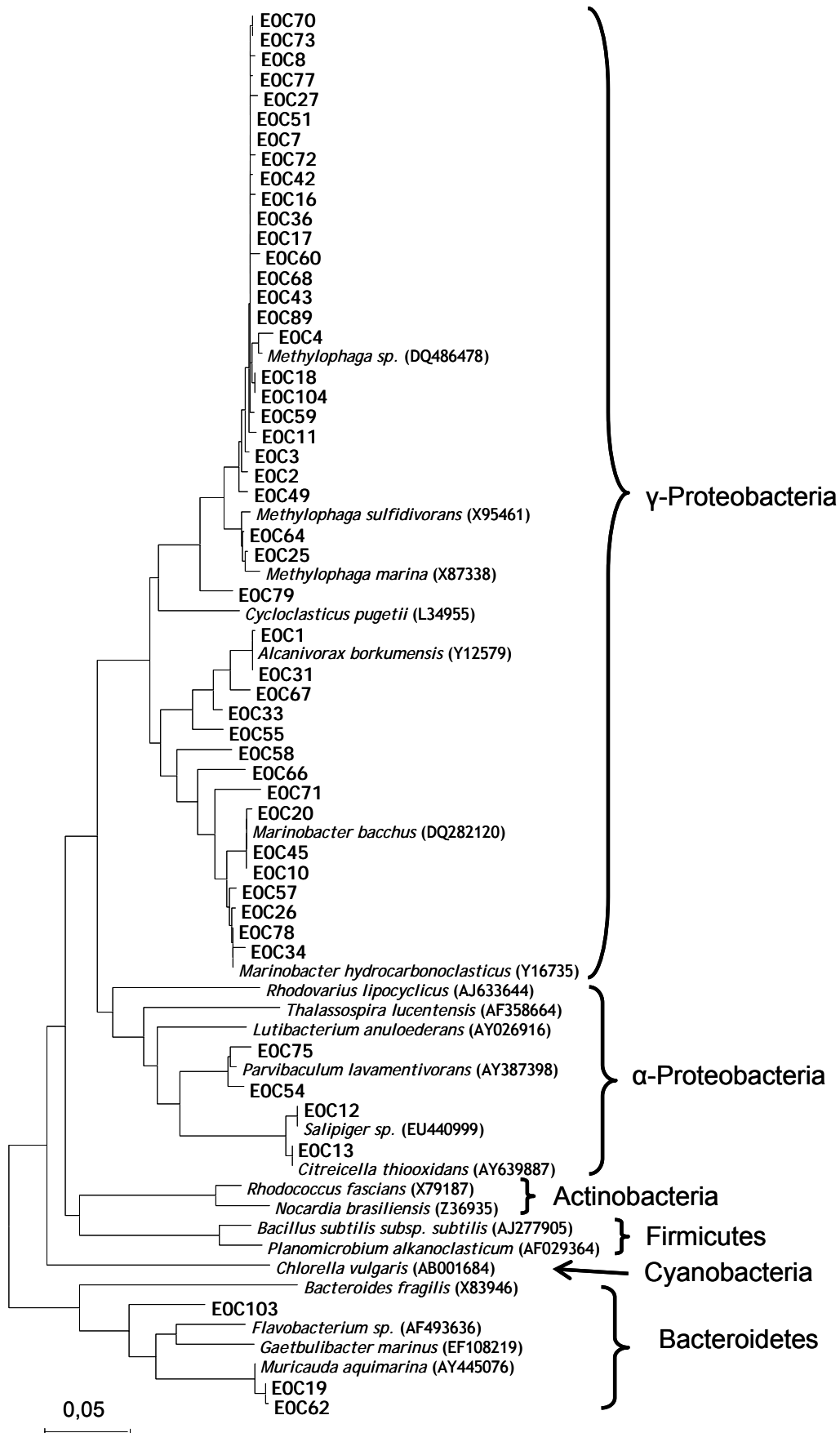


Figura 6.2. Arbre filogenètic que mostra les relacions dels diferents clons seqüenciats i diverses soques de referència, entre parèntesis hi ha el codi d'accés. L'arbre s'ha generat emprant el mètode de *neighbour joining* amb anàlisi de *bootstrap* de 1.000 rèpliques. La longitud de les seqüències emprades és d'aproximadament 1.350 parells de bases.

La majoria dels clons analitzats han resultat ser integrants del gènere *Methylophaga* (Piscirickettsiaceae) (figura 6.3), així com d'altres gèneres de gamma-proteobacteris. Aquests resultats s'adiuen amb els obtinguts per Yakimov i col·laboradors (2004) a un estudi dut a terme a l'Antàrtic. Així mateix, Schwermer et al. (2008) detectaren majoritàriament *Methylophaga* als biofilms de les canonades utilitzades per injectar aigua marina a les extraccions de petroli.

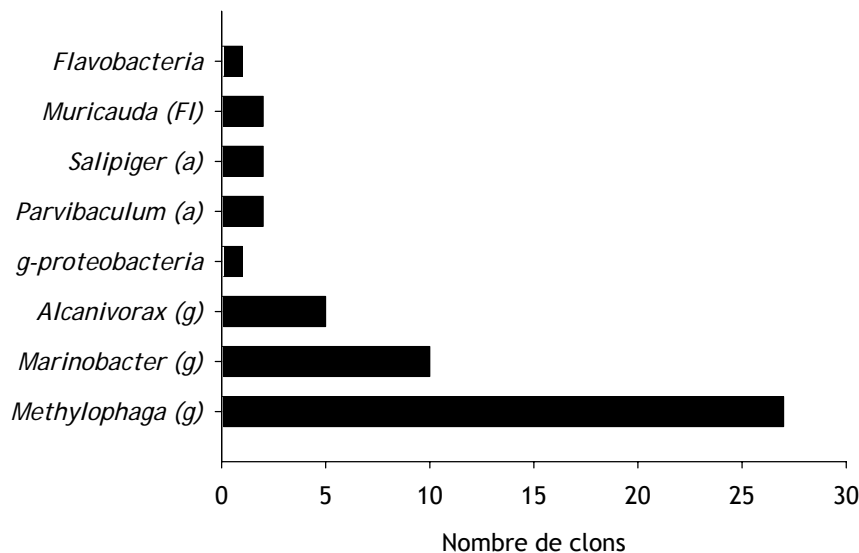


Figura 6.3. Proporció de cada tàxon (n=50).

El gènere *Methylophaga* comprèn bacteris aerobis, halofílics i metilotròfics, que no utilitzen metà com a font de carboni i energia (Janvier i Grimont, 1995), però sí altres compostos amb un sol àtom de carboni com ara metanol o metilamina (Neufeld et al., 2007b) o amb dos, com el sulfur de dimetil (de Zwart et al., 1996). La majoria dels integrants del gènere han estat aïllats d'ambients marins. Els oceans són un gran reservori de metanol, ja que aquest compost C₁ es diposita, produeix i consumeix en ambients marins. La metilamina es produeix com a resultat de la transformació d'un compost osmoregulator present en algues, invertebrats i peixos en resposta a la salinitat (Gibb i Hatton, 2004).

Si bé la seva relació amb la biodegradació d'hidrocarburs no és clara, s'ha detectat presència de representats d'aquest gènere en diversos estudis de degradació d'hidrocarburs en ambients marins (Röling et al., 2002; Yakimov et al., 2004; Cui et al., 2008), així que no se'n pot descartar la participació en la biodegradació del petroli. Cal considerar que en la biodegradació d'alguns HAP es pot generar la pèrdua de compostos C₁ com els descrits per al fluorè (Grifoll et al., 1992), el fluorantè (Weissenfels et al., 1991) i el pirè (Heitkamp et al., 1988); així doncs, és possible que *Methylophaga* desenvolupi un paper en la completa mineralització dels HAP.

D'altra banda, la presència de *Methylophaga sulfidivorans*, degradadora de dimetilsulfur (De Zwart i Kuelen, 1997), podria estar relacionada amb l'elevat contingut de sofre del fuel del *Prestige*.

Destaquen, també, els gèneres *Marinobacter* (Alteromonadaceae) i *Alcanivorax* (Alcanivoracaceae), considerats *bacteris marins degradadors de petroli obligats* (Yakimov et al., 2007) o *hidrocarbonoclàstics* (dos Santos et al., 2008); és a dir, bacteris heteròtrofs que creixen exclusivament en hidrocarburs. Aquests gèneres han estat descrits com a primers colonitzadors després de l'accident del *Nakhodka*, com a degradadors primaris de les fraccions més làbils (Kasai et al., 2002; Maruyama et al., 2003), per la qual cosa la seva presència en el *chapapote* estaria en concordança amb aquestes descripcions.

Pel que fa a *Marinobacter*, s'han descrit soques varies amb capacitat degradadora d'alcans linials o d'hidrocarburs aromàtics (*M. alkaliphilus*, *M. aquaeolei*, *M. arcticus*, *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. maritimus* i *M. squalenivorans*) (Gauthier et al., 1992; Rontani et al., 1997; Huu et al., 1999; Lattuati et al., 2002), les quals s'han trobat en diversos ambients marins i en experiments de bioremediació de petroli (Röling et al., 2002; Yakimov et al., 2004 i 2005).

Però sens dubte és el gènere *Alcanivorax* el paradigma de bacteri *hidrocarbonoclàstic*: el seu ús exclusiu d'alcans (linials o ramificats), *n*-alquilcicloalcans o *n*-alquilbenzens com a font de carboni i energia ha estat descrit a bastament (Yakimov et al., 1998; Dutta i Harayama, 2001; Hara et al., 2003; Liu i Shao, 2005) i s'ha detectat en nombroses ocasions associat a vessaments de petroli, particularment en els primers estadis de degradació (Kasai et al., 2001 i 2002; Röling et al., 2002; Yakimov et al., 2004, 2005 i 2007; Head et al., 2006; Nakamura et al., 2007; Alonso-Gutiérrez et al., 2008; etc).

Pot sobtar que en aquesta mostra *Alcanivorax* no sigui el gènere predominant; ara bé, estudis anteriors indiquen que quan la concentració de nutrients no és suficient aquest gènere pot ser desplaçat competitivament per altres microorganismes *hidrocarbonoclàstics* (Coulon et al., 2007). És per això que en localitats amb baixes concentracions de nutrients tampoc se n'ha trobat la concentració esperada (Kasai et al., 2002, Hara et al., 2003). Podria ser el cas d'aquesta mostra, ja que les aigües de la costa gallega presenten concentracions baixes de nutrients.

A banda dels bacteris considerats *hidrocarbonoclàstics*, s'ha detectat un altre gènere, en aquest cas d'alfa-proteobacteri, la presència del qual acostuma a associar-se a la degradació d'hidrocarburs, *Parvibaculum* (Phyllobacteriaceae). En concret, l'espècie *Parvibaculum lavamentivorans* té capacitat per créixer en diversos *n*-alcans i amb àcids grassos i alcohols derivats (Schleheck et al., 2004). Així mateix, s'han aïllat integrants del mateix gènere utilitzant HAP com a substrat (Hyliard et al., 2008).

En menor mesura s'han trobat integrants dels gèneres *Salipiger* i *Citreicella* (α -Proteobacteria) i *Muricauda* (Flavobacteria). Soques de *Salipiger bermudensis* degradadores d'alcans lineals, isoprenoides i metilfenantrens han estat aïllades en aigües marines (Harwati et al., 2007). El gènere *Citreicella* ha estat anteriorment detectat en una localitat de Galícia (Faro de Lariño) contaminada per petroli del *Prestige* (Alonso-Gutiérrez et al., 2009) i podria estar relacionada tant amb la degradació de fenantrè (Alonso-Gutiérrez et al., 2009) com amb l'oxidació del sofre present a la mostra (Sorokyn et al., 2005).

Per últim, pel que fa a *Muricauda*, la relació amb la degradació d'hidrocarburs no és clara. Si bé, per exemple, es va poder aïllar *Muricauda ruestringensis* d'una comunitat microbiana que creixia i degradava *n*-hexadecà (Bruns et al., 2001), no es va poder fer que degradés *n*-hexadecà.

6.1.2. Anàlisi per DGGE

L'anàlisi per DGGE de la mostra emprada com a inòcul ha permès detectar 13 bandes diferents, les relacions filogenètiques de les quals es mostren a la figura 6.4.

Si bé la composició de la comunitat microbiana trobada emprant les dues tècniques és similar, s'han detectat diferències. En primer lloc, destaca l'absència de *Methylophaga* en el perfil de DGGE, malgrat que és el gènere més representat en la llibreria de clons. Per contra, s'han detectat integrants del gènere *Thalassospira*, *Lutibacterium*, i *Alcaligenes* (α , α i β -Proteobacteria, respectivament), els quals han estat relacionats amb la degradació del petroli i, en concret, d'HAP (Weissenfels et al., 1999; Chung i King, 2001; McKew et al., 2007a; Cui et al., 2008; Kodama et al., 2008). A més, en un estudi efectuat amb fuel del *Prestige* (Alonso-Gutiérrez et al., 2009) es va identificar *L. anuloderans* com a microorganisme relacionat amb la degradació d'aromàtics.

Chang i col·laboradors (2000) també van observar lleugeres diferències en analitzar comunitats microbianes aquàtiques degradadores d'hidrocarburs per llibreria de clons i per DGGE amb diferents parells d'encebadors. Segons els autors, mentre que la llibreria de clons selecciona preferentment els tàxons més abundants, la DGGE detecta sobretot seqüències que tenen una desnaturalització poc usual o amb un elevat contingut en G+C. L'estructura de la comunitat estudiada per mètodes que depenen de la PCR, doncs, està intrínsecament relacionada amb el mètode que se seleccioni per determinar-la.

Així doncs, es pot suposar que *Alcaligenes* i *Thalassospira* no són prou abundants per ser detectats mitjançant la llibreria de clons amb el límit de detecció emprat. Pel que fa a *Methylophaga*, és probable que el baix contingut en G+C (38,0–49,0% mol) que presenta aquest gènere (Janvier et al., 2003) faci que no aparegui una banda prou nítida en el gel de DGGE. Un altre factor a considerar, que intervindria tant en el primer cas (*Alcaligenes* i *Thalassospira*), com en el segon (*Methylophaga*), és la possible diferència d'afinitat per les parelles d'encebadors utilitzats en les PCR per a llibreria de clons i DGGE.

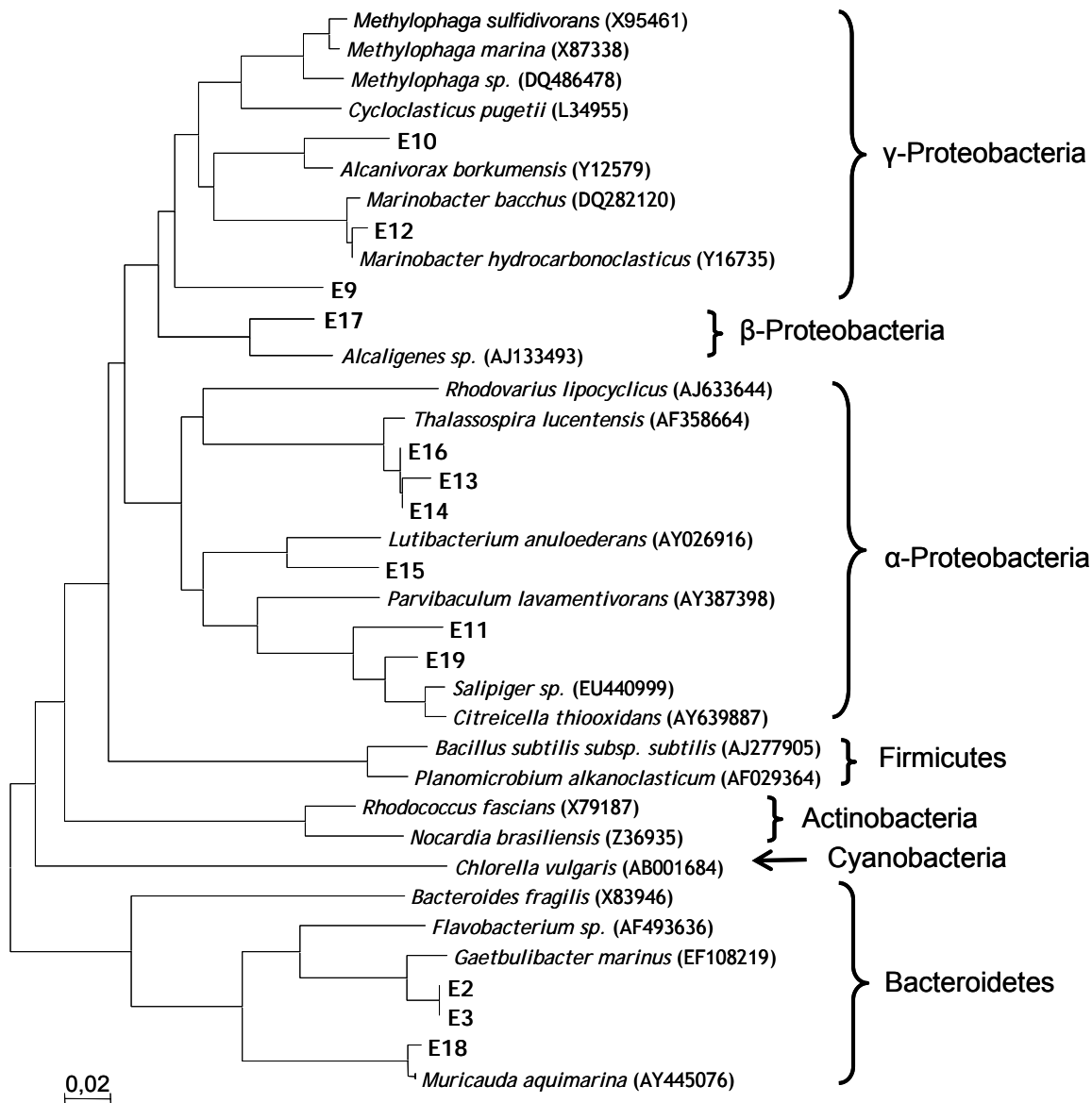


Figura 6.4. Arbre filogenètic que mostra les relacions de les diferents bandes seqüenciades i diverses soques de referència, entre parèntesis hi ha el codi d'accés. L'arbre s'ha generat emprant el mètode de *neighbour joining* amb anàlisi de *bootstrap* de 1.000 rèpliques. La longitud de les seqüències és d'aproximadament 450 parells de bases.

6.1.3. Aïllament de soques degradadores d'hidrocarburs

Les tècniques per a l'anàlisi microbiològica que depenen de cultiu només permeten aïllar microorganismes que poden créixer en el medi de cultius que dissenyem. Malgrat aquest inconvenient (vegeu 1.6), possibiliten la detecció de tàxons que són poc abundants a la comunitat microbiana però que poden tenir un fenotip desitjat; és a dir, que poden presentar capacitats metabòliques interessants. Per aquest motiu s'ha emprat aquesta metodologia per obtenir soques potencialment degradadores d'hidrocarburs, la qual cosa fa possible efectuar assajos per conèixer-ne la fisiologia.

Seguint la metodologia descrita anteriorment (vegeu 3.7.3), s'han volgut aïllar soques de microorganismes heteròtrofs, degradadors d'alcans i degradadors d'aromàtics. Després de

diverses ressembres, se n'han obtingut 11, les relacions filogenètiques de les quals es troben representades a la figura 6.5)

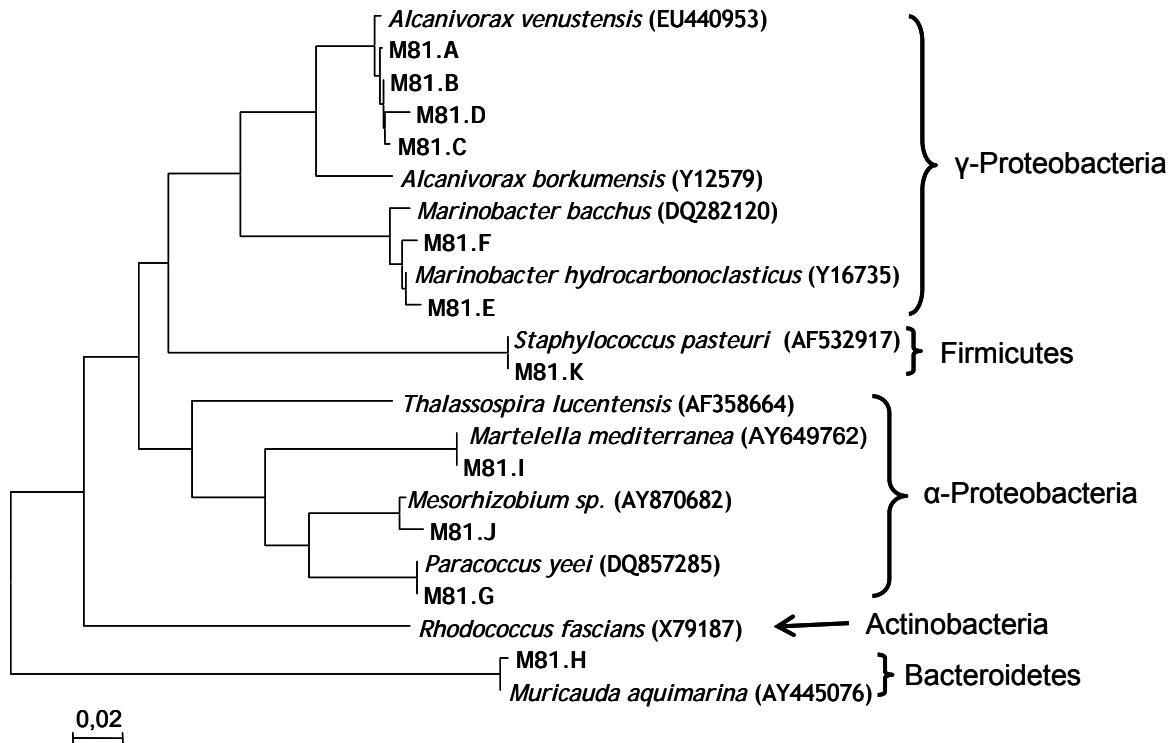


Figura 6.5. Arbre filogenètic que mostra les relacions de les diferents soques aïllades i diverses soques de referència, entre parèntesis hi ha el codi d'accés. L'arbre s'ha generat emprant el mètode de *neighbour joining* amb anàlisi de *bootstrap* de 1.000 rèpliques.

La majoria de les soques obtingudes pertanyen als grups filogenètics γ (M81.A-F) i α (M81.G, I, J) de Proteobacteria. Pel que fa als γ -proteobacteris, han resultat pertànyer tots al grup de microorganismes considerats *hidrocarbonoclàstics*, en concret, quatre coincideixen o estan estretament emparentats amb *Alcanivorax venustensis*, i dos pertanyen al gènere *Marinobacter*. La relació d'aquests gèneres amb la degradació del petroli ja ha estat discutida (vegeu 6.1.1).

Quant als α -proteobacteris, una de les soques pertany al gènere *Mesorhizobium* (Phyllobacteriaceae), una altra és un integrant del gènere *Paracoccus* (Rhodobacteraceae) i la darrera coincideix amb *Martelella mediterranea* (Aurantimonadaceae). Finalment, s'han trobat una soca molt propera a *Muricauda aquimarina* (Flavobacteriaceae), microorganisme la relació del qual amb la degradació d'hidrocarburs no està clara, i una altra a *Staphylococcus pasteuri* (Staphylococaceae).

S'han trobat representants de molts d'aquests gèneres en estudis de comunitats microbianes associades al petroli (Yakimov et al., 2004 i 2005; Alonso-Gutiérrez et al., 2008 i 2009; Wang et al., 2008, entre d'altres). A més, en alguns casos (que es troben resumits a la taula 6.1) també s'han pogut aïllar utilitzant hidrocarburs com a única font de carboni i energia.

Taula 6.1. Compilació de dades sobre la capacitat degradadora de cadascun dels gèneres trobats.

Soca	Organisme més proper al GenBank (nº d'accés)	% similitud ^a	Possibles substrats ^b	Referència ^c
M81.A	<i>Alcanivorax</i> sp. 2PR511-6 (EU440954)	98		
M81.B	<i>Alcanivorax venustensis</i> 2PR54-12 (EU440953)	100	C14, C16, Pr, N, P, D, Fl, Py,	Fernández-Martínez et al., 2003; Hara et al., 2003; Wang et al., 2008
M81.C	<i>Alcanivorax venustensis</i> 2PR54-12 (EU440953)	98	petroli	
M81.D	<i>Alcanivorax venustensis</i> 2PR54-12 (EU440953)	98		
M81.E	<i>Marinobacter</i> sp. JSM 077053 (FJ237415)	96	C16-C30, N, Py,	Gauthier et al., 1992; Doumenq et al., 2001; Bonin et al., 2004; Yakimov et al., 2004; Wang et al., 2008
M81.F	<i>Marinobacter</i> sp. JSM 077053 (FJ237415)	98	petroli	
M81.G	<i>Paracoccus yeei</i> (DQ857185)	98	C6, C8, C14, C16, C18, C20, C28, Pr, P, Fl, Py, fuel	Chaerun et al., 2004; Zhang et al., 2004; Guo et al., 2005
M81.H	<i>Muricauda aquimarina</i> PR54-6 (EU440979)	98	-	
M81.I	<i>Martellella mediterranea</i> 2PR511-4 (EU440957)	100	P, Py, BaPy	Sutiknowati, 2007; Wang et al., 2008; Alonso-Gutiérrez et al., 2009
M81.J	<i>Mesorhizobium</i> sp. (AY870682)	97	P, Fl	Sutiknowati, 2007; Wang et al., 2008
M81.K	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ZA-b3 (AF532917)	99	C16, N, P, D, Fl	Monna et al., 1993; Goindini et al., 2002; Zhuang et al., 2003; Alonso-Gutiérrez et al., 2008 i 2009; Mallick i Dutta, 2008

^a A l'organisme més proper a la base de dades GenBank.

^b Els diversos substrats llistats corresponen a fonts de carboni que s'han utilitzat durant aïllaments de soques o en què s'ha observat creixement de soques aïllades. En alguns casos no s'ha demostrat que el creixement vagi associat a la degradació. Són: C6-C30, n-alcans; Pr, pristà; Ph, fità; N, naftalè; P, fenantrè; Fl, fluorè; D, dibenzotiofè; Py, pirè; BaPy, benzo[a]pirè.

^c En el cas de les soques d'*Alcanivorax* únicament s'han referenciat treballs en què s'ha estudiat *A. venustensis*. Per a la resta de les soques s'han citat treballs en què hi apareix algun integrant del gènere.

Malgrat que totes les soques, a excepció de *Muricauda* són, en teoria, potencials degradadores d'hidrocarburs, s'ha dut a terme un cribratge en diversos medis (sòlids i líquids) per identificar possibles substrats de creixement. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 6.2.

Totes les soques han crescut en aigua de mar artificial suplementada amb LB 1/10, tant en placa com en medi líquid. Amb relació al creixement en medi sòlid amb hidrocarbur, totes les soques en què s'ha determinat (A-H, K) han crescut tant en medi amb *n*-hexadecà, com en medi amb una mescla d'HAP, fins i tot *Muricauda*. Ara bé, mentre que *Alcanivorax* i *Marinobacter* han crescut preferentment utilitzant *n*-hexadecà com a font de carboni i energia, *Staphylococcus* ho ha fet en les plaques amb una mescla d'HAP.

Quant al medi líquid, s'ha provat el creixement en diversos hidrocarburs (alifàtics i aromàtics) que s'acostumen a utilitzar en els assajos de degradació: *n*-tetradecà (C14), *n*-hexadecà (C16), *n*-heptadecà (C17), *n*-octadecà (C18) i pristà (Pr) com a models dels alcans lineals i ramificats (Harayama et al., 1999; Yakimov et al., 2007) i fenantrè (P), dibenzotiofè (D),

fluorantè (Fl) i pirè (Py) com a models d'HAP. El medi amb HAP s'ha suplementat amb extracte de llevat, de manera només es pot concloure que tenen la capacitat de transformar els HAP, però no es pot demostrar que hagin estat utilitzats com a substrat de creixement.

Taula 6.2. Característiques fenotípiques de les diverses soques aïllades amb relació a la possible degradació d'hidrocarburs.

Soca	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Medi aïllament ^a	C16 3%	C16 3%	C16 3%	TSB 3%	AMA LB 1/10	AMA LB 1/10	TSB 3%	AMA LB 1/10	TSB 3%	TSB 3%	TSB 3%
Creixement en AMA agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ LB 1/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+ C16	++	++	++	++	++	++	+	+	nd	nd	+
+ HAP + EL	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	++
Creixement en AMA líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ LB 1/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+ C14	+	+	+	+	nd		+	+	nd	nd	nd
+ C16	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd
+ C17	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd
+ Pr	+	+	+	+	nd	-	-	-	nd	nd	nd
+ C18	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd
+ P + EL	nd	nd	+	+	nd	nd	+	+	nd	nd	+
+ Fl + EL	nd	nd	+	+	nd	nd	+	+	nd	nd	+
+ D + EL	nd	nd	+	+	nd	nd	+	+	nd	nd	+
+ Py + EL	nd	nd	+	+	nd	nd	+	+	nd	nd	+

nd: no determinat.

^a Tots els medis d'aïllament són sòlids i corresponen a: C16 3%, medi mineral amb 3% de NaCl i *n*-hexadecà; TSB 3%, TSB amb 3% NaCl, i AMA LB 1/10, aigua de mar artificial amb LB diluït.

^b HAP: mescla de 5 hidrocarburs utilitzada per fer comptatges (vegeu 3.3.1).

^c EL: extracte de llevat.

De les soques incubades en hidrocarburs alifàtics (A-D, F-H), únicament les d'*Alcanivorax* han crescut en tots els alcans emprats. Les altres soques no han crescut en pristà. La degradació del pristà per soques d'*Alcanivorax*, tant *venustensis* com *borkumensis*, ja ha estat documentada (Fernández-Martínez et al., 2003; dos Santos et al., 2008) anteriorment.

Pel que fa als altres alcans, *Alcanivorax* ha crescut més ràpidament en *n*-octadecà i *n*-heptadecà, mentre que *Paracoccus* i *Muricauda* ho han fet en *n*-octadecà, la qual cosa pot indicar que la font emprada més habitualment com a substrat per als aïllaments de microorganismes degradadors d'alcans (*n*-hexadecà) pot no ser la més apropiada per tal finalitat.

De les cinc soques que s'han fet créixer en HAP i extracte de llevat (C, D, G, H i K) totes han crescut en tots els substrats. Aquest creixement podria ser degut no només a l'ús de l'HAP emprat sinó també a la presència d'extracte de llevat al medi, per tal de confirmar-ho caldria fer nous experiments.

3.1.4. Síntesi

Com s'ha vist, les diverses metodologies emprades han permès identificar microorganismes diferents. La taula 6.3 mostra quins han estat identificats per cadascuna de les metodologies utilitzades.

Taula 6.3. Resum dels microorganismes identificats en funció de la metodologia utilitzada.

Organisme	Grup filogenètic	Clons	Detecció	
			DGGE	Aïllament
<i>Methylophaga</i> sp.	Piscirickettsiaceae (γ)	+		
<i>Methylophaga sulfidivorans</i>	Piscirickettsiaceae (γ)	+		
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Alcanivoracaceae (γ)	+	+	
<i>Alcanivorax venustensis</i>	Alcanivoracaceae (γ)			+
<i>Alcanivorax</i> sp.	Alcanivoracaceae (γ)			+
<i>Marinobacter bacchus</i>	Alteromonadaceae (γ)	+		
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Alteromonadaceae (γ)	+		
<i>Marinobacter</i> sp.	Alteromonadaceae (γ)		+	+
<i>Sphingopyxis</i> sp.	Alteromonadaceae (γ)		+	
Chromatiales no cultivat	Chromatiales (γ)		+	
<i>Alcaligenes</i> sp.	Alcaligenaceae (β)		+	
<i>Thalassospira</i> sp.	Rodospirillaceae (α)		+	
<i>Lutibacterium</i> sp.	Sphingomonadaceae (α)			
<i>Parvibaculum</i> sp.	Phyllobacteriaceae (α)	+		
<i>Mesorhizobium</i> sp.	Phyllobacteriaceae (α)			+
<i>Rhodovulum</i> sp.	Rhodobacteraceae (α)			+
<i>Salipiger</i> sp.	Rhodobacteraceae (α)	+		
<i>Citricella</i> sp.	Rhodobacteraceae (α)	+		
<i>Paracoccus yeei</i>	Rhodobacteraceae (α)			+
<i>Marteella mediterranea</i>	Aurantimonadaceae (α)			+
<i>Muricauda aquimarina</i>	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)			+
<i>Muricauda</i> sp.	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)	+	+	
<i>Flavobacterium</i> sp.	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)	+	+	
<i>Gaetbulibacter marinus</i>	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)		+	
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Staphylococcaceae (Firmicutes)			+

6.2. Enriquiment

S'ha dut a terme un procés d'enriquiment per obtenir un consorci degradador, seguint la metodologia descrita a l'apartat 3.3, al llarg del qual s'ha fet un seguiment tant de la capacitat degradadora dels microorganismes (mitjançant una caracterització química), com de la composició de la comunitat microbiana.

6.2.1. Caracterització química

Per tal d'establir la freqüència òptima de les ressembres, s'ha comparat la degradació obtinguda en efectuar ressembres als 20 dies d'incubació a l'inici de l'enriquiment amb l'obtinguda en ressembres als 30 dies. Els resultats es troben representats a les figures 6.6 i 6.7.

Pel que fa als *n*-alcans (figura 6.6), la degradació respecte els controls és propera al 100% en gairebé tots els casos i no s'han detectat diferències significatives, excepte en el tetradecà, en què la degradació respecte el control disminueix en ressemmbrar cada 30 dies, a causa, probablement de l'evaporació en les mostres control.

Amb relació als HAP (figura 6.7), la degradació respecte els controls ha estat superior al 80% en tots els hidrocarburs de tres anells i en els de quatre sense substituents alquílics, tant en la ressembrada efectuada als 20 dies com amb l'efectuada als 30. A més, no s'hi han trobat diferències significatives.

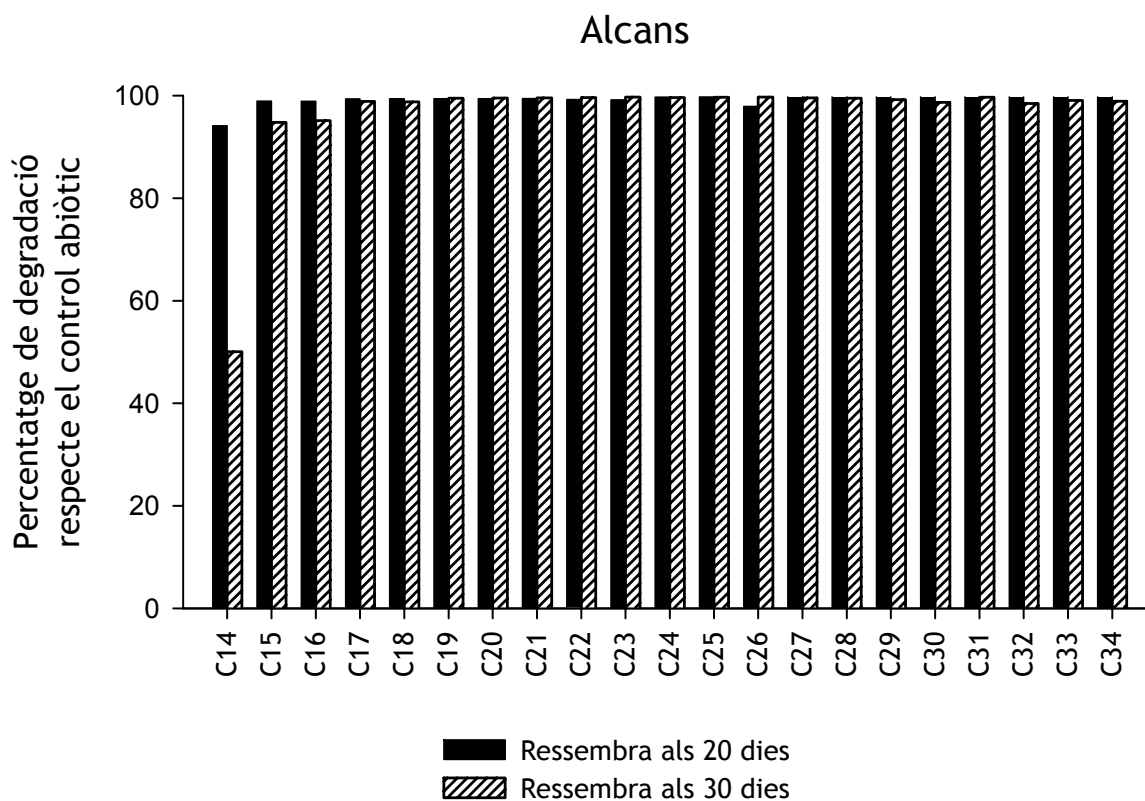


Figura 6.6. Percentatge de degradació dels *n*-alcans en mostres ressemmbrades als 20 i als 30 dies d'incubació.

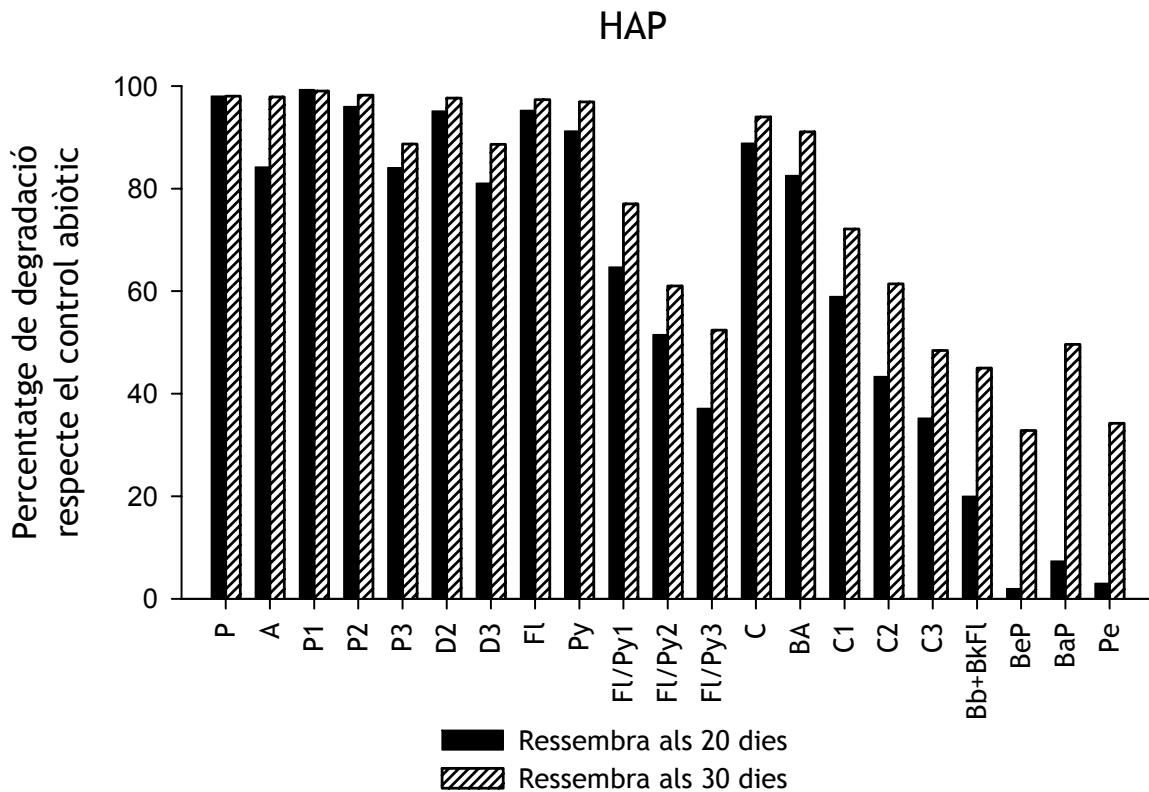


Figura 6.7. Percentatges de degradació dels HAP en mostres ressemerades als 20 i als 30 dies.

En la resta de compostos analitzats, la degradació ha disminuït en augmentar el grau d'alquilació i amb l'aromaticitat, i pel que fa als hidrocarburs de cinc anells i els de quatre més alquilats, ha estat significativament superior en els microcosmos ressemerats als 30 dies. Això no obstant, s'ha decidit ressemerar cada 20 dies per tal d'accelerar el procés d'enriquiment i obtenció del consorci.

Per tal de comprovar si en fer subcultius als 20 dies incrementa la capacitat degradadora del consorci, s'ha comparat la degradació obtinguda en ressemeres successives efectuades als 8 mesos d'enriquiment. Els resultats es troben representats a les Figures 6.8 i 6.9. Pel que fa als *n*-alcans (figura 6.8), no hi ha hagut diferències significatives per a cap compost i els percentatges de degradació respecte de les mostres control continuen essent propers al 100% en tots els casos.

Convé destacar que la degradació assolida pel consorci M81 ha estat en tots els casos (totes les ressemeres als 20 i 30 dies) superior a l'obtinguda pels consorcis al·lòctons TD i, sobretot, AM als 40 dies d'experiment (vegeu el capítol 4) quan es cultivaven utilitzant nutrients hidrofílics (NH_4NO_3 i K_2HPO_4) i amb la mateixa mostra de *chapapote* com a font de carboni i energia.

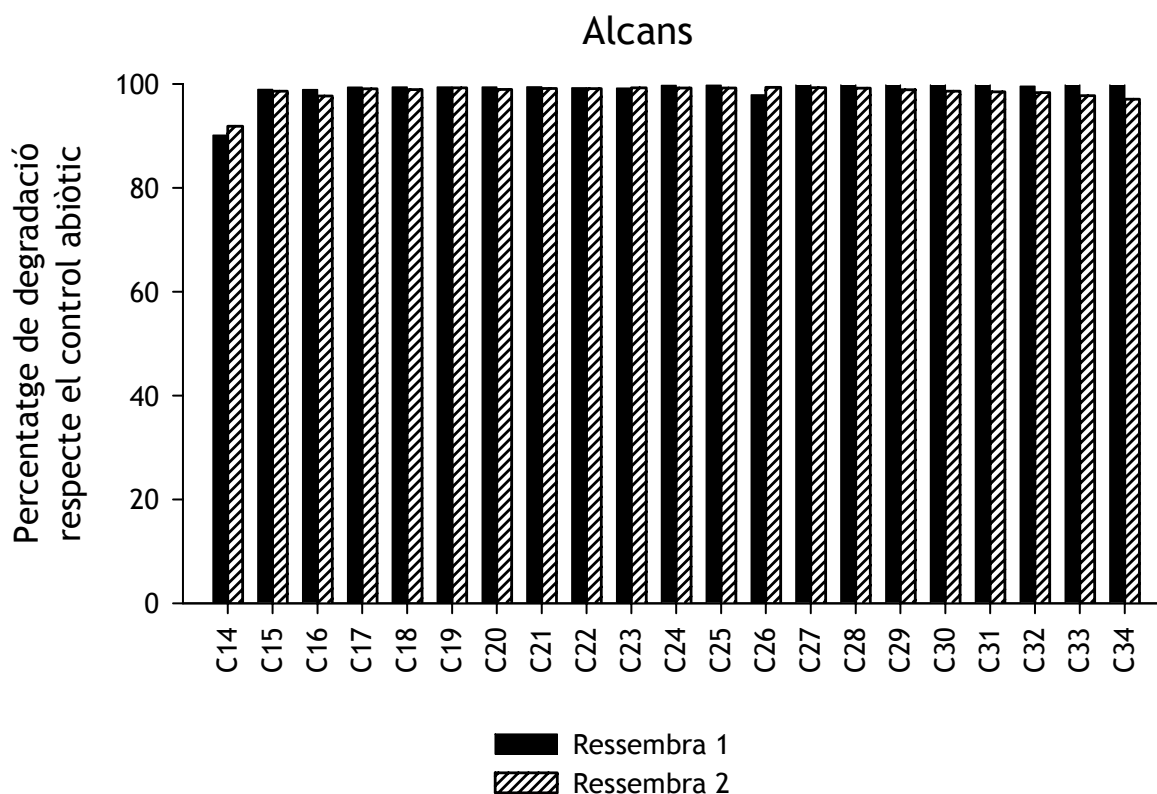


Figura 6.8. Percentatge de degradació dels *n*-alcans en mostres preses de dues ressempres consecutives.

Quant als HAP (figura 6.9), el comportament és molt similar en ambdues ressempres analitzades, si bé la degradació dels més pesants augmenta lleugerament en la segona ressempra. Com en el cas dels *n*-alcans, la degradació assolida pel consorci M81 en la fracció aromàtica en totes les ressempres i al cap de 20 i 30 dies és superior a l'obtinguda pels consorcis al·lòctons TD i AM quan es van cultivar emprant nutrients hidrofílics. A més, la degradació dels fenantrens i dibenzotiofens i els hidrocarburs de quatre anells (crisens i pirens) metilats supera l'obtinguda pels mateixos consorcis al·lòctons cultivats emprant el fertilitzant oleofílic i tensioactiu S200.

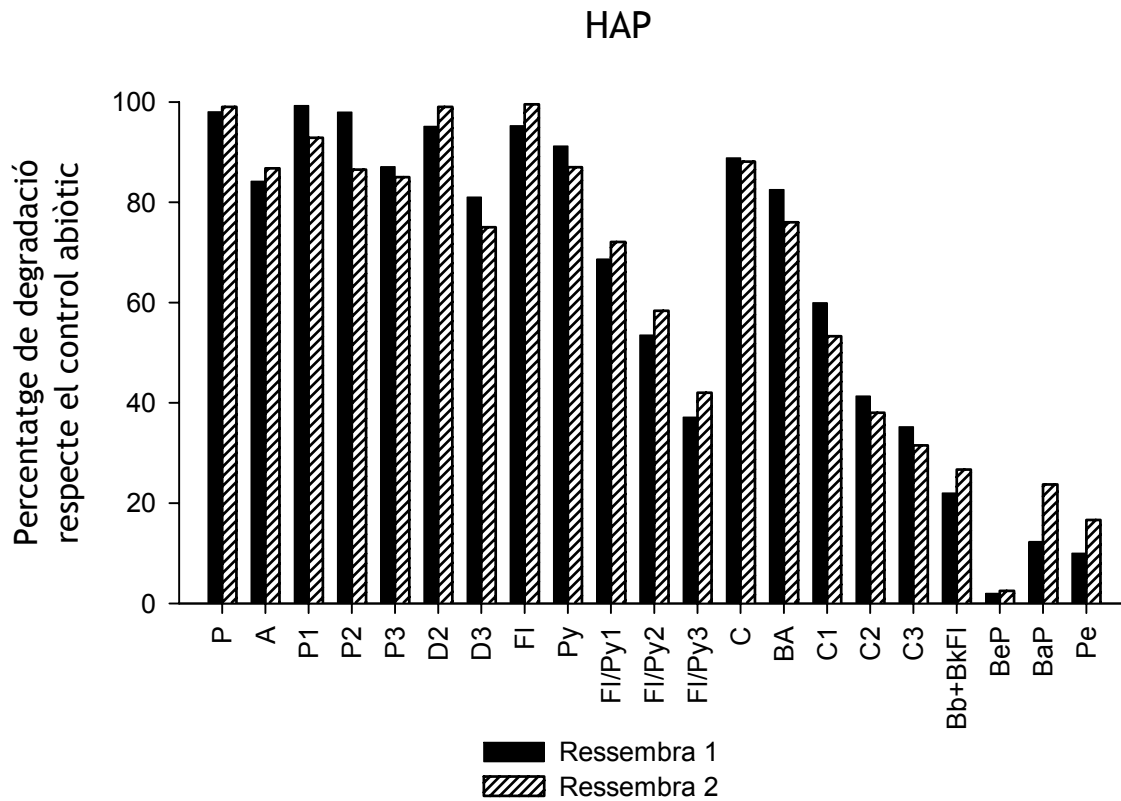


Figura 6.9. Percentatge de degradació dels HAP en mostres preses de dues ressembres consecutives.

6.2.2. Caracterització microbiològica

Si amb la caracterització química s'ha avaluat la capacitat degradadora de la comunitat microbiana present, la caracterització microbiològica del procés d'enriquiment (per DGGE) ha permès estudiar l'evolució de la comunitat microbiana, al llarg de 17 mesos. Per avaluar la reproductibilitat de la tècnica, s'han dut a terme tres amplificacions independents d'ADN total de la mostra utilitzada com a marcador per a la DGGE. El coeficient de correlació de Pearson ha estat $0,92 \pm 0,02$. S'ha avaluat també la similitud entre rèpliques d'una mateixa ressembrada (és a dir, de microcosmos diferents inoculats el mateix dia) comparant dues mostres dels 17 mesos, en aquest cas el coeficient ha estat 0,83.

En els perfils dels gens 16S rRNA s'han detectat 24 bandes diferents (de 12 a 18 per mostra), de les quals 20 (95-100% d'intensitat del carril) s'han escindit i identificat (figura 6.10). S'han trobat membres de Flavobacteriaceae i Rikenellaceae (Bacteroidetes), de Phyllobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Rhodospirillaceae i Sphingomonadaceae (α -Proteobacteria), d'Alcaligenaceae (β -Proteobacteria), i d'Alcanivoracaceae, Alteromonadaceae i Chromatiales (γ -Proteobacteria) (taula 6.4).

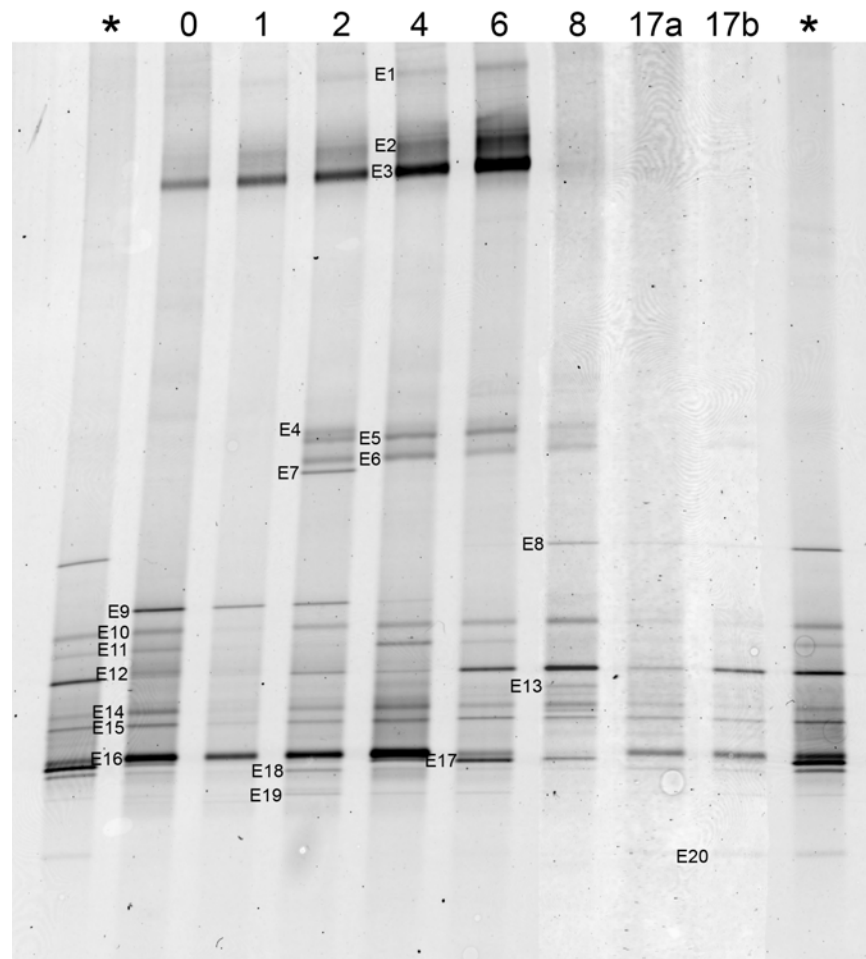


Figura 6.10. Perfil de DGGE (40-70% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rDNA de les mostres preses al llarg del procés d'enriquiment del consorci M81 (dels 0 als 17 mesos). Les mostres usades com a marcador (que corresponen a mostres del consorci M81, vegeu 6.3) s'han marcat amb asteriscos.

La intensitat relativa de cadascun dels grups filogenètics ha anat evolucionant al llarg del temps (figura 6.11), si bé els β -proteobacteris sempre han estat minoritaris. Tot i que sembla que existeixi un predomini dels α -proteobacteris, cal tenir en compte que, segons la llibreria de clons (vegeu 6.1.1), al moment inicial gairebé el 90% de les seqüències analitzades corresponen a γ -proteobacteris, és per això que aquestes dades únicament s'han de considerar com a merament comparatives i han de permetre detectar canvis en la comunitat microbiana de manera aproximada.

Taula 6.4. Característiques de les bandes de DGGE.

Banda	Long. (pb)	Mostra on s'ha detectat ^a	Organisme més proper al GenBank (n° d'accés)	% similitud ^b	Grup filogenètic ^c
E1	532	0-6 mesos	<i>Gaetbulibacter marinus</i> (EF108219)	97	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
E2	531	1-6 mesos	<i>Gaetbulibacter marinus</i> (EF108219)	97	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
E3	540	0-6 mesos	<i>Gaetbulibacter marinus</i> (EF108219)	97	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
E4		2, 4 mesos	<i>Flavobacterium</i> no cultivat (DQ660959)	95	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)

Taula 6.4. Continuació.

Banda	Long. (pb)	Mostra on s'ha detectat ^a	Organisme més proper al GenBank (n° d'accés)	% similitud ^b	Grup filogenètic ^c
E5	467	2-8 mesos	<i>Flavobacterium</i> no cultivat (DQ660959)	95	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
E6	522	2-8 mesos	<i>Roseovarius crassostreae</i> (EU592372)	97	Rhodobacteraceae (α)
E7		2 mesos	Bacteri Sphingobacteriales Kimo37 (AB260041)	97	Rhodobacteraceae (α)
E8	541	6-17 mesos	Bacteri Sphingobacteriales Kimo37 (AB260041)	97	Rikenellaceae (Bacteroidetes)
E9	556	0-4 mesos	Gamma-proteobacteri no cultivat (DQ870508)	99	Chromatiales (γ)
E10	506	Totes	<i>Alcanivorax borkumensis</i> (FJ799052)	95	Alcanivoracaceae (γ)
E11	498	Totes	<i>Maritimibacter</i> sp. DG1599 (EU052764)	97	Rhodobacteraceae (α)
E12	565	Totes	<i>Marinobacter</i> sp. JSM 077053 (FJ237415)	98	Alteromonadaceae (γ)
E13	503	4-17 mesos	<i>Thalassospira</i> sp. (FJ210811)	97	Rhodospirillaceae(α)
E14	522	Totes	<i>Thalassospira</i> sp. QDHT-16 (FJ210811)	100	Rhodospirillaceae (α)
E15	530	Totes	<i>Sphingopyxis</i> sp. (EU239907)	98	Sphingomonadaceae (α)
E16	527	Totes	<i>Thalassospira</i> sp. QDHT-16 (FJ210811)	100	Rhodospirillaceae (α)
E17	551	0, 4-8 mesos	<i>Alcaligenes</i> sp. (AJ133493)	99	Alcaligenaceae (β)
E18	517	Totes	<i>Muricauda</i> sp. 2PR55-3 (EU440997)	99	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)
E19	506	Totes	<i>Rhodovulum</i> sp. CC-MHSW-4 (EU564842)	96	Rhodobacteraceae (α)
E20	498	8-17 mesos	<i>Parvibaculum</i> sp. W7-12 (DQ659442)	99	Phyllobacteriaceae (α)

^a Mostres en què la banda suposa més d'un 1% de la intensitat relativa.

^b A l'organisme més proper a la base de dades GenBank.

^c De l'organisme més proper trobat al Ribosomal Database Project II (Cole et al., 2005). α i γ representen α i γ-proteobacteria, respectivament.

Pel que fa a les bandes particulars, destaca, en primer lloc, la presència inicial i fins al sisè mes del clúster E1-E3 (17-53% d'intensitat del carril), les quals corresponen a un flavobacteri estretament emparentat amb *Gaetbulibacter marinus*, espècie heteròtrofa aïllada en aigües marines de la costa de Corea que no sembla estar relacionada amb la degradació de petroli (Yang i Cho, 2008). El fet que la seva intensitat relativa incrementi al llarg dels primers sis mesos i que després no es detecti fa pensar que aquest grup de microorganismes deu tenir un paper important, que no s'ha pogut especificar, en els inicis de la formació del consorci. Posteriorment és desplaçat per altres microorganismes que efectivament estan relacionats amb la degradació d'hidrocarburs.

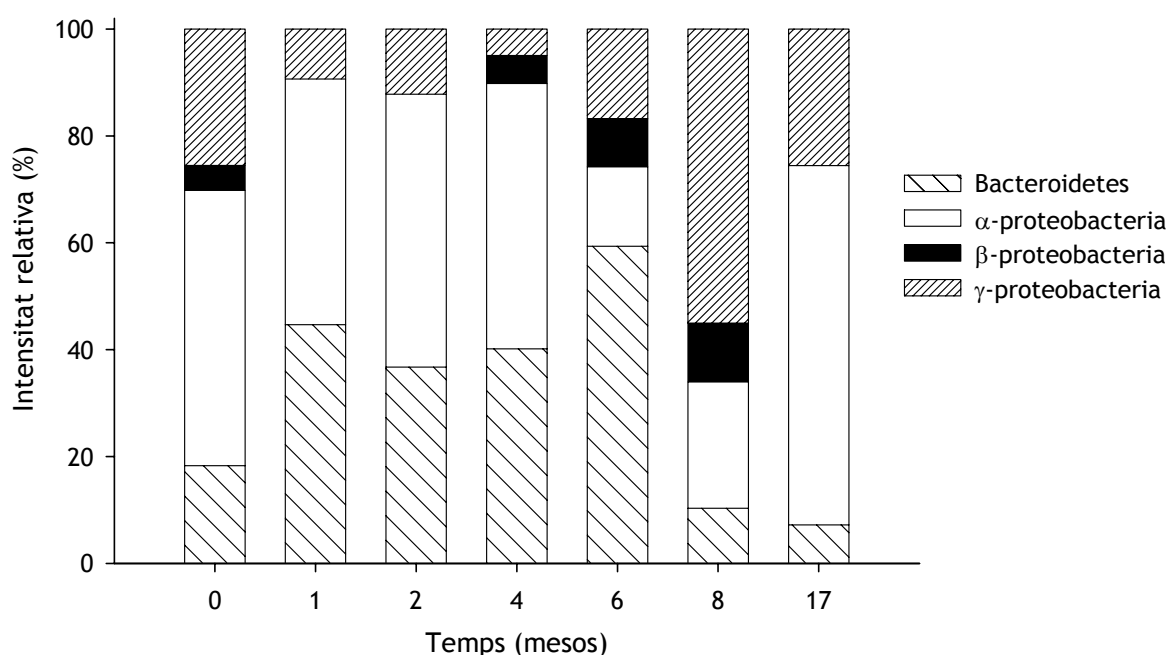


Figura 6.11. Evolució de la comunitat microbiana al llarg de l'experiment, en funció de la intensitat relativa de cada grup filogenètic.

De la mateixa manera, el grup de bandes E4-E7 (37-43% d'intensitat del carril), corresponents a un flavobacteri i un rhodobacteri no cultivats, respectivament, únicament es detecta en els primers mesos d'enriquitment (especialment del 2 al 8). En aquest cas es tracta de microorganismes afiliats a grups filogenètics que contenen degradadors d'hidrocarburs. Així doncs, podria ser que o bé no tinguin relació amb la degradació del fuel, o bé en tinguin, però hagin estat desplaçats competitivament per altres microorganismes més eficients.

Altres bandes, corresponents a gèneres o famílies dels quals s'han descrit degradadors d'hidrocarburs (*Thalassospira*, E13-E14, E16; Rhodobacteraceae, E11) o a microorganismes hidrocarbonoclàstics (*Marinobacter*, E12; *Alcanivorax*, E10) estan presents al llarg de tot el procés.

Per últim, la banda E20 (2-5% d'intensitat del carril), que correspon al gènere *Parvibaculum* (alguns integrants del qual s'associen a la degradació d'hidrocarburs, vegeu 6.1.1), s'ha detectat únicament al final de l'enriquitment, malgrat que a la mostra inicial havia estat detectada per llibreria de clons. La seva abundància relativa a la comunitat, doncs, ha augmentat.

En relació amb la diversitat microbiana (figura 6.12), en gairebé totes les mostres l'índex de Shannon-Wiener és similar a 2 i no s'observen diferències significatives entre la mostra original i les mostres preses el dissetè mes d'enriquitment. Únicament s'han observat canvis (una forta disminució) en el primer mes, moment en què dues úniques bandes (E3, Flavobacteriaceae no identificat, i E16, *Thalassospira*) suposen més d'un 86% de la intensitat del carril.

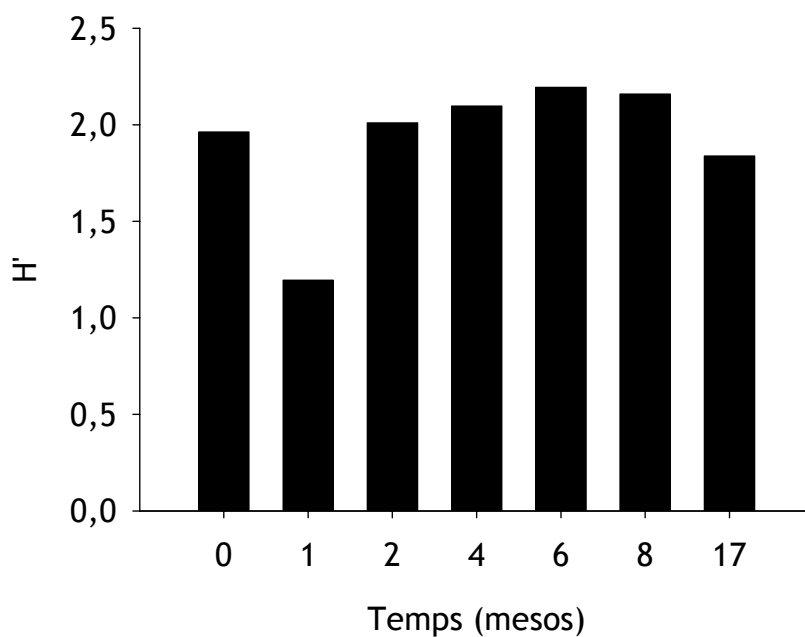


Figura 6.12. Índex de Shannon-Wiener (H') de la diversitat bacteriana estimada, basat en els perfils de DGGE de les mostres preses al llarg del procés d'enriquiment del consorci M81 (dels 0 als 17 mesos).

6.3. El consorci M81

Un cop obtingut el consorci degradador s'ha caracteritzat per llibreria de clons i DGGE. Els resultats obtinguts emprant ambdues metodologies es mostren a continuació.

6.3.1. Anàlisi per llibreria de clons

En aquest cas també s'han analitzat 50 clons, les relacions filogenètiques dels quals es mostren representades a la figura 6.13. La riquesa d'espècies estimada, a partir de l'observada (figura 6.14) ha estat de 9,7.

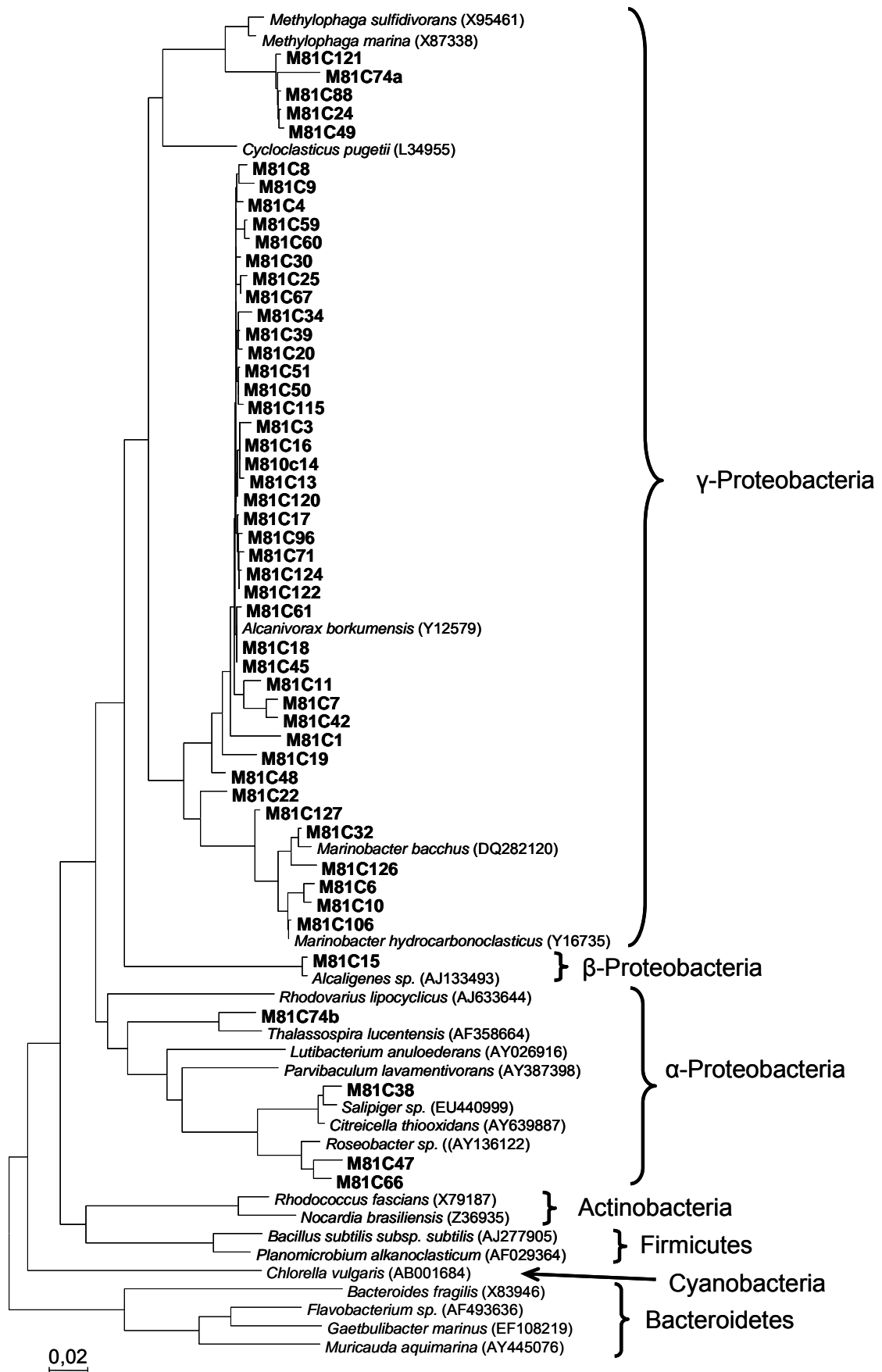


Figura 6.13. Arbre filogenètic que mostra les relacions dels diferents clons seqüenciats i diverses soques de referència, entre parèntesis hi ha el codi d'accés. L'arbre s'ha generat emprant el mètode de *neighbour joining* amb anàlisi de *bootstrap* de 1.000 rèpliques.

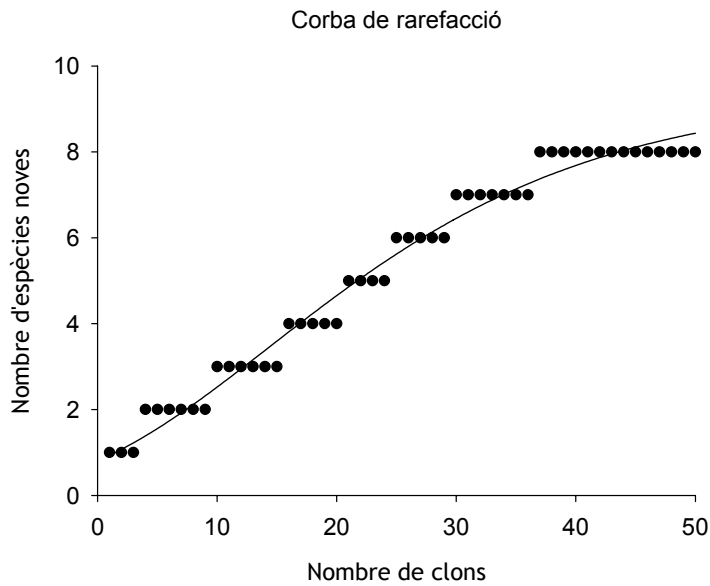


Figura 6.14. Corba de rarefacció per a la llibreria de clons (n=50).

Com en la mostra inicial, predominen a la comunitat els gèneres pertanyents a γ -Proteobacteria, seguits dels α . Hi ha, però, diferències considerables. Després de l'enriquiment (en el consorci M81) s'observa una dràstica disminució de la presència del gènere *Methylophaga* i un predomini clar d'*Alcanivorax* (figura 6.15), que, com ja s'ha comentat, comprèn bacteris que degraden molt eficientment els alcans. Aquests resultats són consistents amb els descrits en estudis anteriors (Harayama et al., 1999; Kasai et al., 2002; Maruyama et al., 2003; Røling et al., 2004; McKew et al., 2007b).

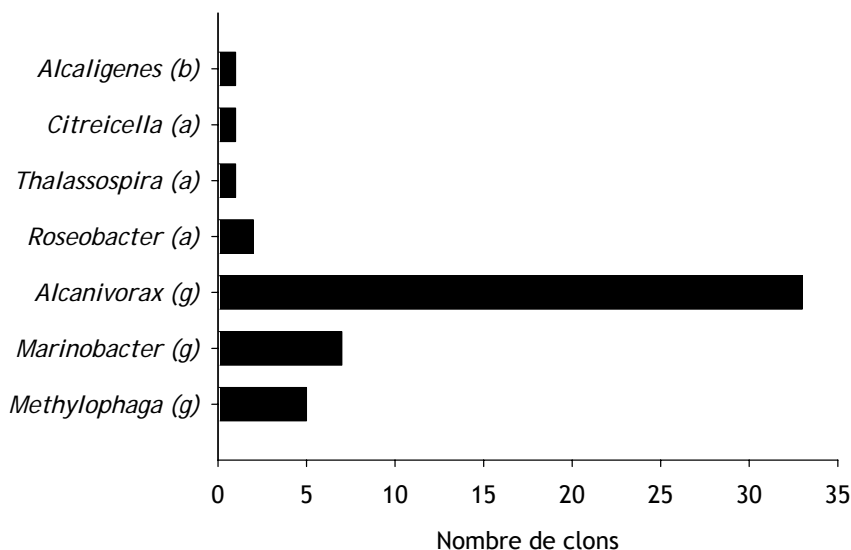


Figura 6.15. Proporció de cada tàxon (n=50).

McKew i col·laboradors (2007b) detectaren increments significatius en experiments de degradació de cru envellit duts a terme en microcosmos suplementats amb nutrients (N i P) i/o tensioactiu. A més, Kasai i col·laboradors (2002) en un estudi dut a terme amb fuel del *Nakhodka*, de composició similar al del *Prestige*, van trobar que *Alcanivorax* dominava en

cultius d'aigua de mar amb petroli en discontinu quan s'afegien nutrients al medi, mentre que no s'apreciava un increment significatiu en els microcosmos sense nutrients addicionals. Això explica l'augment durant el procés d'enriquiment i el consegüent perfil del consorci M81, en què les ressembres s'efectuen amb concentracions de nutrients constants, i la menor proporció en la mostra original ambiental tot i tractar-se d'una mostra de petroli.

D'altra banda, també s'ha observat predomini d'*Alcanivorax* (fins al 80-90% de la comunitat degradadora) in situ (Harayama et al., 1999; Kasai et al., 2001), sobretot en utilitzar fertilitzants que garanteixen la permanència dels nutrients, com ara els d'alliberament lent (Röling et al., 2004). Val a dir, però, que en un estudi de camp dut a terme pel nostre grup a Santander (vegeu 5.2) no es va detectar aquest gènere per DGGE. És probable, doncs, que la seva presència a l'ambient estigui determinada per altres factors (com ara la disponibilitat d'alcans fàcilment assimilables), a banda de la concentració de nutrients.

Una altra de les diferències de la comunitat que integra el consorci M81 respecte la de la mostra original, és que en el consorci s'han detectat gèneres relacionats amb la degradació d'hidrocarburs que no s'havien pogut detectar a la mostra original (com *Roseobacter*) o que únicament s'havien detectat per DGGE (*Thalassospira* i *Alcaligenes*). El fet que es tracti de gèneres relacionats amb la degradació d'hidrocarburs n'explicaria l'increment en el consorci.

Com ja s'ha comentat, tant *Thalassospira* com *Alcaligenes* poden ser degradadors d'HAP (vegeu 6.1). Pel que fa al gènere *Roseobacter*, s'ha apuntat que pot jugar un paper important en la degradació d'hidrocarburs (Hara et al., 2003; Brakstad i Lodeng, 2005; Coulon et al., 2007). En estudis anteriors s'han identificat integrants d'aquest gènere en enriquiments amb aigua marina utilitzant petroli (Chang et al., 2000) o *n*-hexadecà (Hara et al., 2003) com a font de carboni i també al camp en localitats contaminades per hidrocarburs (Pragabaran et al., 2007), entre d'altres el petroli del *Prestige* (Jiménez et al., 2007; Alonso-Gutiérrez et al., 2008).

Per últim, una altra de les diferències respecte la mostra inicial és que no s'ha detectat *Muricauda*, la qual cosa podria indicar que, efectivament, aquest microorganisme no té cap relació amb la degradació del petroli.

6.3.2. Anàlisi per DGGE

S'han detectat 23 bandes diferents, de les quals 18 ($91 \pm 1\%$ d'intensitat del carril) s'han pogut seqüenciar. Les relacions filogenètiques de les diferents bandes identificades es mostren a la figura 6.16.

Com en el cas de la mostra original, la composició de la comunitat microbiana emprant les dues tècniques és similar, malgrat que s'han detectat diferències. Tampoc no s'ha trobat *Methylophaga* en el perfil de DGGE ni s'ha detectat *Alcaligenes*, gènere que, curiosament, a la mostra inicial sí s'havia detectat per DGGE però no per llibreria de clons.

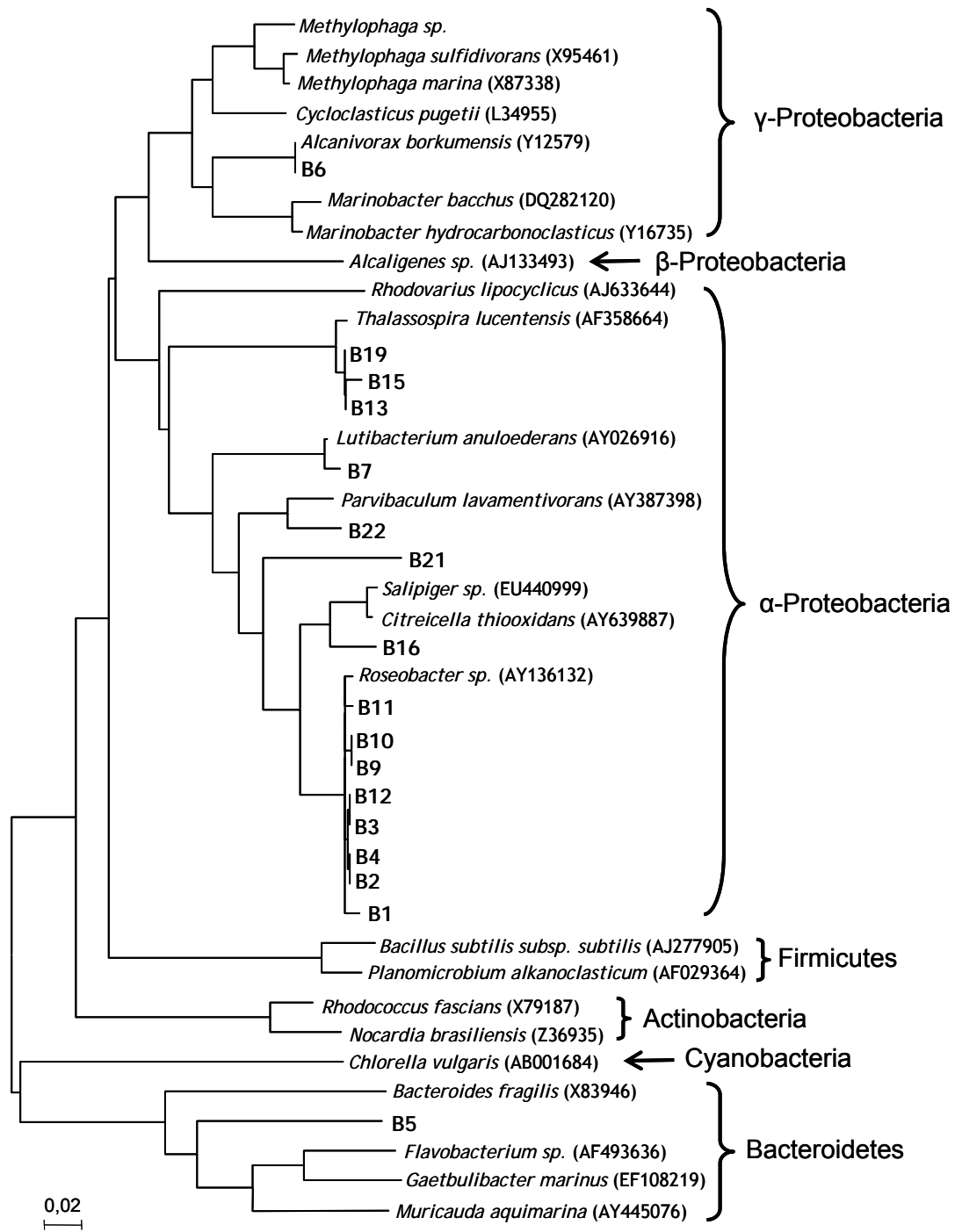


Figura 6.16. Arbre filogenètic que mostra les relacions de les diferents bandes seqüenciades i diverses soques de referència, entre parèntesis hi ha el codi d'accés. L'arbre s'ha generat emprant el mètode de *neighbour joining* amb anàlisi de *bootstrap* de 1.000 rèpliques.

Per contra s'han detectat gèneres que s'han relacionat amb la degradació d'hidrocarburs (*Parvibaculum*, *Lutibacterium*), que poden no ser prou abundants per ser detectats en la llibreria de clons amb el límit de detecció emprat.

També s'ha detectat un integrant de l'ordre Sphingobacteriales i dues bandes de la família Rhodobacteraceae, una de les quals és propera als gèneres *Citreicella* i *Salipiger*, gèneres relacionats amb la degradació d'hidrocarburs (vegeu 6.1.1).

6.3.3. Síntesi

Com en el cas de la mostra usada com a inòcul (vegeu 6.1), s'han trobat diferències en la identificació dels microorganismes en funció de la metodologia emprada. Els diversos microorganismes detectats per a cadascuna es troben llistats a la taula 6.5.

Taula 6.5. Resum dels microorganismes identificats en funció de la metodologia utilitzada.

Organisme	Grup filogenètic	Detecció	
		Clons	DGGE
<i>Methylophaga</i> sp.	Piscirickettsiaceae (γ)	+	
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Alcanivoracaceae (γ)	+	+
<i>Alcanivorax</i> sp.	Alcanivoracaceae (γ)	+	
<i>Marinobacter bacchus</i>	Alteromonadaceae (γ)	+	
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Alteromonadaceae (γ)	+	
<i>Marinobacter</i> sp.	Alteromonadaceae (γ)		+
<i>Alcaligenes</i> sp.	Alcaligenaceae (β)	+	
<i>Thalassospira</i> sp.	Rhodospirillaceae (α)	+	+
<i>Sphingopyxis</i> sp.	Sphingomonadaceae (α)		+
<i>Parvibaculum</i> sp.	Phyllobacteriaceae (α)		+
<i>Maritimibacter</i> sp.	Rhodobacteraceae (α)		+
<i>Rhodovulum</i> sp.	Rhodobacteraceae (α)		+
<i>Citricella thiooxidans</i>	Rhodobacteraceae (α)	+	
<i>Roseobacter</i> sp.	Rhodobacteraceae (α)	+	
<i>Muricauda</i> sp.	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)		+
Sphingobacteriales no cultivat	Rikenellaceae (Bacteroidetes)		+

6.4. Conclusions

La comunitat microbiana present a la mostra de *chapapote* del *Prestige* amb què van dur-se a terme els experiments in vitro (vegeu capítol 4) està formada majoritàriament per α i γ -proteobacteris, i hi predomina el gènere *Methylophaga* (γ). Així mateix, s'han detectat integrants de β -Proteobacteria i Bacteroidetes. A partir d'aquesta mostra s'han pogut aïllar onze soques, sis de bacteris *hidrocarbonoclàstics* (*Alcanivorax*, *Marinobacter*) i unes altres quatre de microorganismes que poden ser degradadors d'hidrocarburs (gèneres *Marteella*, *Paracoccus*, *Mesorhizobium* i *Staphylococcus*).

Durant el procés d'enriquiment, s'aprecia una successió en la composició de la comunitat que es reflecteix en canvis en els perfils de DGGE. Al consorci resultant, que posseeix capacitat tant per degradar alcans com HAP, tornen a predominar els α i γ -proteobacteris, però en aquest cas el gènere *Alcanivorax* desplaça a *Methylophaga*. Hi abunden, també, altres microorganismes considerats *hidrocarbonoclàstics* o degradadors d'hidrocarburs (*Marinobacter*, *Thalassospira* o *Alcaligenes*).

Un cop més queda palès que el mètode d'anàlisi és molt important de cara a estudiar l'estructura de la comunitat microbiana i que els resultats obtinguts amb diferents metodologies dependents i independents de cultiu són complementaris. Aquest fenomen s'ha observat a bastament (valgui l'exemple de Chang et al., 2000). Sense anar més lluny, i com ja s'ha comentat (vegeu 1.6.1), en un estudi d'un consorci degradador d'HAP dut a terme al mateix grup de recerca (Viñas et al., 2005a), de les 19 soques totals identificades, 7 ho varen ser només per aïllament, 4 només per llibreria de clons i 2 només per DGGE. La utilitat d'aplicar diverses aproximacions quan s'estudia una comunitat microbiana ha estat provada.

S'ha obtingut un consorci degradador d'hidrocarburs del qual sabem, fins ara, que és capaç de degradar tant hidrocarburs aromàtics policíclics com alcans. I se n'ha fet una caracterització inicial, emprant diverses metodologies que aporten informació complementària.

Com que únicament s'ha fet una caracterització estàtica en un moment donat del consorci un cop obtingut, convindria avaluar l'evolució del consorci al llarg d'una cinètica de degradació de petroli del *Prestige*. Aquest serà l'objectiu del capítol 7.

També fóra bo comprovar com afecta la degradació a altres fraccions, la qual cosa serà objecte d'estudi del capítol 8.

Capítol 7

Assaig de degradació in vitro de
fuel del *Prestige* per part d'un
consorci microbià autòcton

Atès que en el capítol anterior únicament s'ha donat una idea estàtica de l'estructura de la comunitat microbiana present en el consorci M81, s'ha dut a terme un experiment per estudiar els canvis de la microbiota total i potencialment degradadora d'hidrocarburs al llarg d'una cinètica de biodegradació de fuel del *Prestige*.

A més, s'ha dut a terme un altre experiment de marcatge d'àcids nucleics amb isòtops estables per tal de comprovar quins dels potencials degradadors d'alcans realment ho són.

7.1. Cinètica de degradació de fuel del *Prestige*

Per tal de seguir els canvis de les poblacions microbianes heteròtrofes i degradadores d'hidrocarburs alifàtics i aromàtics i relacionar-los amb els canvis en la composició del fuel, s'ha dut a terme una incubació del consorci M81 creixent amb el fuel del *Prestige* com a única font de carboni i energia i s'han pres mostres als 5, 10, 20, 40 i 60 dies.

7.1.1. Anàlisi de la comunitat per MPN

S'han dut a terme recomptes de microorganismes heteròtrofs, potencials degradadors d'hidrocarburs alifàtics i *n*-alcans i potencials degradadors d'HAP al llarg de tot l'experiment. Així mateix, s'ha comparat l'evolució de les diverses poblacions amb la degradació de les fraccions alifàtica i aromàtica del petroli.

Població heteròtrofa

La població heteròtrofa ha crescut ràpidament (gairebé 2,5 unitats de logaritme) durant els primers 5 dies d'incubació (figura 7.1). Després d'arribar a un màxim al dia 10 (8,6 unitats de logaritme), s'ha mantingut estable fins al dia 40 i després ha començat a decreixer.

Paralelament, les fraccions alifàtica i aromàtica del fuel del *Prestige* han experimentat, conjuntament, una forta davallada (entorn del 30%) respecte dels controls abiòtics en aquests 10 dies, després hi ha hagut una alentiment de la degradació, que ha arribat a ser de més del 40% als 60 dies d'incubació.

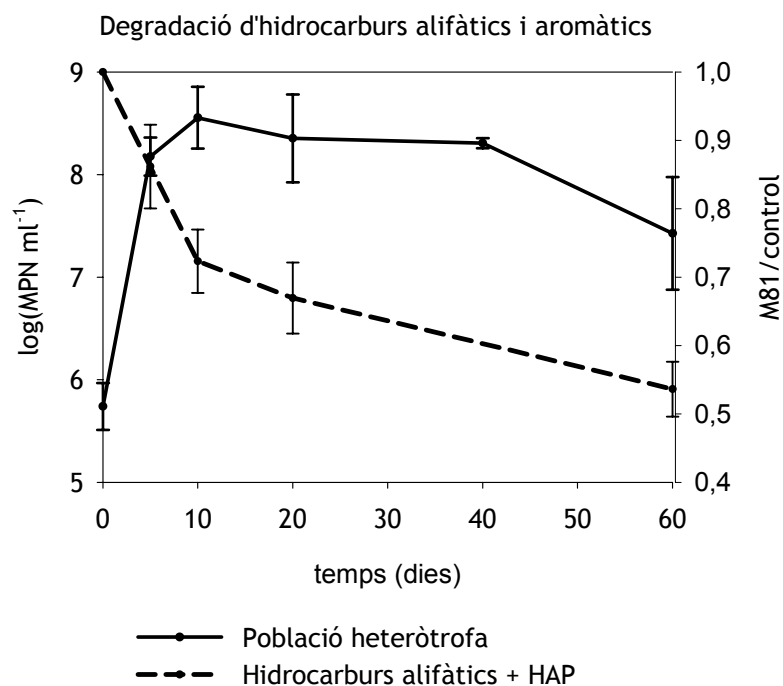


Figura 7.1. Evolució de la població heteròtrofa al llarg de la cinètica de degradació i de les fraccions lleugeres del fuel (hidrocarburs alifàtics i aromàtics) respecte de les mostres control. Cadascun dels punts és la mitjana de tres rèpliques independents.

Població degradadora d'hidrocarburs alifàtics

Pel que fa als potencials degradadors d'hidrocarburs alifàtics, s'han efectuat recomptes en dos medis de cultiu que difereixen en la font de carboni i energia. Habitualment, en els estudis especialitzats, s'empra *n*-hexadecà (C16) com a substrat universal per fer el recompte dels degradadors d'hidrocarburs alifàtics. Ara bé, resultats contradictoris obtinguts en el nostre grup de recerca ens han dut a assajar un altre medi en què la font de carboni és fracció alifàtica de cru de petroli (a partir d'ara F1) i que es tracta, doncs, d'una barreja d'hidrocarburs alifàtics. La figura 7.2 mostra els comptatges obtinguts al llarg de l'experiment.

Com en el cas de la població heteròtrofa, les poblacions degradadores tant d'hidrocarburs alifàtics com d'*n*-alcans han experimentat un fort creixement (unes 2,5 unitats de logaritme) en els 5 primers dies d'incubació i han arribat al màxim (8,4 unitats de logaritme) als 10 dies, la qual cosa equival a dir que el desè dia aproximadament el 60% de la població heteròtrofa és degradadora d'alcans lineals.

Mentre que els recomptes efectuats amb C16 comencen a decreixer a partir d'aquest dia, els efectuats amb F1 es mantenen fins al dia 20, moment en què també comencen a disminuir. Si al dia 40 no s'observen diferències significatives entre els comptatges duts a terme amb les dues metodologies, al final de l'experiment (dia 60) els recomptes de degradadors d'alcans són significativament inferiors (un ordre de magnitud). Cal tenir en compte que la fracció alifàtica, que en 20 dies ja s'ha degradat més d'un 40% (figura 7.2), al dia 60 ha disminuït significativament (gairebé el 50%) (figura 7.2) i que en aquest punt els alcans lineals han estat pràcticament eliminats (figura 7.3). Així doncs, els recomptes en medi amb C16 poden no

incloure microorganismes que creixen en F1, probablement degradadors d'alcans lineals més pesants que el C16 o d'isoprenoides.

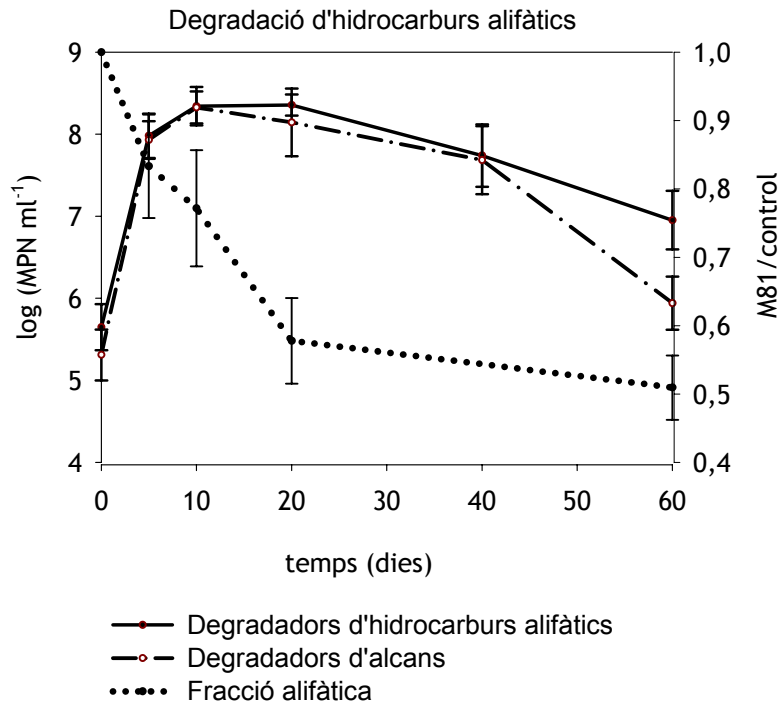


Figura 7.2. Evolució de les poblacions degradadores d'hidrocarburs alifàtics i d'*n*-alcans al llarg de la cinètica de degradació i de la fracció alifàtica respecte de les mostres control.

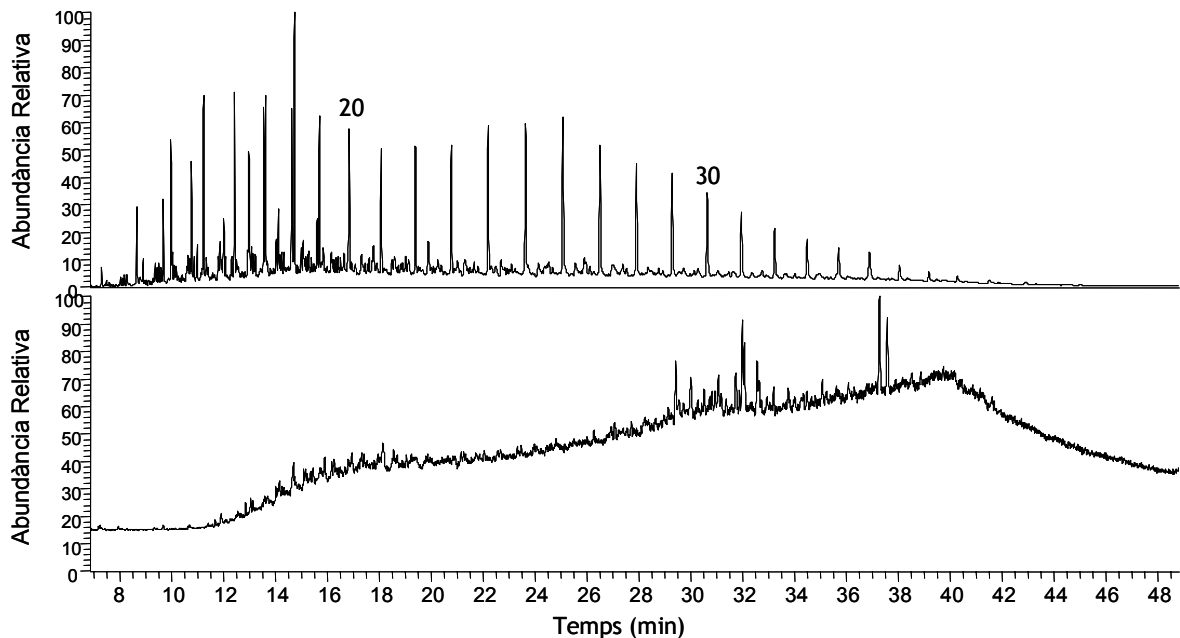


Figura 7.3. Fragmentograma característic dels *n*-alcans (m/z 85) obtingut per GC-MS d'una mostra a l'inici de l'experiment (dia 5, superior) i una presa al final (dia 60, inferior).

Aquest resultat ens ha dut a substituir el medi amb C16 utilitzat fins ara per fer el recompte dels microorganismes degradadors d'hidrocarburs per el que conté la fracció F1.

Població degradadora d'HAP

La població potencialment degradadora d'HAP ha tingut un creixement més lent que l'heteròtrofa o la degradadora d'hidrocarburs alifàtics (s'han necessitat 10 dies per augmentar unes 2,5 unitats de logaritme), a més a més, el màxim (6,8-6,9 unitats de logaritme) s'ha assolit al dia 20 (figura 7.4).

Els recomptes han estat molt més baixos que els dels degradadors d'hidrocarburs alifàtics al llarg de tota la cinètica (figura 7.4), la qual cosa podria sobtar tenint en compte que més del 50% del fuel del *Prestige* correspon a HAP (Albaigés i Bayona, 2003). No obstant això, la fracció aromàtica del fuel del *Prestige* conté una elevada proporció d'HAP alquilats i pesants, que són els més recalcitrants.

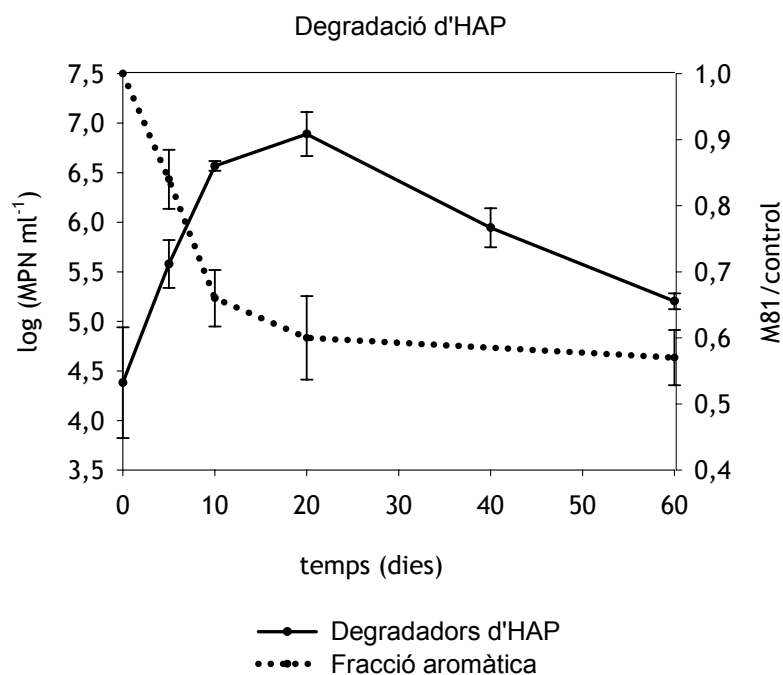


Figura 7.4. Evolució de les poblacions degradadores HAP al llarg de la cinètica de degradació i de la fracció aromàtica lleugera del fuel respecte de les mostres control.

De fet, les anàlisis de biodegradació dutes a terme en el present estudi es basen en la desaparició dels HAP parentals. Ara bé, els enzims responsables de l'oxidació dels HAP, les dioxigenases, presenten una especificitat molt relaxada, de manera que poden oxidar molts HAP sense que s'arribin a usar com a substrats de creixement. Així doncs, podria considerar-se que molts dels HAP que s'han degradat han estat simplement oxidats, sense que aquest fet hagi repercutit en l'augment de biomassa.

Donat que, en tractar-se d'una comunitat marina, tots els comptatges s'han dut a terme en medi mineral enriquit amb NaCl al 3%. Ara bé, atesos els resultats s'ha considerat que la salinitat podria afectar negativament els comptatges. Per tal de comprovar-ho, s'han dut a terme recomptes en plaques de microtitulació en medi mineral a l'1 i al 3% de NaCl, respectivament (figura 7.5), emprant com a inòcul la mateixa mostra.

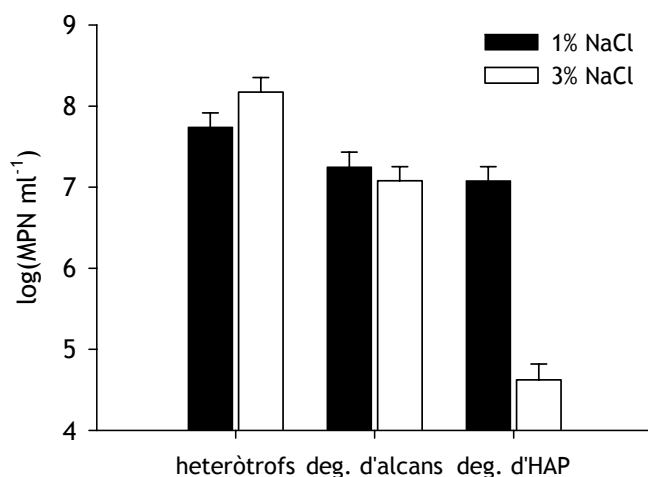


Figura 7.5. Efecte de la concentració de sals en els recomptes de MPN d'heteròtrofs, degradadors d'alcans i degradadors d'aromàtics. Les barres d'error representen l'interval de confiança al 95%.

Mentre que la salinitat no té efectes significatius en els comptatges d'heteròtrofs o de degradadors de C16, els recomptes de degradadors d'HAP augmenten significativament (més de 2 unitats de logaritme) quan es passa del 3 al 1% de NaCl. Aquest sorprenent resultat posa de manifest en primer lloc la diferència entre el comportament dels degradadors d'hidrocarburs alifàtics i d'aromàtics. A més, atès que els recomptes de la cinètica s'han efectuat al 3% de NaCl, la hipòtesi que al llarg de la cinètica les concentracions dels degradadors d'HAP s'acosten molt més a la de degradadors d'hidrocarburs alifàtics és molt factible.

Tam i col·laboradors (2002) trobaren que una elevada salinitat inhibia el creixement en fenantrè i la degradació d'aquest compost per part d'una soca aïllada, si bé no observaren aquest comportament quan es tractava d'un consorci.

En un altre estudi (Kästner et al., 1998) van observar repressió de l'activitat degradadora d'HAP per part de la microflora autòctona en augmentar la salinitat. Ara bé, la salinitat no afecta per igual la degradació de diversos HAP. Minai-Tehrani et al. (2009) observaren que si bé la degradació del conjunt d'HAP decreixia significativament tenint el 5% de NaCl al medi (sòl), el fenantrè, l'antracè i el pirè es degradaven majoritàriament a l'1% de NaCl, però el màxim de degradació per a crisè i fluorantè s'aconseguia amb 0% de NaCl al sòl.

Així doncs, tot i que les consideracions anteriors referents al fet que molts HAP poden ser oxidats i no utilitzats com a substrat de creixement continuarien essent vàlides, el baix nombre de degradadors d'HAP trobats es podria deure a la concentració de NaCl. Tanmateix, no sembla que la salinitat de l'aigua de mar artificial amb què s'ha dut a terme l'experiment de biodegradació tingui cap efecte inhibitori en la degradació del fuel: en 10 dies la fracció aromàtica ha disminuït gairebé un 40% respecte dels microcosmos control i al final de l'experiment arriba gairebé al 45%.

7.1.2. Anàlisi de la comunitat per DGGE

DNA total

S'ha dut a terme una caracterització de la comunitat microbiana per DGGE, emprant tres rèpliques independents per cada punt de mostreig. Els perfils dels diversos triplicats han estat molt similars en els primers deu dies d'experiment (amb un coeficient de correlació de Pearson, r , de $0,95 \pm 0,02$ a $0,978 \pm 0,009$). En els darrers punts de mostreig, en canvi, la variabilitat ha augmentat significativament (r de a $0,84 \pm 0,09$, dia 60).

S'han trobat 29 bandes de DGGE diferents (d'11 a 23 per carril) (figura 7.6), de les quals 22, un 89–100% de la intensitat de carril, s'han seqüenciat. Les seves característiques es troben llistades a la taula 7.1.

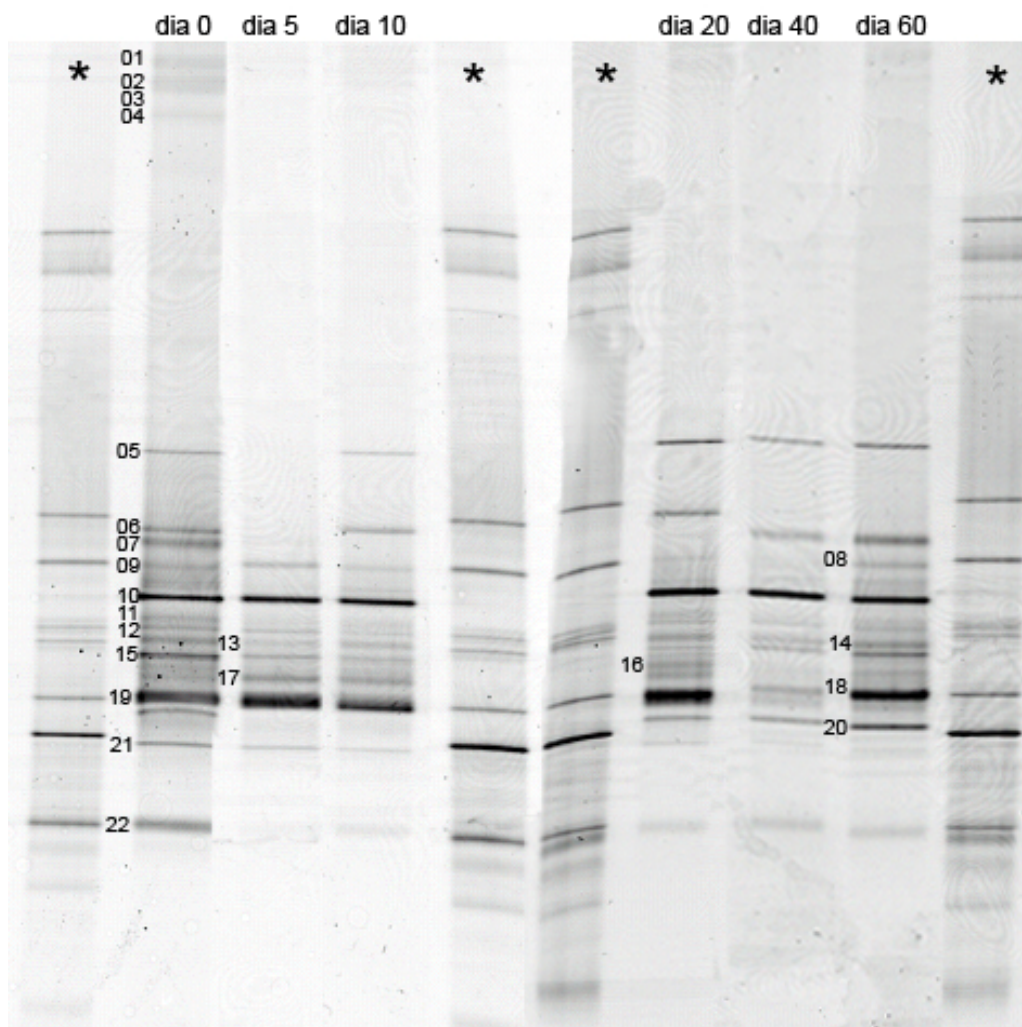


Figura 7.6. Perfil de DGGE (40–65% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3–V5 dels gens 16S rDNA de les mostres de DNA total preses al llarg de la cinètica de degradació (dels 0 als 60 dies). Les mostres usades com a marcador s'han marcat amb asteriscos.

Taula 7.1. Característiques de les bandes de DGGE del gel de DNA total.

Banda	Mostra on s'ha detectat ^a	Organisme més proper al GenBank (nº d'accés)	% similitud ^b	Grup filogenètic ^c	Banda al PCA
1	0	<i>Roseovarius crassostreae</i> (AF114484)	98	Rhodobacteraceae (α)	1
2	0	<i>Roseovarius crassostreae</i> (AF114484)	98	Rhodobacteraceae (α)	2
3	0	<i>Roseovarius crassostreae</i> (AF114484)	98	Rhodobacteraceae (α)	3
4	0	<i>Roseovarius crassostreae</i> (AF114484)	99	Rhodobacteraceae (α)	4
5	0, 10, 20, 40, 60	Sphingobacteriales Kimo37 (AB260041)	99	Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	5
6	0, 10, 20	<i>Alcanivorax borkumensis</i> MARC4D (DQ768649)	99	Alcanivoraceae (γ)	6
7	0, 20, 40, 60	<i>Lutibacterium anuloederans</i> (AY026916)	98-99	Sphingomonadaceae (α)	7
8	60	<i>Maritimibacter</i> sp. (EU052764)	97	Rhodobacteraceae (α)	8
9	0, 5, 10	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 (AY136132)	98	Rhodobacteraceae (α)	9
10	Totes	<i>Marinobacter</i> sp. GC13 (AY690678)	98	Alteromonadaceae (γ)	11
11	Totes	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 (AY136132)	96	Rhodobacteraceae (α)	12
12	Totes	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 (AY136132)	99	Rhodobacteraceae (α)	13
13	0, 5, 10	<i>Sphingomonas</i> sp. NP31 (EU196324)	98	Sphingomonadaceae (α)	14
14	20, 40, 60	<i>Marinobacter</i> sp. GC13 (AY690678)	98	Alteromonadaceae (γ)	15
15	Totes	<i>Thalassospira tepidiphila</i> (AB265822)	99	Rhodobacteraceae (α)	16
16	0, 20, 40, 60	<i>Roseobacter</i> sp. AP12 (EU374898)	98	Rhodobacteraceae (α)	17
17	5, 10	<i>Thalassospira</i> sp. (FJ210811)	99	Rhodobacteraceae (α)	18
18	40, 60	<i>Flavobacterium</i> sp. 7BT (AF386740)	99	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)	19
19	Totes	<i>Thalassospira</i> sp. 1-1B (AB265822)	99	Rodospirillaceae (α)	20
20	40, 60	<i>Alcaligenes</i> sp. CCUG 36768 (AJ133493)	99	Alcaligenaceae (β)	22
21	Totes	<i>Roseobacter</i> sp. (EU374898)	98	Rhodobacteraceae (α)	23
22	0, 20, 40, 60	<i>Parvibaculum</i> sp. W7-12 (DQ659442)	99	Phyllobacteriaceae (α)	26

^a Mostres en què la banda suposa més d'un 2% de la intensitat relativa.

^b A l'organisme més proper a la base de dades GenBank.

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

Atenent a la intensitat relativa de les bandes, al llarg de l'experiment han predominat les famílies d' α -Proteobacteria (figura 7.7), seguides de les γ . Aquests resultats són consistents amb els obtinguts en localitats contaminades amb fuel del *Prestige*, com a l'experiment de camp dut a terme a Cantàbria (vegeu 5.2) (Jiménez et al., 2007) i a un estudi dut a terme a la Costa da Morte (Alonso-Gutiérrez et al., 2009). Així mateix, s'ha descrit que en ambients artificials el grup γ -Proteobacteria (amb predomini d'*Alcanivorax*) és substituït ràpidament per l' α (Röling et al., 2002).

Ara bé, una diferència fonamental respecte dels estudis citats, és que en el present cas no s'han detectat bacteris Gram-positius pertanyents a Actinobacteria, com el gènere *Rhodococcus*, els quals no solen predominar en ambients amb contaminacions per hidrocarburs recents (Margesin et al., 2003). En els cultius in vitro *Rhodococcus* es podria veure desplaçat competitivament per gèneres de creixement més ràpid, corresponents a α i γ -Proteobacteria com ara *Alcanivorax* o *Thalassospira*.

També s'han identificat, en menor mesura, bandes corresponents a β -Proteobacteria i a Bacteroidetes. La importància relativa de cadascun dels grups filogenètics, però, ha variat amb el temps. La intensitat relativa dels α -proteobacteris decreix considerablement cap al final de l'experiment (dies 40 i 60), paral·lelament a l'increment de la resta dels grups, en especial de Bacteroidetes, amb l'aparició d'una nova banda de *Flavobacterium*.

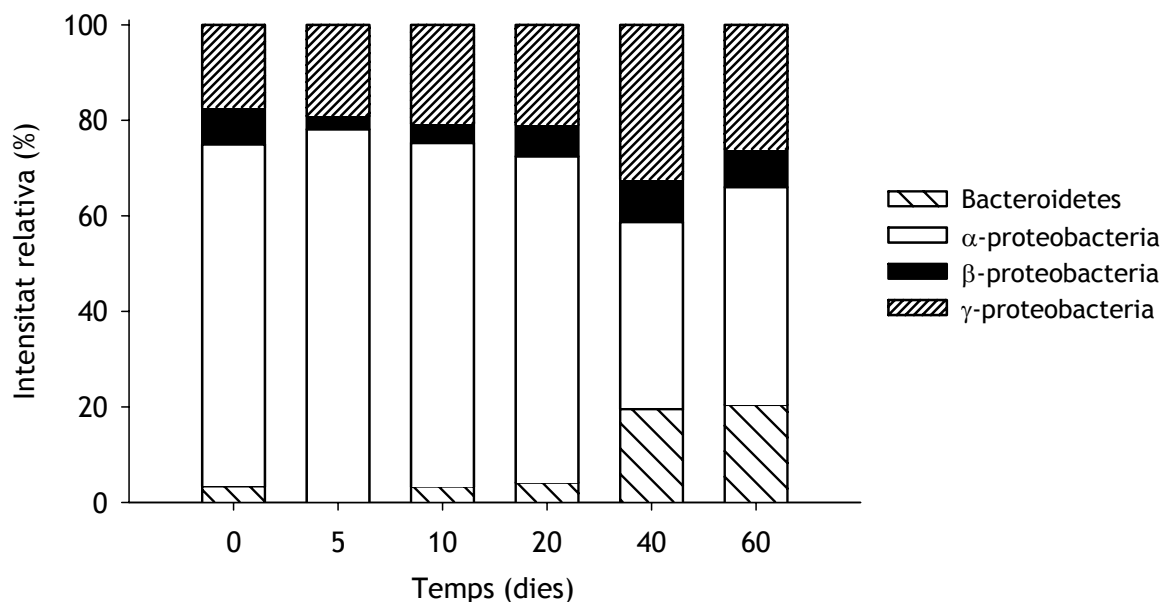


Figura 7.7. Evolució de la comunitat microbiana al llarg de la cinètica, en funció de la intensitat relativa de cada grup filogenètic.

Dels diversos microorganismes identificats al llarg de la incubació destaquen els gèneres *Thalassospira* i *Marinobacter*. Altres microorganismes també presents a tots els perfils de DGGE són *Lutibacterium*, *Roseobacter*, i *Parvibaculum*, la relació amb la degradació d'hidrocarburs dels quals ja s'ha discutit anteriorment (vegeu el capítol 6).

D'altra banda, *Alcacinivorax borkumensis*, obligat utilitzador d'alcans, *n*-alquilcicloalcans o *n*-alquilbenzens (vegeu 6.1), es detecta només fins els 20 dies. Aquesta presència coincideix amb el màxim de degradació de la fracció alifàtica, especialment dels compostos més fàcilment biodegradables, ja que un 80% de la biodegradació a què s'arriba s'assoleix en els primers 20 dies. Acompanyant aquest microorganisme hi ha el gènere *Sphingomonas*, que en aquest cas només es detecta fins el dia 10.

En les últimes fases de la degradació, s'han identificat els gèneres *Alcaligenes* i *Flavobacterium*. *Alcaligenes* ha estat relacionat amb la degradació d'HAP (vegeu 6.12).

Pel que fa a la diversitat microbiana, hi ha hagut una disminució significativa del valor d'H' a l'inici de l'experiment, de $2,91 \pm 0,02$ a $1,99 \pm 0,02$ en cinc dies (figura 7.8), valor que ha oscil·lat lleugerament fins al final de l'experiment.

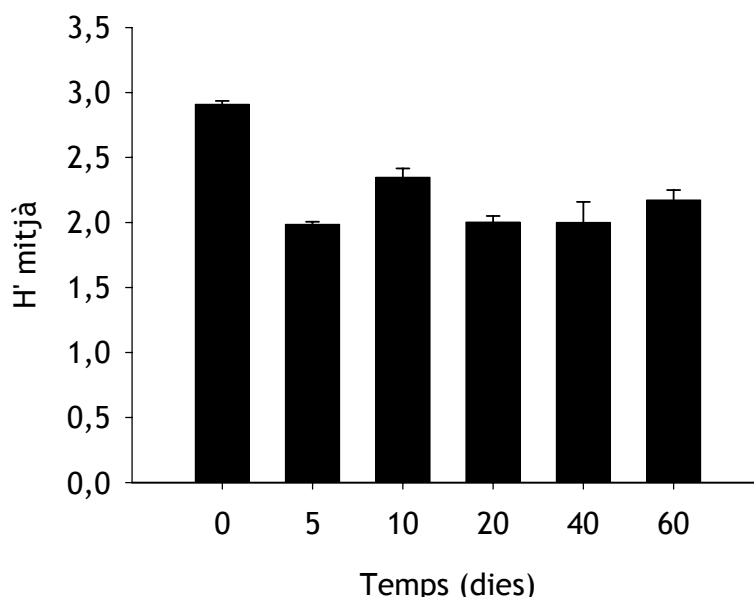


Figura 7.8. Índex de Shannon-Wiener (H') de la diversitat bacteriana estimada, basat en els perfils de DGGE. Les barres d'error representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents.

Degradadors d'hidrocarburs alifàtics

A fi d'identificar quins dels microorganismes detectats en els perfils de DGGE de la comunitat microbiana total són potencialment degradadors d'hidrocarburs alifàtics o d'*n*-hexadecà, s'han caracteritzat les comunitats presents a les plaques de microtitulació amb què s'han dut a terme els recomptes. Els perfils de DGGE resultants es mostren a la figura 7.9. S'han detectat 15 bandes diferents (de 2 a 15 per carril). A la taula 7.2 hi ha llistats els microorganismes identificats a les plaques amb *n*-hexadecà (C16) o fracció alifàtica (F1) com a font de carboni.

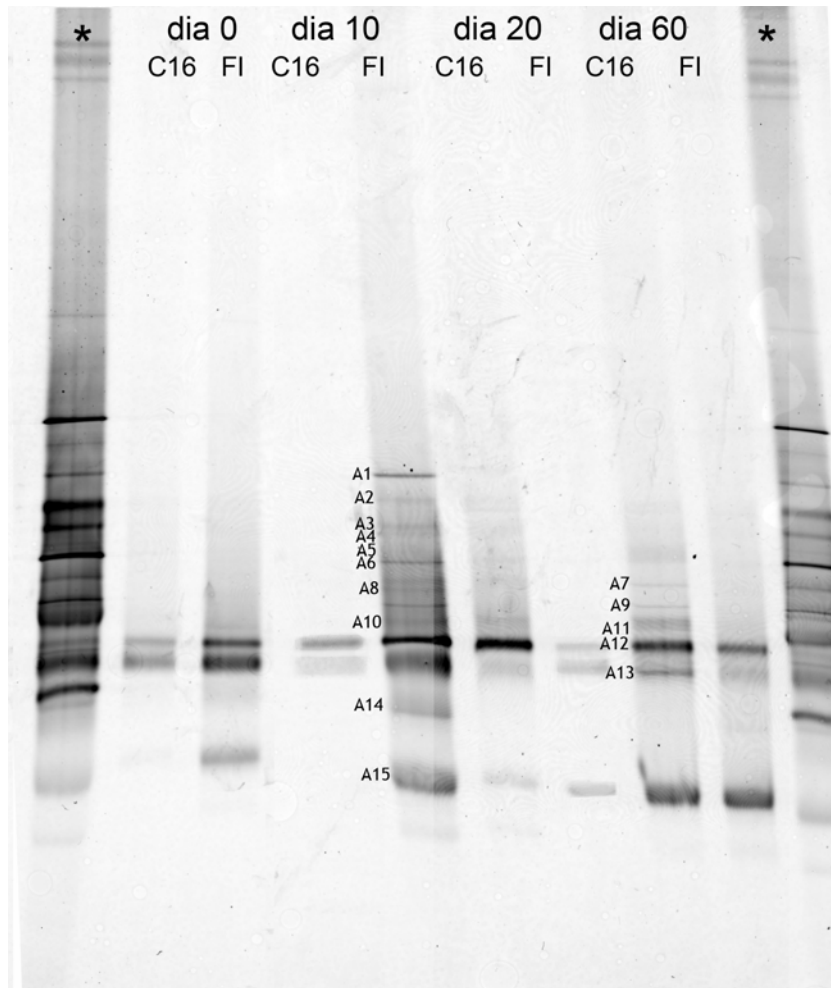


Figura 7.9. Perfil de DGGE (40–65% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3–V5 dels gens 16S rDNA de les mostres de microorganismes potencialment degradadors d’hidrocarburs alifàtics (F1) i *n*-hexadecà (C16) (dels 0 als 60 dies). Les mostres usades com a marcador s’han marcat amb asteriscos.

La major part dels microorganismes identificats corresponen a α -proteobacteris, principalment del gènere *Thalassospira* (13–39% d’intensitat del carril) i *Alcaligenes* (fins al 61%), els quals s’ha trobat al llarg de tota la cinètica. Destaquen també els gèneres *Parvibaculum* (fins al 50% d’intensitat del carril) i *Marinobacter* (fins al 22%), que també són presents bé a les plaques de degradadors de C16, bé a les d’F1, al llarg de tot l’experiment.

Sorprèn que pràcticament no s’hagi detectat el gènere *Alcanivorax* (només als 10 dies en les plaques amb F1), la qual cosa pot fer pensar que la seva concentració al llarg de la cinètica és molt inferior a la dels esmentats altres gèneres. Una altra de les causes de la no detecció podria ser el biaix relacionat amb la PCR: en el capítol anterior s’ha posat de manifest que el mètode d’anàlisi és un factor clau en la caracterització de les comunitats microbianes; ara bé, el fet que sí que s’identifiqui en els perfils de degradadors d’HAP (vegeu el següent apartat) obliga a descartar aquesta hipòtesi.

Taula 7.2. Característiques de les bandes del gel de DGGE dels degradadors d'hidrocarburs alifàtics i *n*-alcans.

Banda	Mostra on s'ha detectat ^a	Organisme més proper al GenBank (nº d'accés)	% similitud ^b	Grup filogenètic ^c	Banda al gel de DNA total	Banda al PCA
A1	F1-10	-	-	-	-	4
A2	F1-10	<i>Sphingobacteriales</i> Kimo37 (AB260041)	99	<i>Sphingobacteriales</i> (Bacteroidetes)	B5	5
A3	F1-10	<i>Alcanivorax borkumensis</i> MARC4D (DQ768649)	99	Alcanivoraceae (γ)	B6	6
A4	F1-10	<i>Lutibacterium anuloederans</i> (AY026916)	98	Sphingomonadaceae (α)	B7	7
A5	F1-10	<i>Maritimibacter</i> sp. (EU052764)	97	Rhodobacteraceae (α)	B8	8
A6	F1-10, C16-60	<i>Marinobacter</i> sp. GC13 (AY690678)	98	Alteromonadaceae (γ)	B10	11
A7	F1-10, C16-20, -60	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 (AY136132)	96	Rhodobacteraceae (α)	B11	12
A8	F1-10	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 (AY136132)	99	Rhodobacteraceae (α)	B12	13
A9	F1-10, -20, C16-60	<i>Sphingomonas</i> sp. NP31 (EU196324)	98	Sphingomonadaceae (α)	B13	14
A10	F1-0, -10, -20, C16-20, -60	<i>Marinobacter</i> sp. GC13 (AY690678)	98	Alteromonadaceae (γ)	B14	15
A11	F1-10, C16-20, -60	<i>Thalassospira</i> sp. (FJ210811)	99	Rhodobacteraceae (α)	B17	18
A12	Totes	<i>Thalassospira</i> sp. 1-1B (AB265822)	99	Rodospirillaceae (α)	B19	20
A13	Totes	<i>Alcaligenes</i> sp. CCUG 36768 (AJ133493)	99	Alcaligenaceae (β)	B20	22
A14	F1-10, C16-20	<i>Roseobacter</i> sp. (EU374898)	98	Rhodobacteraceae (α)	B21	23
A15	F1-0, -10, -20, C16-20, -60	<i>Parvibaculum</i> sp. W7-12 (DQ659442)	99	Phyllobacteriaceae (α)	B22	26

^a Mostres en què la banda suposa més d'un 2% de la intensitat relativa.

^b A l'organisme més proper a la base de dades GenBank.

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

Cal destacar que emprant F1 com a font de carboni per als comptatges no només s'han detectat tots els microorganismes dels identificats a les plaques amb C16, sinó també de nous. Aquest resultat reforça la idea de recomanar la utilització d'un medi amb una mescla d'alcans per dur a terme els recomptes de degradadors en substitució de l'utilitzat fins ara amb només C16.

En aquest sentit, s'observen diferències importants en la diversitat microbiana entre les plaques de degradadors de C16 i d'F1 i també una evolució temporal (figura 7.10): A l'inici de l'experiment (dies 0 i 10), la diversitat de degradadors d'F1 és molt superior a la de degradadors de C16, però al dia 20 els índexs s'igualen i al final de l'experiment el dels degradadors de C16 és superior (vegeu 7.1.1).

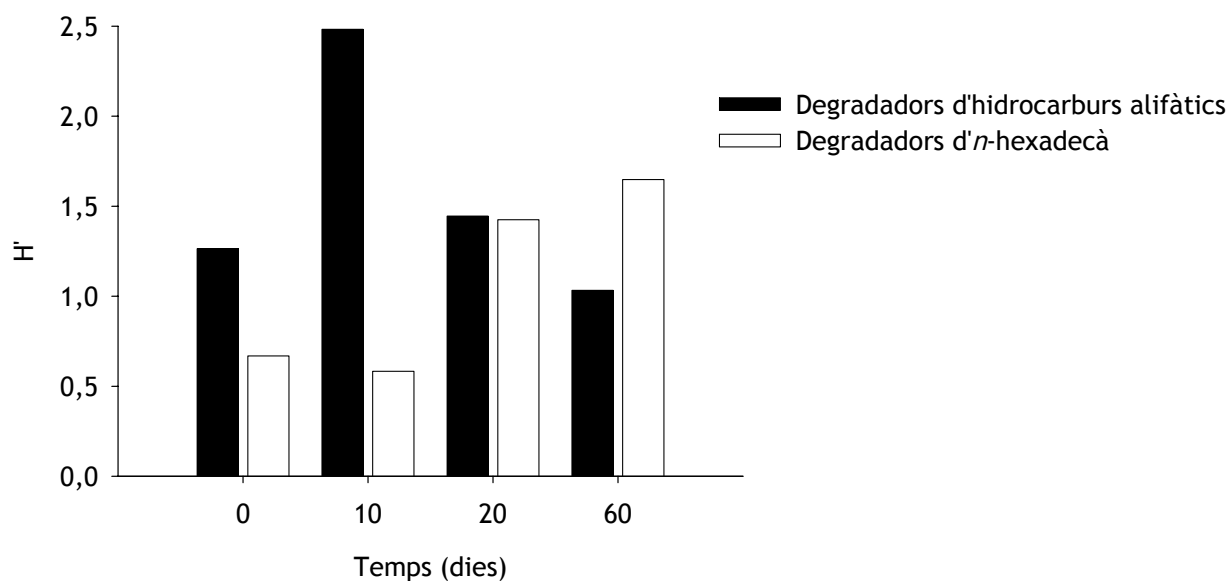


Figura 7.10. Índex de Shannon-Wiener (H') de la diversitat bacteriana estimada en les plaques dels recomptes de degradadors d'hidrocarburs alifàtics i de degradadors d'*n*-hexadecà, basat en els perfils de DGGE.

Els perfils de DGGE corresponen als de la darrera dilució dels recomptes en plaques de microtitulació, de manera que únicament mostren els microorganismes majoritaris. Així, a l'inici de l'experiment, quan les concentracions de degradadors de fracció alifàtica i d'*n*-hexadecà són similars ($>10^5$ UFC ml⁻¹) (figura 7.2), i per tant la dilució de què es prenen les mostres per fer els perfils és la mateixa, es pot observar una diversitat real. Al dia 60, però, la concentració de degradadors de fracció alifàtica és un logaritme superior, de manera que el perfil únicament mostra els microorganismes més abundants ($>10^7$ UFC ml⁻¹), mentre que el perfil de degradadors d'alcans ja mostraria els microorganismes que es trobessin per sobre de 10^6 UFC ml⁻¹.

Degradadors d'hidrocarburs aromàtics

Els perfils de DGGE de les comunitats presents a les plaques de microtitulació amb HAP com a font de carboni han servit per identificar els microorganismes potencialment degradadors d'HAP. S'han detectat 22 bandes diferents (de 14 a 19 per carril) (figura 7.11), 15 de les quals (85–96% d'intensitat de carril) han estat identificades (taula 7.3).

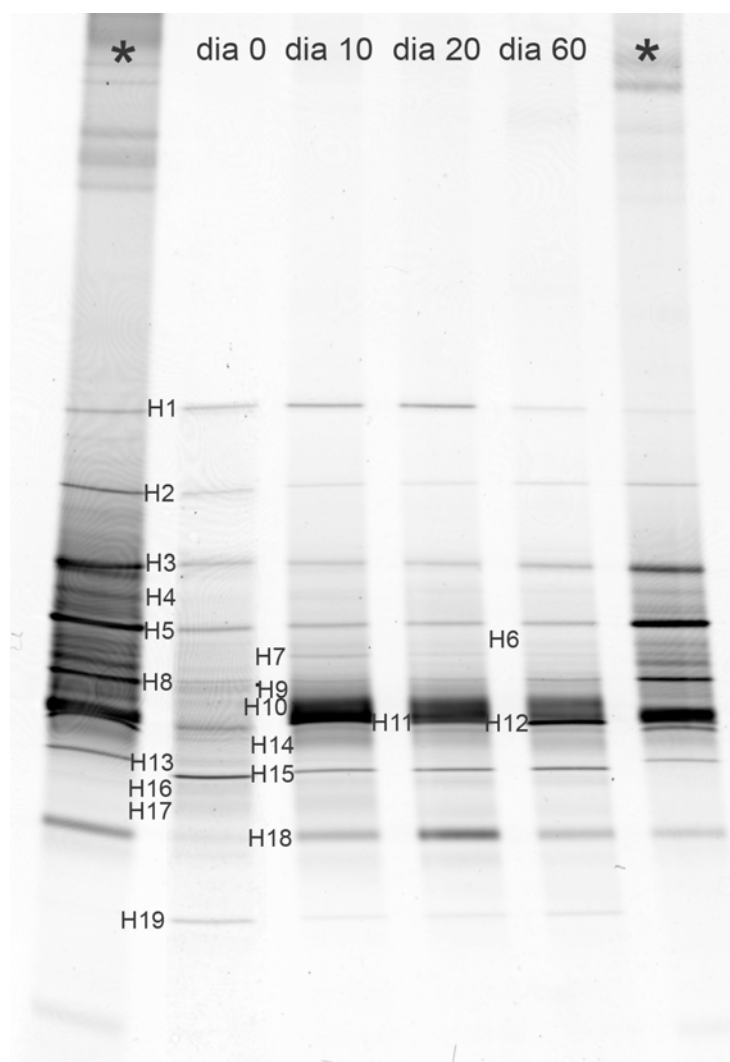


Figura 7.11. Perfil de DGGE (40–65% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3–V5 dels gens 16S rDNA de les mostres de microorganismes potencialment degradadors d'HAP (dels 0 als 60 dies). Les mostres usades com a marcador s'han marcat amb asteriscos.

La majoria dels microorganismes identificats s'han detectat també en les plaques amb hidrocarburs alifàtics o *n*-hexadecà i coincideixen amb els trobats a la comunitat microbiana total al llarg de la incubació. Es tracta, en gran part, d' α -proteobacteris, tot i que també hi ha integrants de β - i γ -Proteobacteria i Bacteroidetes. Amb tot, hi ha diferències: en primer lloc, no s'ha detectat el gènere *Sphingomonas*.

Per contra, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Roseobacter*, *Lutibacterium* es troben a tots els perfils. Molts d'aquests gèneres s'han relacionat tant amb la degradació d'alcans com amb la d'HAP (vegeu 6.1.1).

D'altra banda, s'ha trobat el gènere *Flavobacterium* (no crescut en plaques amb hidrocarburs alifàtics). Aquest gènere apareix els dies 10–60, fet que reforça la hipòtesi que podria tenir un paper més important en els darrers estadis de la degradació del fuel.

Per últim, s'ha identificat (a tots els perfils) el gènere *Mesorhizobium*, que no s'ha detectat ni a la comunitat total, ni als perfils de potencials degradadors d'hidrocarburs alifàtics. Aquest gènere s'ha relacionat amb la degradació de fenantrè i fluorè (Sutiknowati, 2007;

Wang et al., 2008) i ha estat aïllat a partir de la mostra M81 (vegeu 6.1.3). També podria tenir un paper en el subministrament de N, ja que n'és fixador. Així mateix, s'han detectat 3 bandes noves més que no han pogut ser seqüenciades. Probablement es tracti de microorganismes que no són abundants a la comunitat total però que desenvolupen un paper important en la degradació dels HAP.

Taula 7.3. Característiques de les bandes del gel de DGGE dels degradadors d'HAP.

Banda	Mostra on s'ha detectat ^a	Organisme més proper al GenBank (nº d'accés)	% similitud ^b	Grup filogenètic ^c	Banda al gel de DNA total	Banda al PCA
H1	Totes	-	-	-	-	4
H2	Totes	<i>Sphingobacteriales bacterium Kimo37</i> (AB260041)	99	Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	B5	5
H3	Totes	<i>Alcanivorax borkumensis</i> MARC4D (DQ768649)	99	Alcanivoraceae (γ)	B6	6
H4	Totes	<i>Lutibacterium anuloeferans</i> (AY026916)	98	Sphingomonadaceae (α)	B7	7
H5	Totes	<i>Marinobacter</i> sp. GC13 (AY690678)	98	Alteromonadaceae (γ)	B10	11
H6	Totes	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 (AY136132)	96	Rhodobacteraceae (α)	B11	12
H7	10, 20, 60	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 (AY136132)	99	Rhodobacteraceae (α)	B12	13
H8	Totes	<i>Thalassospira tepidiphila</i> (AB265822)	99	Rhodobacteraceae (α)	B15	16
H9	Totes	<i>Roseobacter</i> sp. AP12 (EU374898)	98	Rhodobacteraceae (α)	B16	17
H10	10, 20, 60	<i>Thalassospira</i> sp. (FJ210811)	99	Rhodobacteraceae (α)	B17	18
H11	10, 20, 60	<i>Flavobacterium</i> sp. 7BT (AF386740)	99	Flavobacteriaceae (Bacteroidetes)	B18	19
H12	0, 20, 60	<i>Thalassospira</i> sp. 1-1B (AB265822)	99	Rodospirillaceae (α)	B19	20
H13	Totes	-	-	-	-	21
H14	10, 60	<i>Alcaligenes</i> sp. CCUG 36768 (AJ133493)	99	Alcaligenaceae (β)	B20	22
H15	0, 10	<i>Roseobacter</i> sp. (EU374898)	98	Rhodobacteraceae (α)	B21	23
H16	Totes	-	-	-	-	24
H17	Totes	-	-	-	-	25
H18	10, 20, 60	<i>Parvibaculum</i> sp. W7-12 (DQ659442)	99	Phyllobacteriaceae (α)	B22	26
H19	Totes	<i>Mesorhizobium</i> sp. 8.98 (AY870682.1)	98	Phyllobacteriaceae (α)	-	28

^a Mostres en què la banda suposa més d'un 2% de la intensitat relativa.

^b A l'organisme més proper a la base de dades GenBank.

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

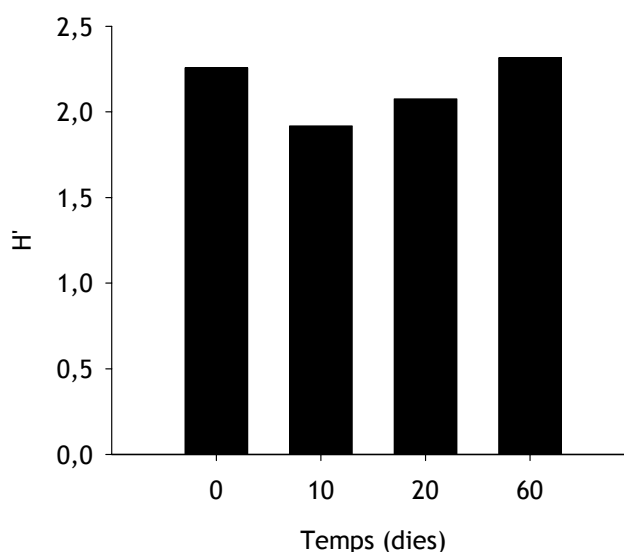


Figura 7.12. Índex de Shannon-Wiener (H') de la diversitat bacteriana estimada en les plaques dels recomptes de degradadors d'HAP, basat en els perfils de DGGE.

En relació amb la diversitat microbiana, en general els valors de l'índex de Shannon-Wiener han estat més alts que els dels degradadors d'F1 o, sobretot, C16 (només cal veure el nombre de bandes diferents al llarg de tota la cinètica) i si bé han oscil·lat, les variacions han estat molt menors. Després d'una reducció inicial, H' ha tendit a augmentar cap al final de l'experiment.

Hi ha diversos factors que poden explicar aquest comportament: en primer lloc els comptatges són menors, de manera que la dilució que s'ha pres per analitzar-ne el perfil és més baixa. Això implica que hi pugui haver més microorganismes que es trobaran a més baixes concentracions. A més, en comparació amb els microcosmos per als recomptes de degradadors de C16, hi ha més fonts de carboni disponibles.

Anàlisi de components principals

Per tal de poder explicar l'evolució de l'estructura de la comunitat microbiana, s'ha dut a terme una anàlisi de components principals (PCA) emprant tant els perfils de DNA total com els perfils corresponents als microorganismes potencialment degradadors d'hidrocarburs alifàtics i aromàtics i de *n*-alcans. Les dues primeres variables, que expliquen el 47,5% de la variabilitat, es troben representades a la figura 7.13. El diagrama de dispersió permet identificar cinc grups de mostres independents.

En primer lloc, els perfils corresponents al DNA total del dia 0, formen un clúster completament diferenciat de la resta en la primera component (PC1, $P < 0,05$). En segon lloc hi apareix un grup format pels de DNA total de les mostres dels dies 5 i 10. La resta dels perfils de DNA total s'agrupen en un tercer clúster, junt amb el perfil de degradadors d'hidrocarburs alifàtics del dia 10. Els perfils de degradadors d'alcans i d'hidrocarburs alifàtics formen un altra agrupació. Per últim, els perfils de degradadors d'HAP es troben clarament diferenciats de la resta en la segona component (PC2).

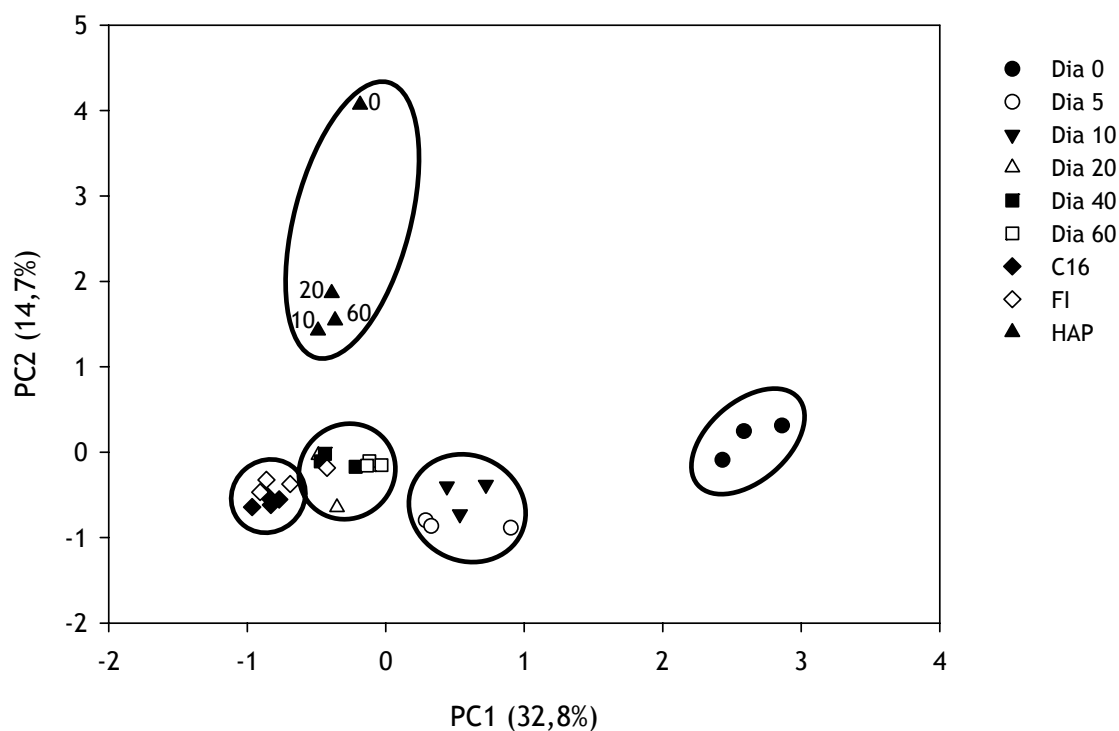


Figura 7.13. Diagrama de dispersió per a les dues primeres variables (PC1 i PC2) obtingudes en l'anàlisi de components principals.

Pel que fa a la primera component, que sembla reflectir una ordenació cronològica de les mostres, són moltes les bandes que n'expliquen, majoritàriament, la variabilitat (figura 7.14), començant pel clúster 1-3, filogenèticament molt properes a un integrant de la família Rhodobacteraceae trobat anteriorment a Cantàbria (vegeu el capítol 5.1) (Jiménez et al., 2007), les quals únicament es troben al perfil de DNA total del dia 0 i hi contribueixen positivament. Destaquen també les bandes 27 i 29, que no s'han pogut seqüenciar.

Òbviament totes les soques detectades participen, d'una o altra manera, en la degradació del petroli, ja sigui metabolitzant els hidrocarburs de les diferents fraccions (com a degradadors primaris) o utilitzant productes secundaris. També poden tenir el paper de subministradors de factors de creixement o de cosubstrats. Si no fos així segurament s'haurien perdut durant el llarg procés d'enriquiment. Ara bé, el fet que contribueixin positivament a la component indica que participen, principalment, en els primers estadis de degradació. Així doncs, al llarg de la cinètica de degradació es veuen substituïts per altres microorganismes que, o bé degraden més eficientment els hidrocarburs, o bé estan especialitzats en degradar substrats més complexos.

En l'altre extrem hi ha les bandes amb coeficients negatius, de les quals destaquen la 15 (corresponent a *Marinobacter*) i la 26 (*Parvibaculum*), gèneres relacionats amb la degradació dels hidrocarburs (vegeu 6.1).

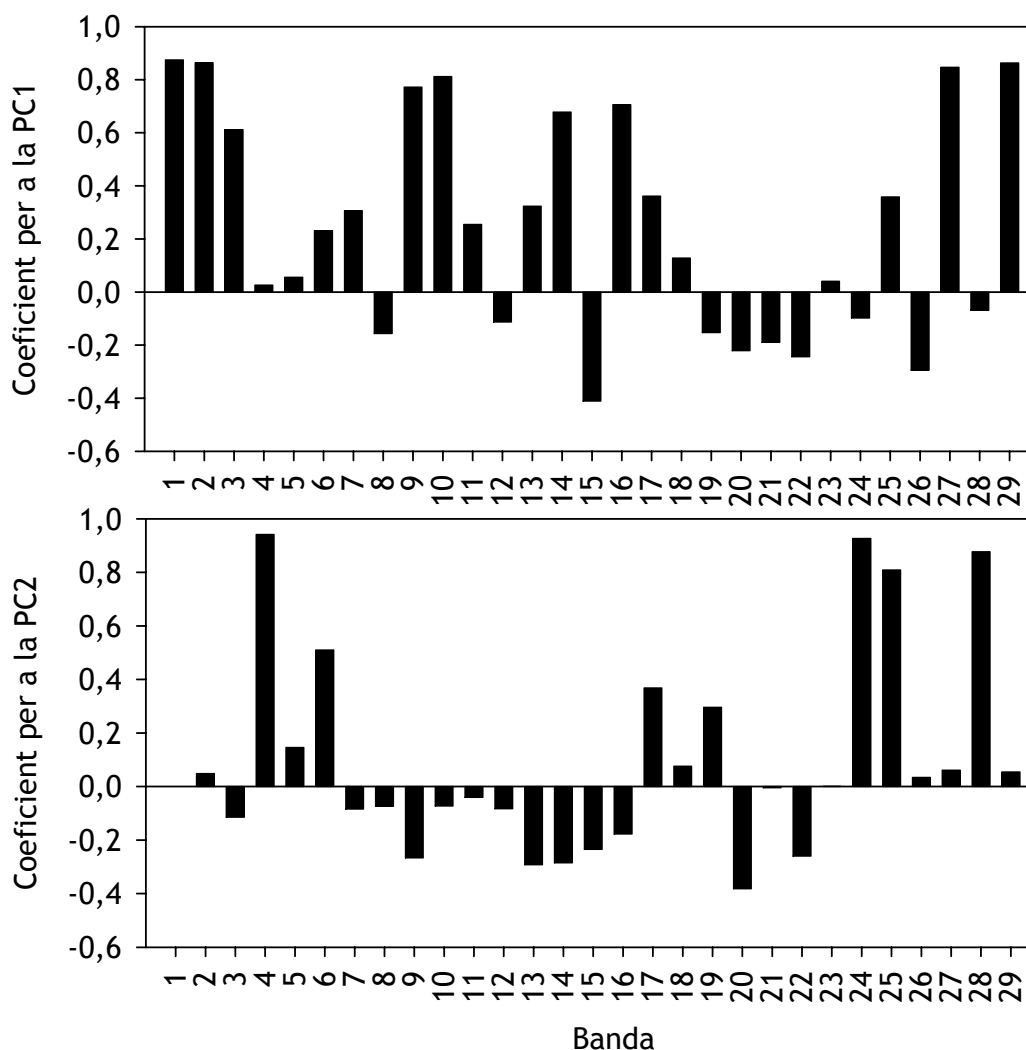


Figura 7.14. Coeficients de cada banda en dues primeres components PC1 i PC2 (47,5% de la variabilitat).

A la segona component les mostres s'agrupen en funció del predomini dels potencials degradadors d'HAP, o d'hidrocarburs alifàtics (figura 7.13). Així doncs, les bandes que hi contribueixin positivament (algunes de les quals únicament s'han trobat en gels de potencials degradadors d'HAP) poden correspondre a microorganismes associats a la degradació d'HAP, mentre que les que ho facin negativament serien les de microorganismes associats a la degradació d'hidrocarburs alifàtics o *n*-alcans.

D'entre les primeres destaquen la parella de bandes 24-25, que no s'han pogut seqüenciar i la banda 28, corresponent al gènere *Mesorhizobium*, associat a la degradació d'HAP (vegeu 6.1.3). Les bandes amb coeficients negatius més importants corresponen, majoritàriament a α -proteobacteris i també al gènere *Marinobacter*.

7.2. Anàlisi de la comunitat degradadora d'alcans per SIP

L'anàlisi per DGGE de les comunitats crescudes a les plaques de microtitulació emprades per als recomptes de microbiota ha permès identificar els microorganismes potencialment degradadors d'hidrocarburs aromàtics, alifàtics i d'alcans (vegeu 7.1). Ara bé, aquest mètode no permet discernir quins són els que realment han utilitzat l'hidrocarbur com a substrat de creixement. A aquest efecte s'ha buscat una tècnica alternativa, basada en l'ús d'isòtops estables (Boschker et al., 1998; Radajewski et al., 2000). D'entre les diverses opcions existents (vegeu 1.6.1) s'ha escollit l'anàlisi d'àcids nucleics (DNA i RNA) marcats isotòpicament (Lueders et al., 2004; Whiteley et al., 2007), ja que ens permet obtenir informació filogenètica directa (Radajewski et al., 2000).

Inicialment s'havia previst dur a terme dos experiments diferents, emprant en el primer un substrat utilitzat habitualment com a model de degradació dels *n*-alcans (*n*-hexadecà) i en el segon un substrat usat com a model dels HAP (fenantrè). Malauradament, no ha estat possible obtenir fenantrè, ni cap altre HAP completament marcat amb ^{13}C , requisit indispensable si es vol emprar la tècnica de SIP amb àcids nucleics, de manera que únicament s'han dut a terme experiments utilitzant *n*-hexadecà.

7.2.1. DNA

S'ha dut a terme un primer experiment seguint la metodologia descrita a l'apartat 3.4.1 per analitzar DNA marcat isotòpicament amb ^{13}C . En contra del que s'esperava, després de l'experiment únicament s'ha trobat una franja de densitat de DNA, corresponent a DNA lleuger en el cas de la mostra control, inoculada amb ^{12}C -*n*-hexadecà, i a DNA pesant en el cas de la mostra inoculada amb ^{13}C -*n*-hexadecà (Figura 7.15).

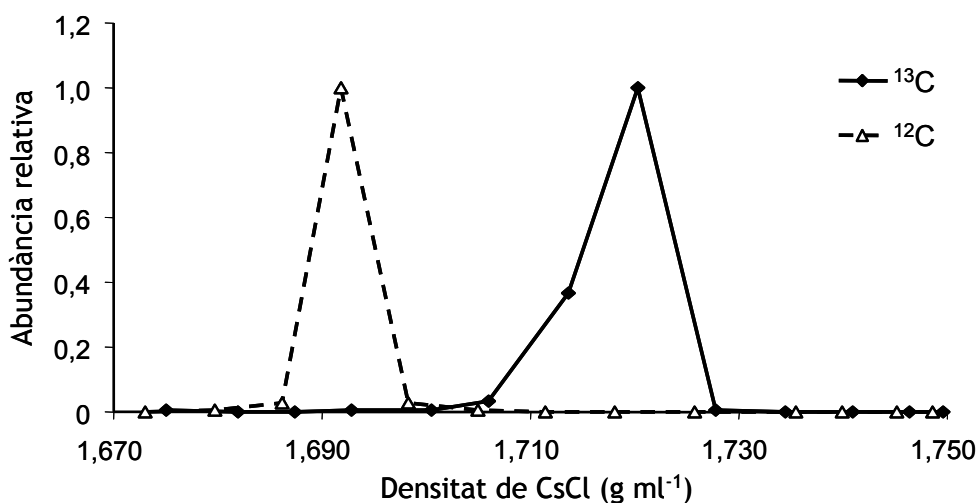


Figura 7.15. Avaluació quantitativa de la distribució de DNA dins d'un gradient de centrifugació de CsCl, per a les mostres incubades en ^{12}C -*n*-hexadecà i ^{13}C -*n*-hexadecà.

Aquest resultat podria fer pensar en l'existència d'un cultiu gairebé pur d'una soca degradadora d'*n*-hexadecà. Ara bé, els perfils de TRFLP obtinguts per a les diverses fraccions

d'ambdues mostres (incubada amb ^{13}C -*n*-hexadecà i control) obliguen a descartar aquesta hipòtesi, ja que s'han detectat, com a mínim, uns 5-6 fragments terminals de restricció abundants diferents (figura 7.16).

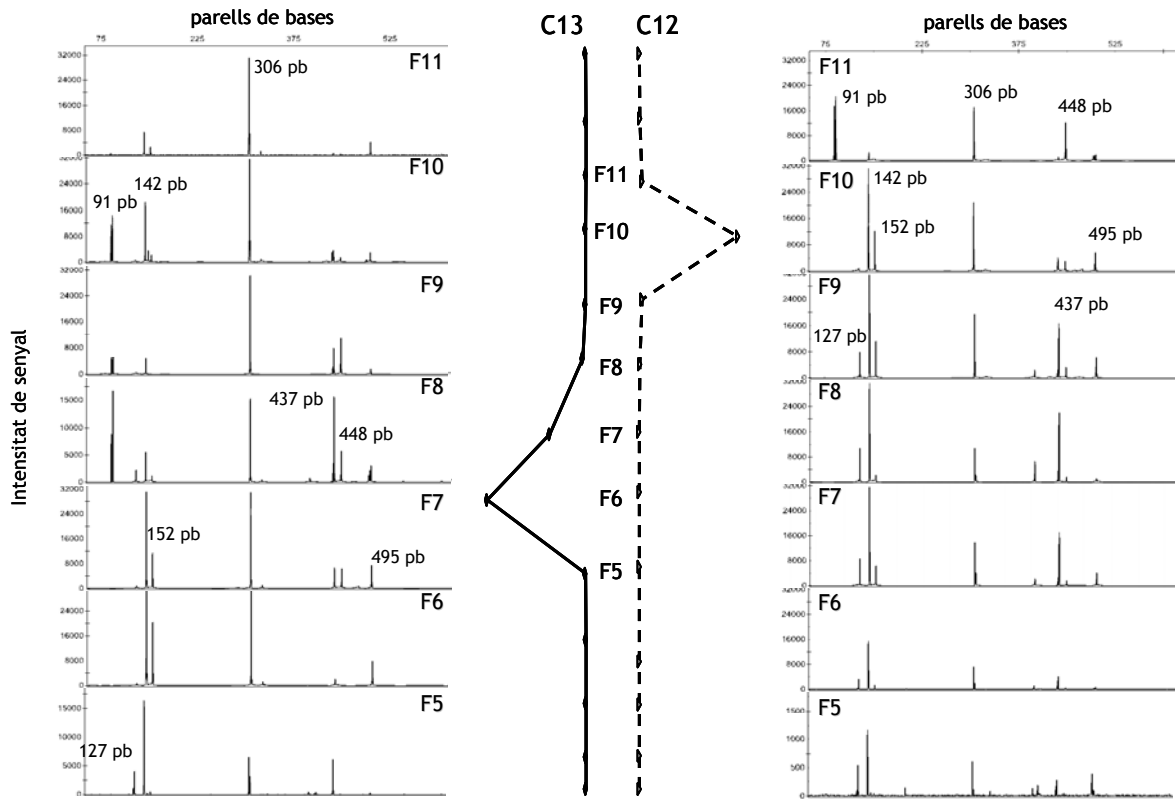


Figura 7.16. Perfils de TRFLP de diverses fraccions del gradient de CsCl de la mostra incubada amb ^{13}C -*n*-hexadecà (esquerra) i ^{12}C -*n*-hexadecà (dreta). A la part central s'han representat la distribució quantitativa del DNA als gradients i els punts en què s'han pres les diverses fraccions.

En tractar-se d'un consorci enriquit i estable i altament adaptat a la degradació del petroli és possible que tots els microorganismes marcats isotòpicament (que en aquest experiment representen pràcticament la totalitat de la comunitat microbiana) siguin efectivament degradadors d'*n*-hexadecà. Els perfils de les fraccions F6 en el gradient de DNA pesant i F10 del lleuger, que són les que acumulen la major part de DNA, són molt similars. Bàsicament estan formats pels fragments de restricció de 142, 152, 306 i 495 parells de bases. D'acord amb els resultats obtinguts in silico amb l'eina *Virtual Digest* del *Microbial Community Analysis III* (Shyu et al., 2007), el fragment de 142 correspondria a *Rhodobacter* sp., el de 152 a un flavobacteri, i el de 306 a *Alcanivorax*.

Malgrat que aquests microorganismes estan relacionats amb la degradació del C16, no es pot determinar quin és el microorganisme que la inicia més ràpidament. S'hauria hagut de prendre una mostra en el moment en què la major part de la comunitat encara estava sense marcar.

Altres fragments no tan abundants, de 91 i 448 parells de bases, que corresponen a *Sphingomonas* sp. i a un bacteri no cultivat s'han detectat únicament a les fraccions més lleugeres que les que tenen els pics de DNA. Per contra, a les fraccions més pesants que les que tenen els pics de DNA s'han detectat fragments de 127 i 437 parells de bases, que

corresponen a un α -proteobacteri no cultivat pertanyent al grup de les Rhodobacteraceae i a un bacteri no cultivat, respectivament.

7.2.2. RNA

Tenint en compte que els resultats de l'experiment de DNA-SIP no són concloents, s'ha decidit dur a terme un altre experiment, amb algunes modificacions: per començar s'ha analitzat RNA en lloc de DNA, d'aquesta manera es pot identificar la població metabòlicament activa. A més, s'ha disminuït tant la concentració d'*n*-hexadecà emprada com el temps d'incubació. Per últim, s'ha extret RNA en diferents temps per poder establir una cinètica.

Un cop efectuats els gradients de densitat, s'ha observat una evolució en la distribució de l'RNA (figura 7.17): a les 20 hores únicament s'ha observat un pic lleuger, tant en les mostres incubades amb ^{12}C -*n*-hexadecà, com amb les mostres incubades en ^{13}C -*n*-hexadecà. El DNA pesant, doncs, encara no és detectable, cosa que vol dir que la comunitat microbiana tot just l'està començant a utilitzar.

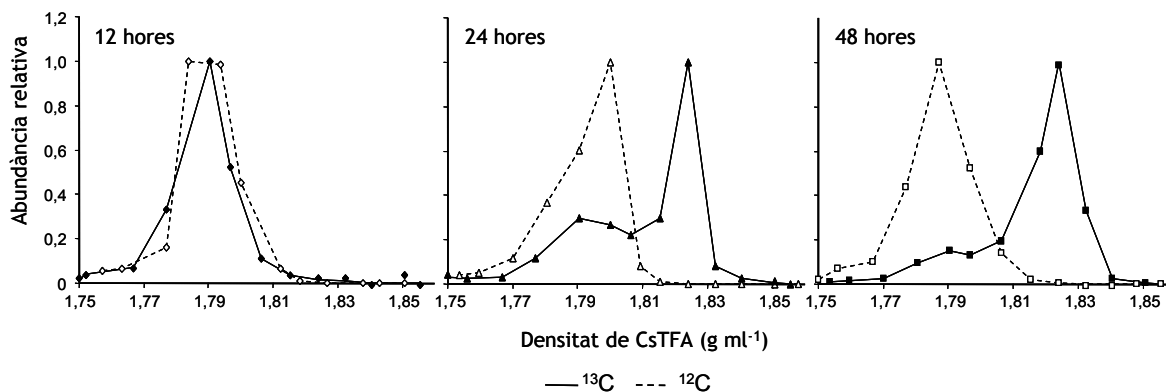


Figura 7.17. Avaluació quantitativa de la distribució d'RNA dins d'un gradient de centrifugació de CsTFA, per a les mostres incubades en ^{12}C -*n*-hexadecà i ^{13}C -*n*-hexadecà a les 12, 24 i 48 hores.

A les 24 h, però, ja es detecten dos pics de DNA a les mostres inoculades amb ^{13}C -*n*-hexadecà. I al final de l'experiment el pic de DNA pesant predomina clarament. En aquest cas, doncs, sí que s'hauria de poder detectar quins són els microorganismes que inicien la degradació de l'*n*-hexadecà, analitzant la successió de perfils de T-RFLP. Els perfils corresponents a les 12 i 48 hores es troben representats a la figura 7.18.

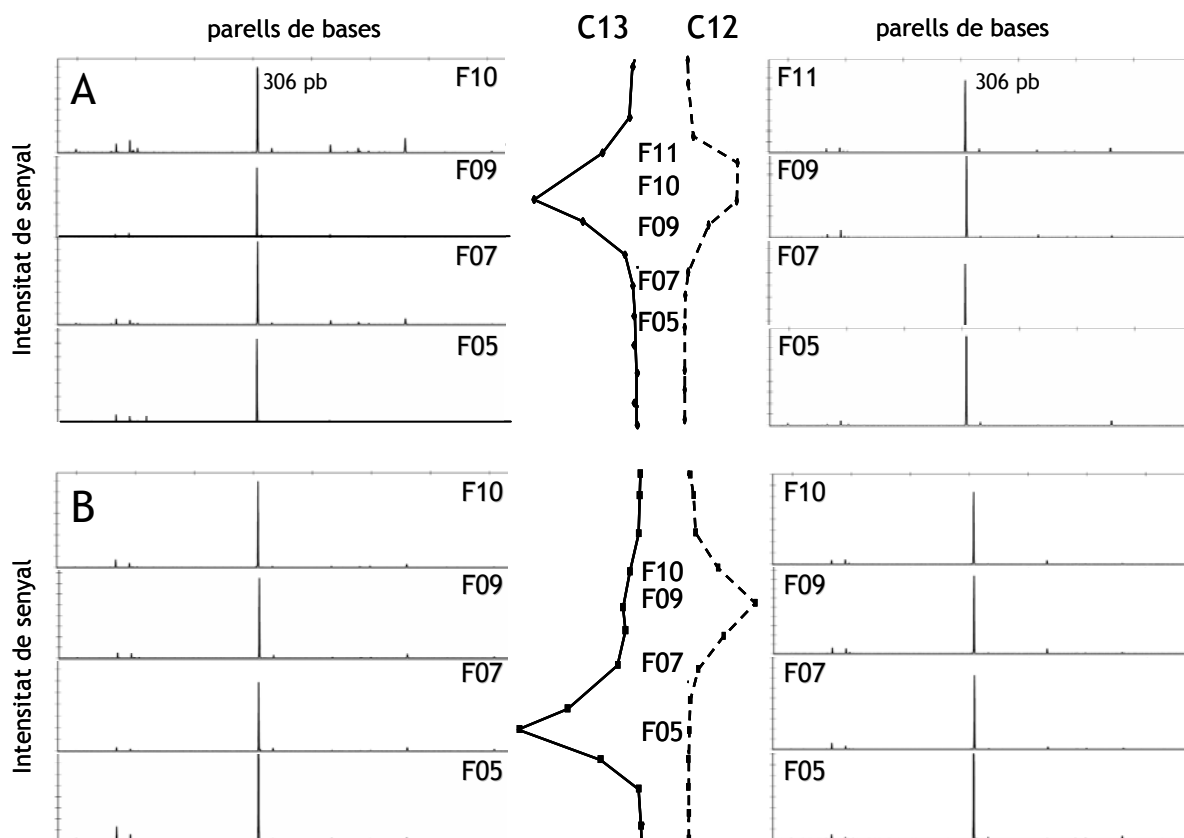


Figura 7.18. Perfils de TRFLP de diverses fraccions del gradient de CSTFA de la mostra incubada amb ^{13}C -*n*-hexadecà (esquerra) i ^{12}C -*n*-hexadecà (dreta), per a les 12 (A) i 48 hores (B). A la part central s'han representat la distribució quantitativa de l'RNA als gradients i els punts en què s'han pres les diverses fraccions.

Sorprenentment en aquest experiment, a diferència de l'anterior, només s'ha detectat una banda majoritària, de 306 parells de bases, fragment que correspon a *Alcanivorax*. Així doncs, *Alcanivorax* d'acord amb la seva qualitat de bacteri *hidrocarbonoclàstic* obligat duria a terme la degradació del C16 d'una manera quasi exclusiva durant aquestes primeres 48 hores de l'experiment.

7.3. Conclusions

Pel que fa a la cinètica de degradació, el consorci M81 ha evolucionat al llarg de tot l'experiment, paral·lelament a la degradació de les fraccions lleugeres (alifàtica i aromàtica) del fuel, que han disminuït més del 40% respecte dels controls.

Existeix una molt bona correlació entre la cinètica de degradació de la fracció alifàtica i aromàtica del fuel amb l'evolució de la poblacions degradadora d'F1 i d'HAP, respectivament. L'heteròtrofa i degradadores d'F1 i C16 han augmentat ràpidament (han passat de 10^6 a 10^8 i de 10^5 a 10^8 , respectivament, en menys de 10 dies). El creixement de la degradadora d'HAP ha estat més lent i el màxim s'ha assolit als 20 dies.

La majoria dels microorganismes identificats per DGGE formen part d' α -Proteobacteria, tot i que també s'han identificat integrants dels subfílums β i γ i de Bacteroidetes.

En relació amb els microorganismes degradadors, *Alcanivorax* és un bacteri de creixement molt ràpid i té un paper important en les primeres hores de la degradació del fuel per part del consorci, segurament en la fracció alifàtica, malgrat que també s'ha trobat en els recomptes dels degradadors d'HAP. Aquesta hipòtesi quedaria reforçada pels resultats obtinguts per SIP. Un altre gènere que podria tenir un paper important en la degradació de la fracció alifàtica és el gènere *Sphingomonas* que només s'ha detectat en els recomptes amb F1.

D'acord amb els resultats obtinguts per diverses metodologies, *Thalassospira*, *Marinobacter*, *Parvibaculum* i *Roseobacter* tindrien papers preponderants en la degradació del fuel, tant pel que fa a la fracció alifàtica com l'aromàtica.

Quant als microorganismes que podrien tenir un paper més rellevant en la degradació dels HAP, el gènere *Lutibacterium* només s'ha detectat als 10 dies en els degradadors d'alifàtics i durant tota la cinètica com a potencial degradador d'HAP. D'altra banda, atès que *Mesorhizobium* i *Flavobacterium* només s'han detectat en els recomptes de degradadors d'HAP, també podrien tenir un paper rellevant en la degradació d'aquesta fracció.

Per últim, amb relació a les metodologies emprades, la utilització d'*n*-hexadecà en els recomptes de microorganismes degradadors d'hidrocarburs alifàtics és restrictiva. És més recomanable utilitzar una mescla d'hidrocarburs alifàtics com l'F1 emprada en aquest treball, procedent del cru de petroli.

En aquest capítol s'ha dut a terme un seguiment de la comunitat microbiana del consorci M81 al llarg d'una cinètica de degradació de fuel del *Prestige*. Així mateix, s'ha identificat una sèrie de microorganismes que estan potencialment o efectiva relacionats amb la biodegradació d'hidrocarburs. Ara bé, no s'han especificat acuradament les transformacions esdevingudes al petroli.

El capítol següent se centra en la caracterització química d'aquest procés, així com de la biodegradació de fuel fotooxidat.

Capítol 8

Avaluació de la interacció entre els processos de fotooxidació i biodegradació

En els capítols anteriors s'ha estudiat tant in vitro com in situ la degradació microbiana de les fraccions més lleugeres del fuel del *Prestige*. Ara bé, aquest producte conté una proporció elevada de fraccions més polars i pesants, de les quals no se'n coneix el destí. Així mateix, al camp a més de la biodegradació hi ha altres processos, com ara la fotooxidació, que intervenen en la transformació del petroli.

Així doncs, aquest capítol té per objectiu distingir els efectes que els processos de biodegradació i fotooxidació produeixen a les diverses fraccions del fuel, així com determinar-ne les possibles interaccions.

8.1. Evolució de les diverses fraccions del petroli

Per tal de comprovar quins canvis provoquen la fotooxidació i la biodegradació a les diverses famílies d'hidrocarburs del fuel, s'ha dut a terme una anàlisi per TLC-FID del total de les mostres (figura 8.1), tècnica que permet quantificar la composició relativa de les diverses fraccions del petroli (Karlsen et al., 1991; Bharati et al., 1997; Maki et al., 2001).

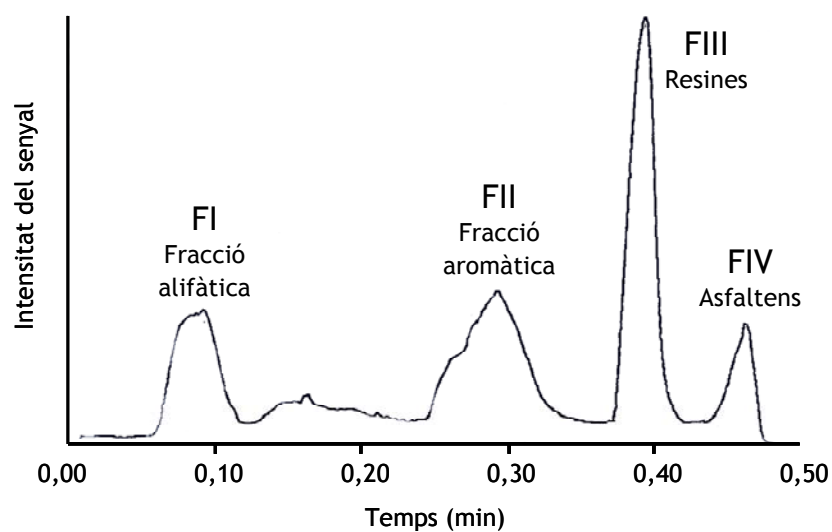


Figura 8.1. Cromatograma del fuel original obtingut per TLC-FID.

8.1.1. Efecte de la fotooxidació

Tal com es pot veure a la figura 8.2, després de 12 hores de fotooxidació a $507,5 \text{ W m}^{-2}$ s'aprecia una disminució significativa de la proporció de la fracció aromàtica (17,6% de mitjana) paral·lelament a un increment de les resines (22,5% de mitjana). La fracció alifàtica disminueix en menor mesura (5,7% en mitjana) i no s'observen diferències significatives en la proporció dels asfaltens.

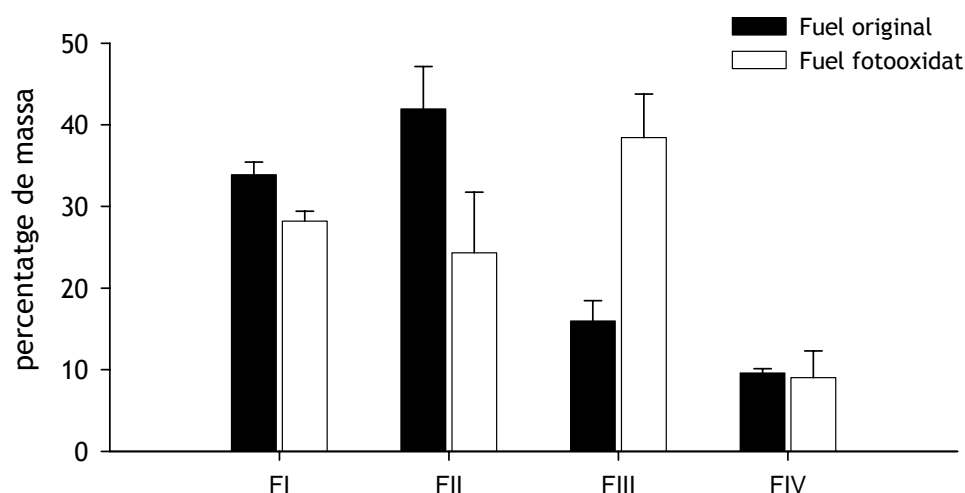


Figura 8.2. Composició del fuel original i el fuel fotooxidat segons l'anàlisi per TLC-FID.

Aquests resultats són consistents amb els descrits anteriorment per a crus de petroli (Garrett et al., 1998; Maki et al., 2001; Prince et al., 2003). Mentre que la pèrdua d'hidrocarburs en la fracció alifàtica s'explica principalment per l'evaporació dels compostos més lleugers (Garrett et al., 1998; Maki et al., 2001), la davallada dels HAP pot ser deguda tant a l'evaporació (en el cas dels compostos lleugers), com a la fotooxidació directa o indirecta (en el cas dels més pesants i més alquilats).

L'oxidació dels HAP genera compostos amb grups hidroxil, carbonil i carboxil (Larson et al., 1977 i 1979; Payne i Phillips, 1985; Poston et al., 1988), que són més polars i migren, doncs, amb les resines. Una anàlisi més exhaustiva de les fraccions per GC-MS permetrà corroborar aquestes hipòtesis.

Donat que la fotooxidació actua de forma complementària al procés de la biodegradació microbiana, preferentment sobre els hidrocarburs aromàtics de major aromaticitat i grau d'alquilació, una actuació seqüencial fotooxidació-biodegradació podria suposar una major eliminació de les diferents fraccions del fuel. Per aquest motiu s'ha avaluat la biodegradació del fuel fotooxidat per part del consorci M81.

8.1.2. Efecte de la biodegradació

La biodegradació, tant del fuel original com del fotooxidat, afecta de manera notable la fracció alifàtica (figura 8.3). El percentatge d'aquesta fracció minva de manera significativa al llarg del temps, en relació als microcosmos controls.

Pel que fa a la fracció aromàtica les diferències no són tan evidents, per bé que sembla que també hi ha una lleugera disminució, a expenses d'un increment relatiu de les resines i un aparent descens dels asfaltens.

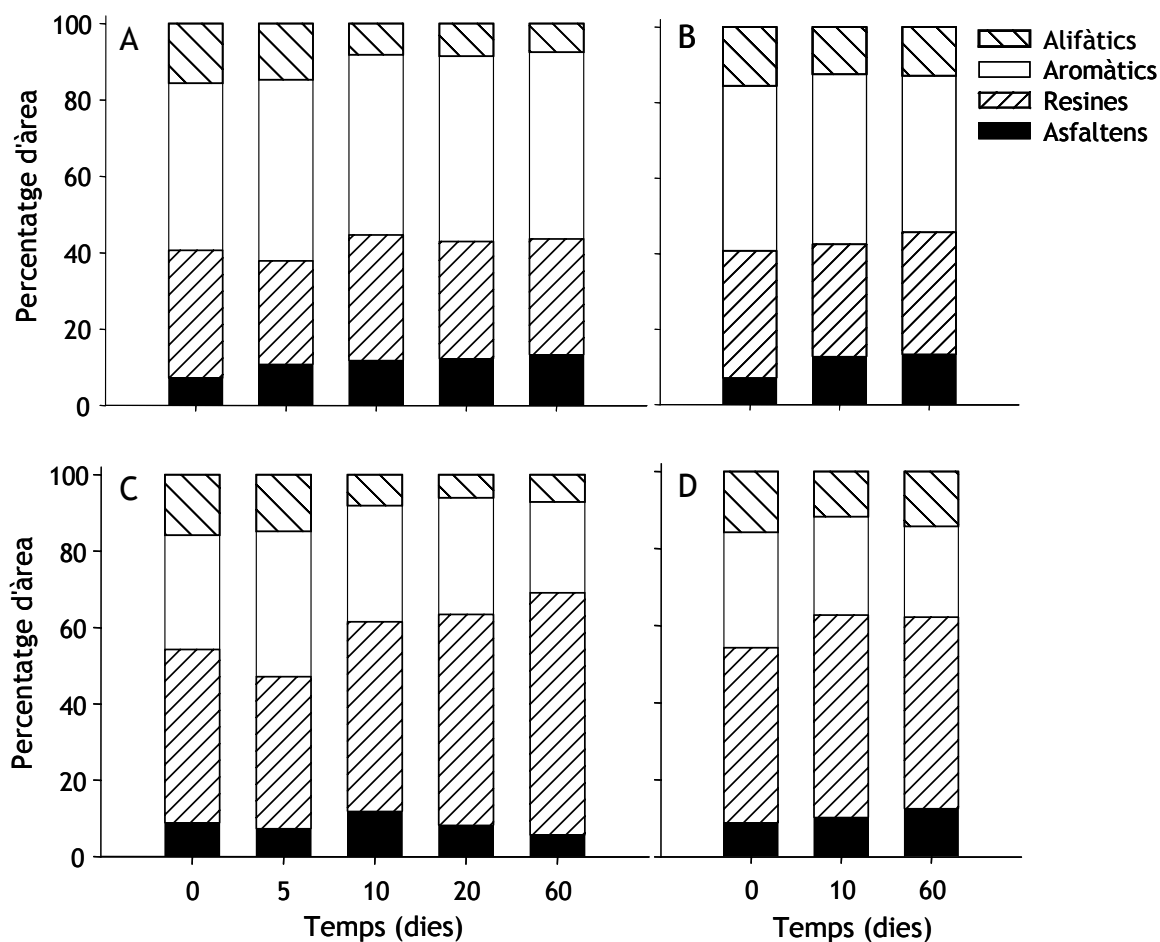


Figura 8.3. Evolució de la composició del fuel original i del fuel fotooxidat al llarg del procés de biodegradació. A) mostra de fuel i consorci M81, B) mostra de fuel sense inòcul (control abiòtic), C) fuel fotooxidat i consorci M81, D) fuel fotooxidat sense inòcul (control abiòtic fotooxidat).

8.2. Fracció alifàtica

8.2.1. Efecte de la fotooxidació

Les mostres fotooxidades presenten concentracions d'*n*-alcans i d'isoprenoides (pristà i fità) significativament més baixes que les del fuel original (figura 8.4) ($p < 0,05$ en el test *U* de Mann-Whitney), amb davallades que van del 80% (*n*-C15) al 15% (*n*-C30), comportament que corrobora la hipòtesi que les pèrdues són causades principalment per evaporació.

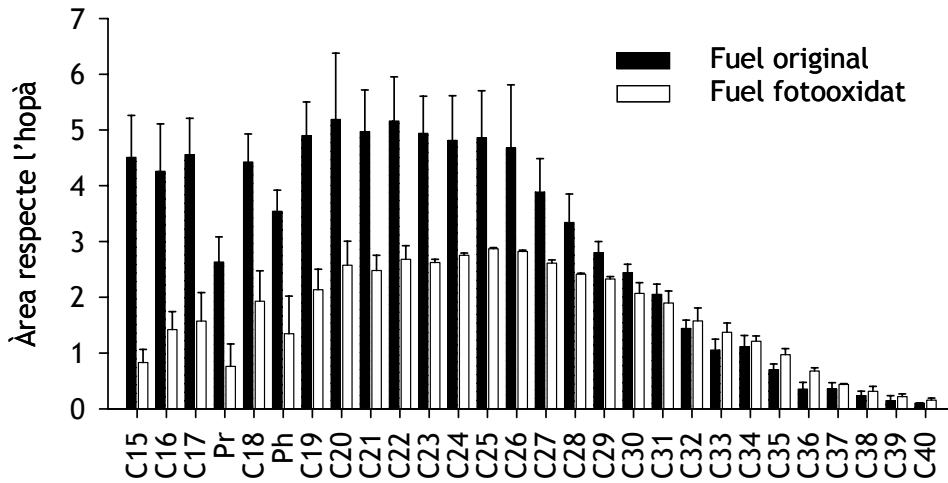


Figura 8.4. Distribució relativa dels *n*-alcans respecte al 30αβ-hopà en el fuel original i el fuel fotooxidat.

8.2.2. Efecte de la biodegradació

Al cap de 5 dies d'incubació les concentracions en el fuel original han experimentat una disminució significativa (del 85% l'*n*-C15 al 40% l'*n*-C30) i fins i tot en el cas dels isoprenoides les reduccions són majors del 30% (figura 8.5).

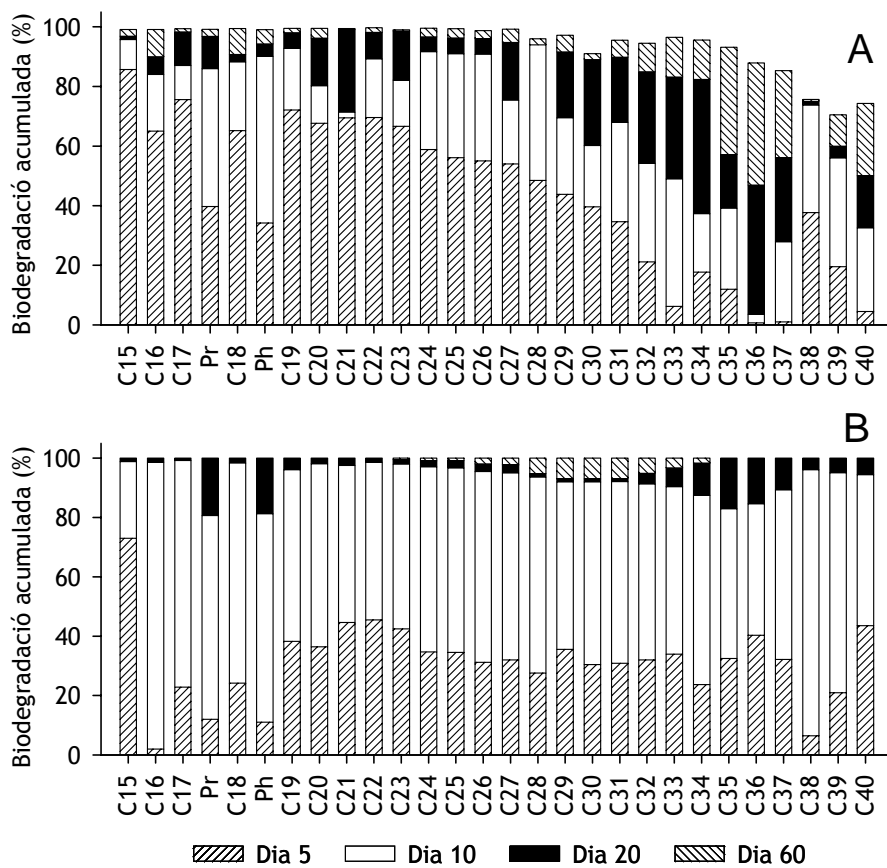


Figura 8.5. Biodegradació acumulada dels *n*-alcans en els experiments de biodegradació de fuel (A) i fuel fotooxidat (B)

En els microcosmos amb fuel fotooxidat també s'aprecien pèrdues en tots els alcans, si bé sembla que la biodegradació comença a ser efectiva a partir del dia 10. En qualsevol cas, queda palesa l'elevada capacitat de la microbiota autòctona que integra el consorci M81 per degradar de manera ràpida *n*-alcans quan es manté la concentració de nutrients.

Al final de l'experiment, en els microcosmos amb fuel fotooxidat s'han consumit tots els alcans lineals de fins a 40 carbonis i els isoprenoides pristà i fità, mentre que en els que contenen fuel original encara romanen els més pesants (>*n*-C30). En els reservats com a controls abiòtics, però, no s'observen diferències significatives respecte dels perfils inicials (exceptuant els compostos més lleugers (<*n*-C26).

La determinació de la semivida dels alcans en els dos experiments mostra que la fotooxidació n'accelera la biodegradació (taula 8.1), de manera que els més pesants desapareixen fins a 3 vegades més depressa que en el fuel original. Probablement la microbiota utilitza amb més facilitat hidrocarburs de cadena més llarga en el fuel fotooxidat perquè els més lleugers són menys abundants, en haver-se evaporat prèviament.

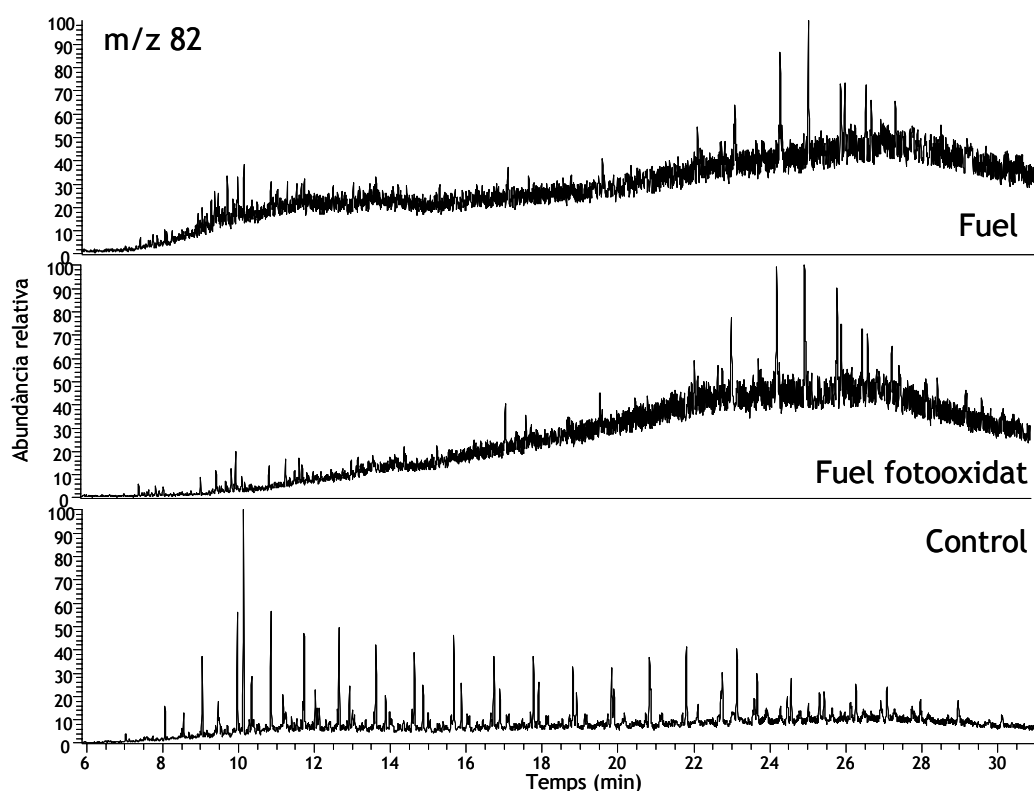
Taula 8.1. Semivides ($t_{1/2}$) dels *n*-alcans C25-C40 en els microcosmos amb fuel original i fuel fotooxidat i els percentatges de biodegradació als 60 dies d'incubació.

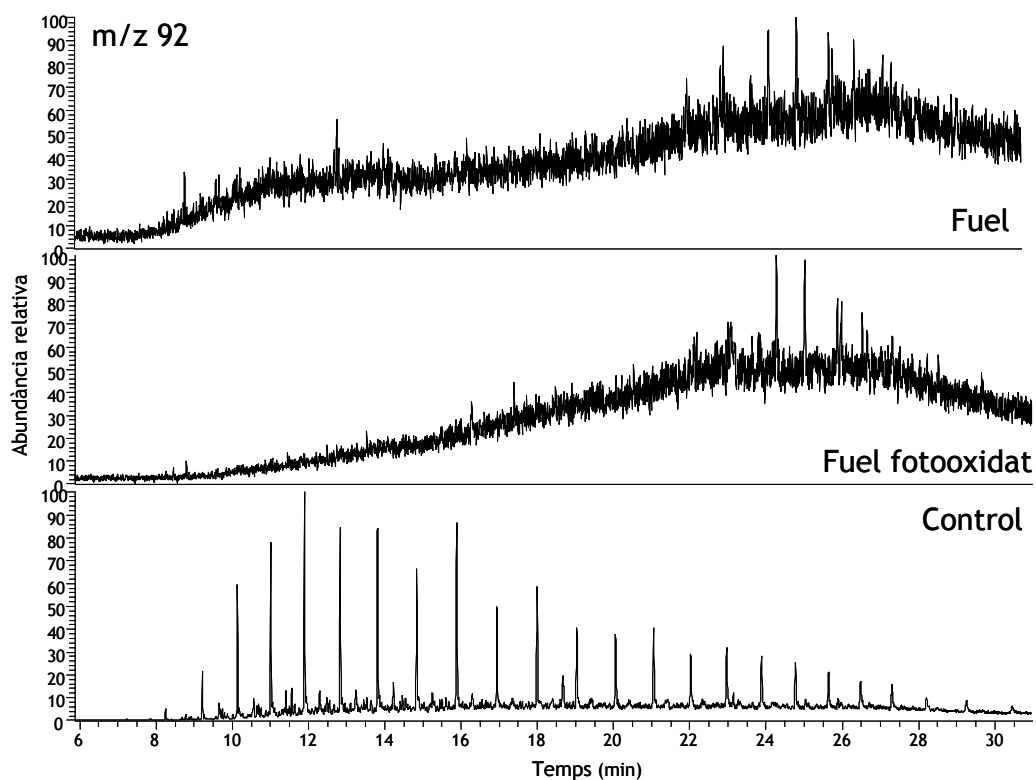
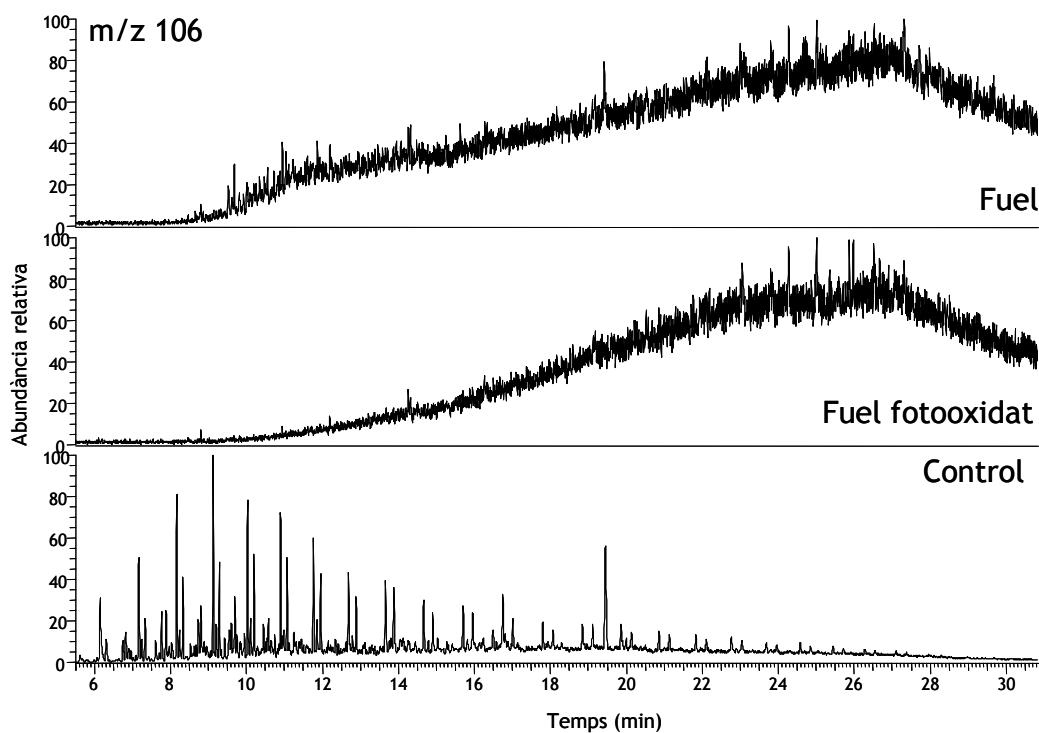
<i>n</i> -alcà	Fuel original			Fuel fotooxidat		
	$t_{1/2}$ (dies)	R ²	% eliminació	$t_{1/2}$ (dies)	R ²	% eliminació
C15	6,8	0,905	100	7,3	0,725	100
C16	6,3	0,948	100	6,1	0,684	100
C17	6,0	0,947	100	6,2	0,653	100
Pr	7,6	0,903	100	6,1	0,805	100
C18	9,0	0,934	100	5,8	0,717	100
Ph	9,6	0,880	100	5,6	0,796	100
C19	7,3	0,883	100	5,7	0,770	100
C20	8,4	0,914	100	5,6	0,735	100
C21	8,5	0,721	100	5,6	0,752	100
C22	7,9	0,876	100	5,7	0,721	100
C23	8,1	0,812	99	5,6	0,797	100
C24	8,2	0,877	100	5,5	0,862	100
C25	8,3	0,881	99	5,5	0,867	100
C26	8,3	0,886	99	5,4	0,919	100
C27	9,0	0,921	99	5,5	0,929	100
C28	9,0	0,811	98	5,5	0,952	100
C29	12,4	0,865	97	5,5	0,955	100
C30	13,2	0,848	96	5,6	0,955	100
C31	13,6	0,849	95	5,7	0,961	100
C32	14,5	0,891	95	5,8	0,962	100
C33	11,9	0,950	97	5,9	0,957	100
C34	12,4	0,938	96	5,8	0,923	100
C35	14,7	0,986	93	5,7	0,870	100

Taula 8.1. Continuació.

<i>n</i> -alcà	Fuel original			Fuel fotooxidat		
	$t_{1/2}$ (dies)	R^2	% eliminació	$t_{1/2}$ (dies)	R^2	% eliminació
C36	18,4	0,982	88	6,5	0,982	100
C37	21,2	0,839	80	7,1	0,885	100
C38	28,3	0,626	76	7,7	0,779	100
C39	33,8	0,636	71	8,3	0,799	100
C40	30,3	0,629	75	9,1	0,677	100

Pel que fa a les sèries de *n*-alquilderivats de cadena llarga (*n*-alquilociclohexans, alquilbenzens i alquiltoluens), es produeix una biodegradació extensiva i no s'observen diferències significatives en la biodegradabilitat causades per la fotooxidació (figures 8.6–8.8). Aquesta biodegradació podria atribuir-se a la presència, entre d'altres, dels gèneres *Parvibaculum* o *Alcanivorax*. En el cas de *Parvibaculum*, s'ha pogut demostrar que l'espècie *lavamentivorans* degrada alquilbenzens linials sulfonats (Dong et al., 2004; Schleheck et al., 2004), si bé no s'ha descrit biodegradació d'alquilbenzens. D'altra banda, el gènere *Alcanivorax* s'ha relacionat amb la biodegradació de *n*-alquilocicloalcanos o *n*-alquilbenzens (Dutta i Harayama, 2001).

Figura 8.6. Alquilocicloalcanos (m/z 82) de les mostres de fuel i fuel fotooxidat al dia 60 d'incubació.

Figura 8.7. Alquilbenzens (m/z 92) de les mostres de fuel i fuel fotooxidat al dia 60 d'incubació.Figura 8.8. Alquiltoluens (m/z 106) de les mostres de fuel i fuel fotooxidat al dia 60 d'incubació.

8.3. Fracció aromàtica

8.3.1. Efecte de la fotooxidació

A diferència de la fracció alifàtica, la fracció aromàtica es veu afectada notablement per la fotooxidació (figura 8.9), ja que els HAP són bons acceptors de la radiació solar. Aquest fet es reflecteix en els índexs que integren l'empremta digital del fuel (figures 8.10–8.12).

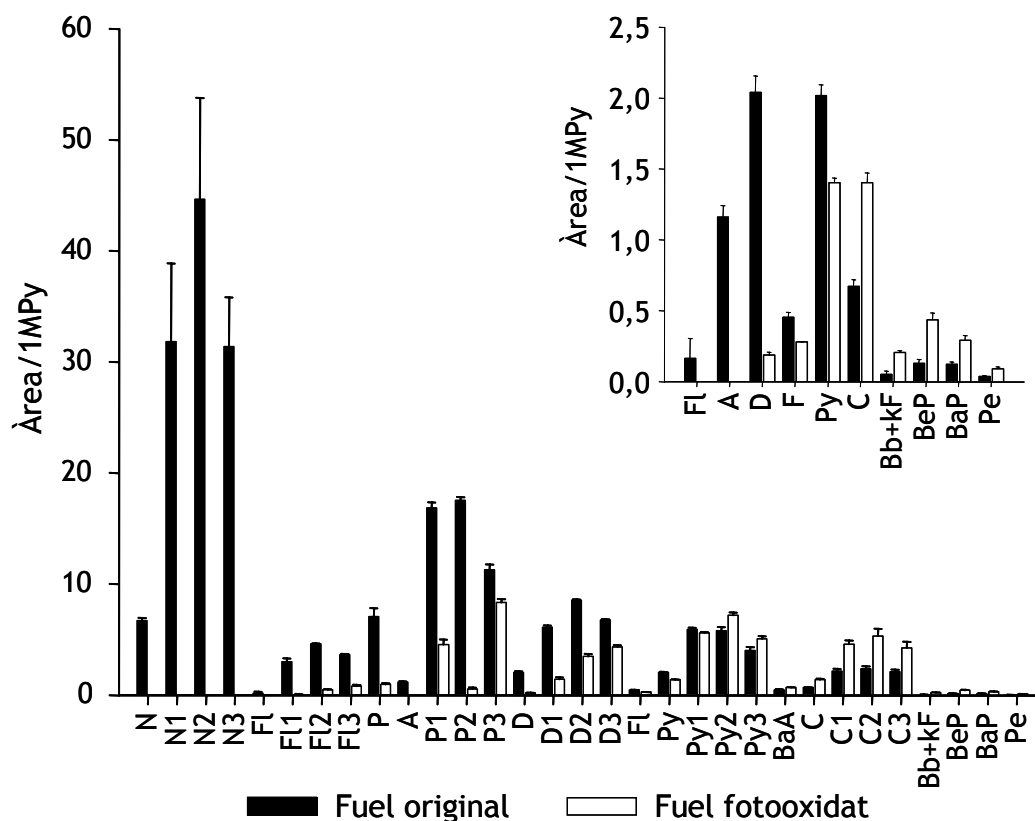


Figura 8.9. Distribució dels diferents hidrocarburs aromàtics policíclics respecte de l'1-metilpirè (1MPy) al fuel original i al fuel fotooxidat a l'inici de l'experiment.

Els canvis són significatius ($p < 0,001$ en el test U de Mann-Whitney) per a les relacions P2/C2, P3/C3, D2/P2, D3/P3 i D2/C2, D3/C3 (Figura 8.10) i D2/D3, P2/P3, Fl2/Fl3 (figura 8.11), per bé que en alguns casos (p. ex. P2/C2 o D2/C2) les pèrdues poden respondre tant a la fotooxidació del producte com a l'evaporació.

L'increment de les relacions D2/Fl2 i D3/Fl3 posa de manifest la major fotoresistència dels dibenzotiofens en relació als compostos no heteroatòmics. D'altra banda, l'estructura de la molècula també en determina la fotosensibilitat, com pot veure's a les relacions C2/Py2 i C3/Py3, que incrementen de forma significativa ($p < 0,001$), atenent a una major fotooxidació dels compostos pericondensats com el pirè, en comparació als catacondensats com el crisè (Prince et al., 2003). L'increment de la relació 1MP/MA també reflecteix la major fotoestabilitat del compost angular (fenantrè) respecte del linial (antracè).

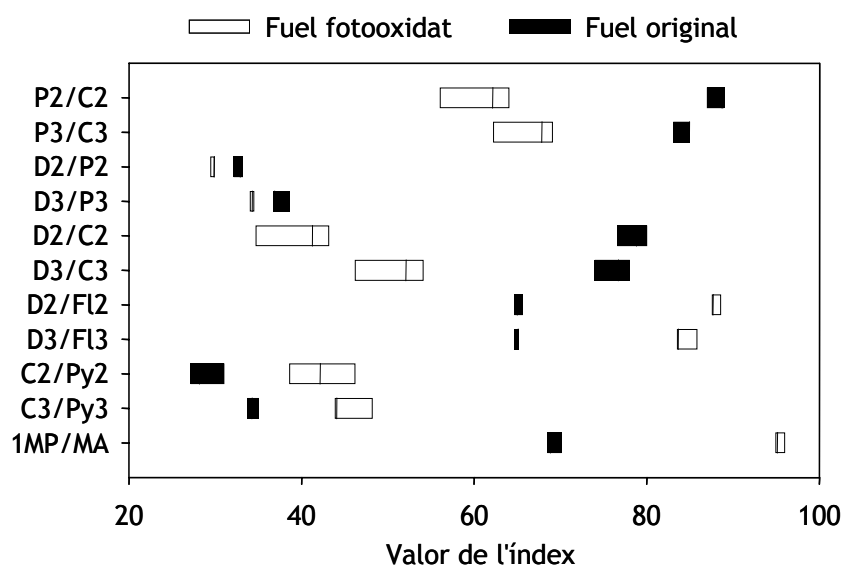


Figura 8.10. Diagrames de caixa (n=3) de diversos índexs calculats per al fuel original i el fuel fotooxidat. En tots els índexs les diferències observades són significatives ($p < 0,001$ en el test U de Mann-Whitney).

Un altre dels efectes de la fotooxidació que ja ha estat estudiat és la disminució de la fotoestabilitat amb l'augment del grau d'alquilació (Garrett et al., 1998; Ezra et al. 2000; Douglas et al., 2002; Prince et al., 2003), fenomen reflectit en l'increment de la relació C2/C3 (figura 8.11). Pel que fa als pirens, tant els dimetil com els trimetil es fotooxiden de manera extensiva. Així doncs, l'efecte de l'alquilació passa a un segon pla.

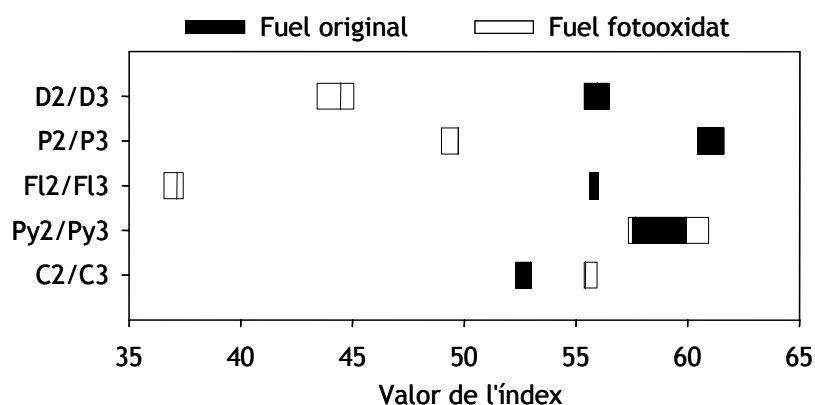


Figura 8.11. Diagrames de caixa (n=3) de diversos índexs calculats per al fuel original i el fuel fotooxidat, en què es pretén veure l'efecte del grau d'alquilació. En tots els índexs les diferències observades són significatives ($p < 0,001$ en el test U de Mann-Whitney), excepte la relació Py2/Py3 ($p > 0,05$).

Per últim, s'ha volgut avaluar la variació en la fotoestabilitat de les molècules atenent a la posició del substituent alquílic. Per això s'han calculat relacions basades en diversos isòmers de metilfenantrens (MP), metildibenzotiofens (MD) i metilpirens (MPy) (Figura 8.12). Els índexs mostren la major estabilitat dels isòmers 1-metilfenantrè, 1-metildibenzotiofè i 4-metilpirè.

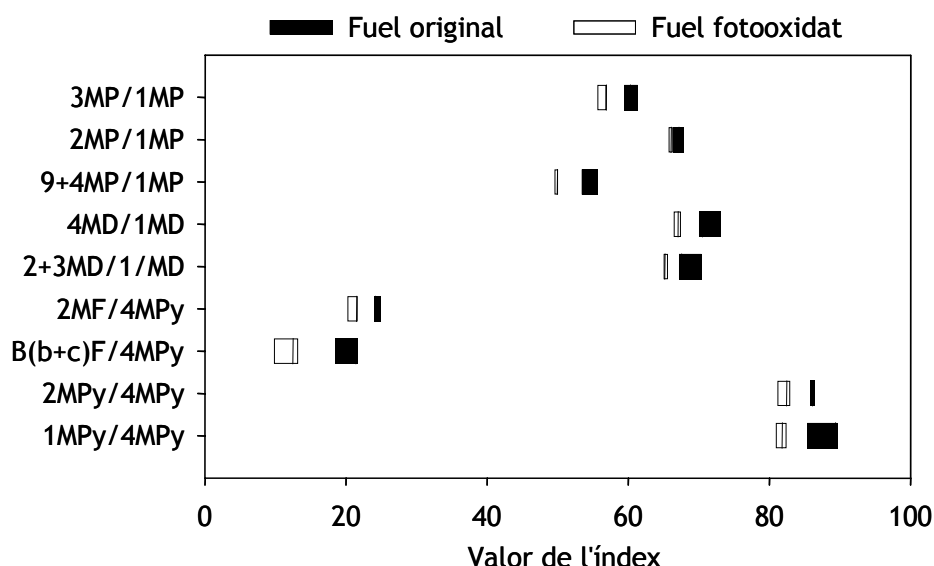


Figura 8.12. Diagrames de caixa ($n=3$) de diversos índexs calculats per al fuel original i el fuel fotooxidat, en què es pretén veure l'efecte de la posició del substituent alquílic. S'han observat diferències significatives ($p < 0,001$) per a tots els índexs excepte el 2MP/1MP ($p > 0,05$).

8.3.1. Efecte de la biodegradació

De manera similar als alcans, les concentracions dels HAP més lleugers han experimentat en el fuel original una forta davallada en els primers dies d'incubació (~78% de mitjana els alquilnaftalens, fenantrens i dibenzotiofens) (figura 8.13). En els microcosmos amb fuel fotooxidat les pèrdues són menors (~23% de mitjana els alquilfenantrens i dibenzotiofens), ja que les concentracions inicials són inferiors.

Un cop més s'evidencia la capacitat de la microbiota autòctona que integra el consorci per degradar hidrocarburs, en aquest cas aromàtics, la biodegradació dels quals podria relacionar-se amb diversos dels gèneres de bacteris presents, com ara *Lutibacterium*, *Citricella* o *Marinobacter*, entre d'altres (vegeu 6.1 i 6.3).

Al llarg de la cinètica, la biodegradació dels HAP segueix en ambdós tipus de microcosmos els patrons que ja s'han descrit anteriorment (vegeu 4.2.3 o 5.1.2). Ara bé, en el cas dels microcosmos amb fuel fotooxidat, la biodegradació dels més recalcitrants (crisens i HAP pentaaromàtics) augmenta, probablement a causa de la disminució en la disponibilitat dels compostos més fàcilment utilitzables.

Com en el cas dels alcans, al final de l'experiment (dia 60), en els microcosmos reservats com a controls abiòtics únicament s'observen diferències significatives en les sèries de compostos més lleugers (naftalens, dibenzotiofens i fenantrens).

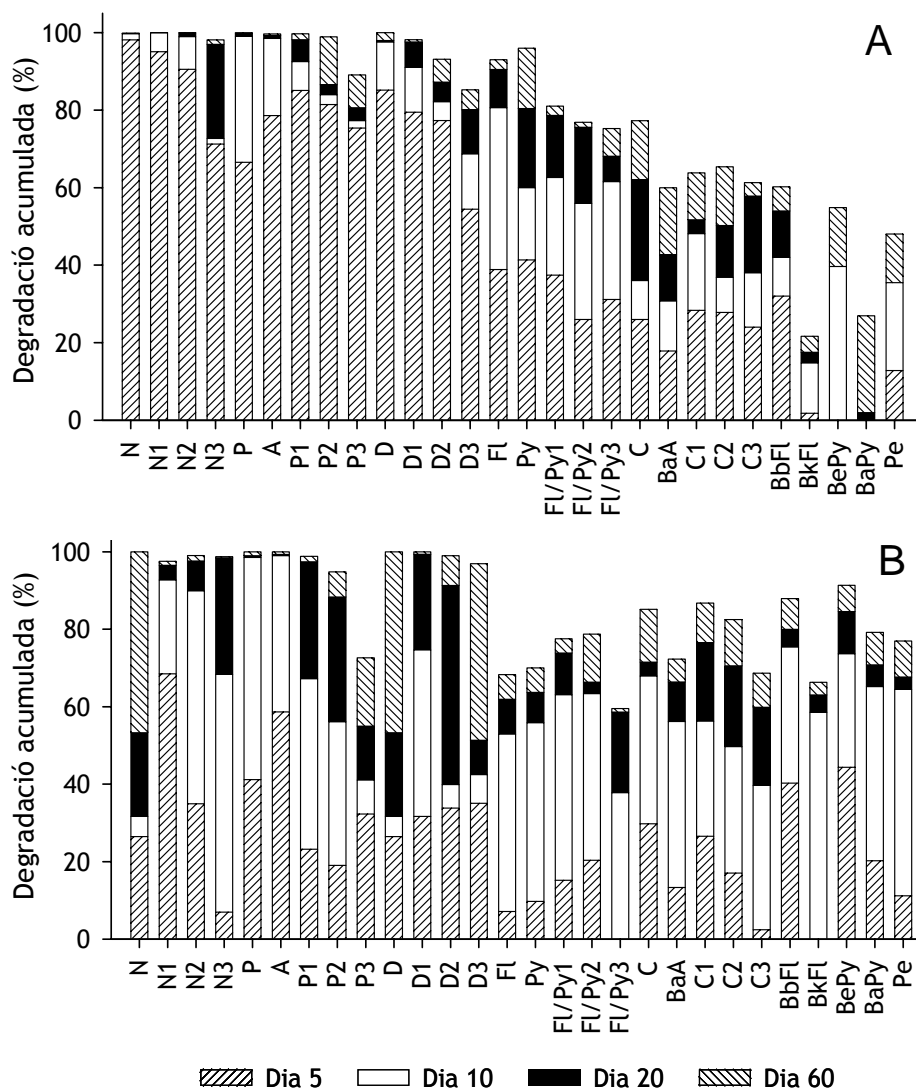


Figura 8.13. Biodegradació acumulada dels *n*-alcans en els experiments de biodegradació de fuel (A) i fuel fotooxidat (B)

La fotooxidació ha tingut dos efectes clarament diferenciats en la cinètica de biodegradació dels diversos HAP (taula 8.2). D'una banda, en el cas dels compostos més lleugers i amb menor grau d'alquilació, les semivides s'han mantingut en general dins els mateixos valors en els microcosmos amb fuel fotooxidat, fet que pot atribuir-se a la menor concentració d'aquests compostos en el fuel fotooxidat respecte de l'original.

Per contra, les semivides dels compostos més alquilats i de tota la sèrie dels crisis disminueixen de manera significativa, fet que indica un efecte sinèrgic d'ambdós processos.

Taula 8.2. Semivides ($t_{1/2}$) dels HAP en els microcosmos amb fuel original i fuel fotooxidat i els percentatges de biodegradació als 60 dies d'incubació.

HAP	Fuel original			Fuel fotooxidat		
	$t_{1/2}$ (dies)	R ²	% eliminació	$t_{1/2}$ (dies)	R ²	% eliminació
N	2,4	0,742	100	6,6	0,939	100
N1	6,1	0,525	100	6,4	0,690	100
N2	5,4	0,705	100	9,1	0,748	100
N3	8,2	0,649	93	6,7	0,709	99
P	6,0	0,642	100	3,6	0,878	100
A	9,0	0,599	100	3,8	0,885	100
P1	8,1	0,845	100	7,9	0,700	99
P2	11,0	0,891	99	13,9	0,897	95
P3	28,8	0,549	89	15,1	0,777	73
D	1,7	0,966	100	6,2	0,714	100
D1	13,0	0,618	98	5,8	0,872	100
D2	21,3	0,622	93	14,8	0,716	99
D3	27,4	0,662	85	17,3	0,810	97
FI	17,2	0,524	93	39,8	0,638	68
Py	18,4	0,498	96	38,7	0,628	70
Py1	29,6	0,637	81	31,4	0,611	78
Py2	30,0	0,525	77	31,2	0,693	79
Py3	38,3	0,597	75	47,5	0,612	60
BA	50,2	0,885	60	36,3	0,648	72
C	29,1	0,825	77	25,5	0,745	85
C1	50,6	0,716	64	24,2	0,698	87
C2	45,3	0,755	65	27,5	0,706	83
C3	53,3	0,662	61	36,9	0,757	69

Pel que fa als índexs de diagnòstic, al llarg de la cinètica de biodegradació les relacions entre C2 i C3-alkilfenantrens, crisens, dibenzotiofens i pirens han seguit tant en el fuel original com en el fotooxidat, les mateixes tendències observades al camp (vegeu 5.1.2) i anteriorment in vitro (Díez et al., 2005) a excepció de les relacions D2/P2 i D3/P3, que incrementen significativament, la qual cosa reflecteix una major preferència de la microbiota present al medi pels fenantrens respecte dels dibenzotiofens. La coexistència al camp dels processos de biodegradació i fotooxidació (que actuen en el cas dels dibenzotiofens i fenantrens de manera contrària) fa que les relacions D2/P2 i D3/P3 es mantinguin aproximadament estables.

Així mateix, dins les sèries de metilfenantrens, dibenzotiofens, metilpirens i crisens i de dimetilfenantrens i dibenzotiofens s'ha produït la mateixa preferència isomèrica: es biodegraden més fàcilment els compostos que tenen substituents β . A tall d'exemple, la figura 8.14 mostra la biodegradació dels metilpirens i crisens en el fuel original i fuel

fotooxidat. S'hi pot observar, també, la fotodegradació preferencial dels pirens respecte dels crisens.

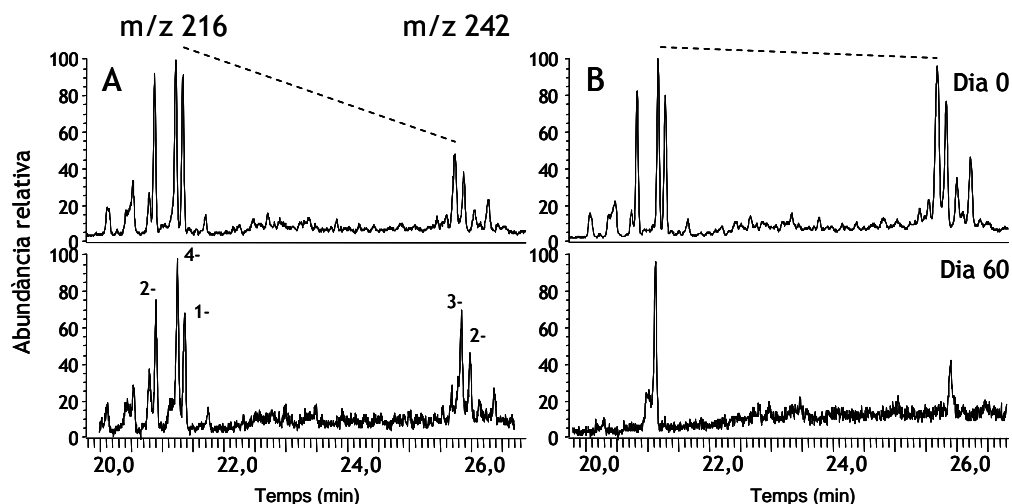


Figura 8.14. Evolució dels C1-pirens (m/z 216) i C1-crisens (m/z 242) del fuel original i el fuel fotooxidat. Cadascun dels pics es presenta a una escala relativa al pic més gran. Els números indiquen les posicions amb substituent (grup metil) a cadascun dels HAP.

8.4. Carbazols

Els carbazols són compostos aromàtics que presenten un àtom de N amb un parell d'electrons no compartit a la seva estructura (figura 8.15), fet que n'augmenta la fotosensibilitat. A més a més, també són susceptibles de ser biodegradats.

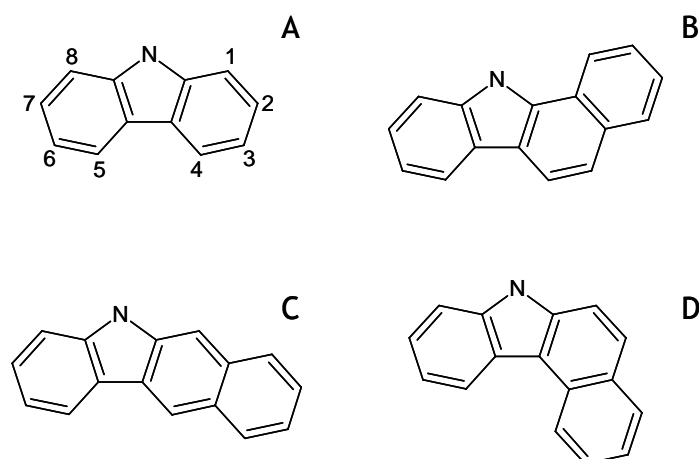


Figura 8.15. Estructura de diversos compostos de la família, en concret: A) carbazol; B) benzo[*a*]carbazol; C) benzo[*b*] carbazol i D) benzo[*c*]carbazol. Els nombres a A indiquen les posicions dels possibles substituents alquílics.

8.4.1. Efecte de la fotooxidació

Com es pot veure a la figura 8.16, en 12 hores d'exposició a $507,5 \text{ W m}^{-2}$ aquests compostos s'han fotooxidat extensivament (del 60% del trimetil al 90% del no alquilat). En el cas dels benzocarbazols la fotodegradació ha superat el 50%.

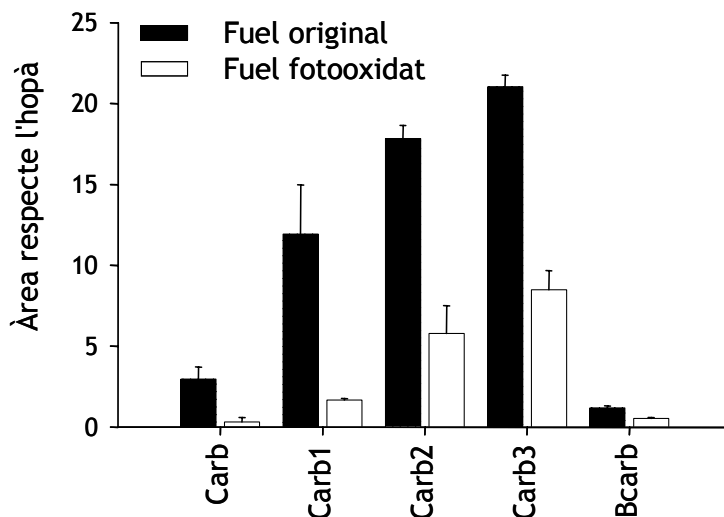


Figura 8.16. Distribució relativa dels carbazols i benzocarbazol respecte al $30\alpha\beta$ -hopà al llarg dels experiments de degradació de: A) fuel original i B) fuel fotooxidat.

També s'aprecien disminucions en els derivats amb més substituents (figura 8.17). Així com una reducció significativa del complex no resolt d'aquesta fracció, especialment la part més lleugera, que sí pot separar-se mitjançant la cromatografia bidimensional (figura 8.18).

8.4.2. Efecte de la biodegradació

Com en les fraccions anteriors, les concentracions en el fuel original han davallat significativament en 5 dies d'incubació (de més del 90% el carbazol al 50% els C3- o el 70% dels benzocarbazols) (figura 8.19). En els microcosmos amb fuel fotooxidat també hi ha hagut disminucions significatives en tots els compostos, si bé menors.

Al final de l'experiment, pràcticament han desaparegut tant en el fuel original com en el fotooxidat, a excepció dels trimetilcarbazols. L'acció conjunta dels dos processos permet degradar extensivament els components més alquilats (figura 8.17) i també suposa una reducció significativa del complex no resolt d'aquesta fracció (figura 8.18).

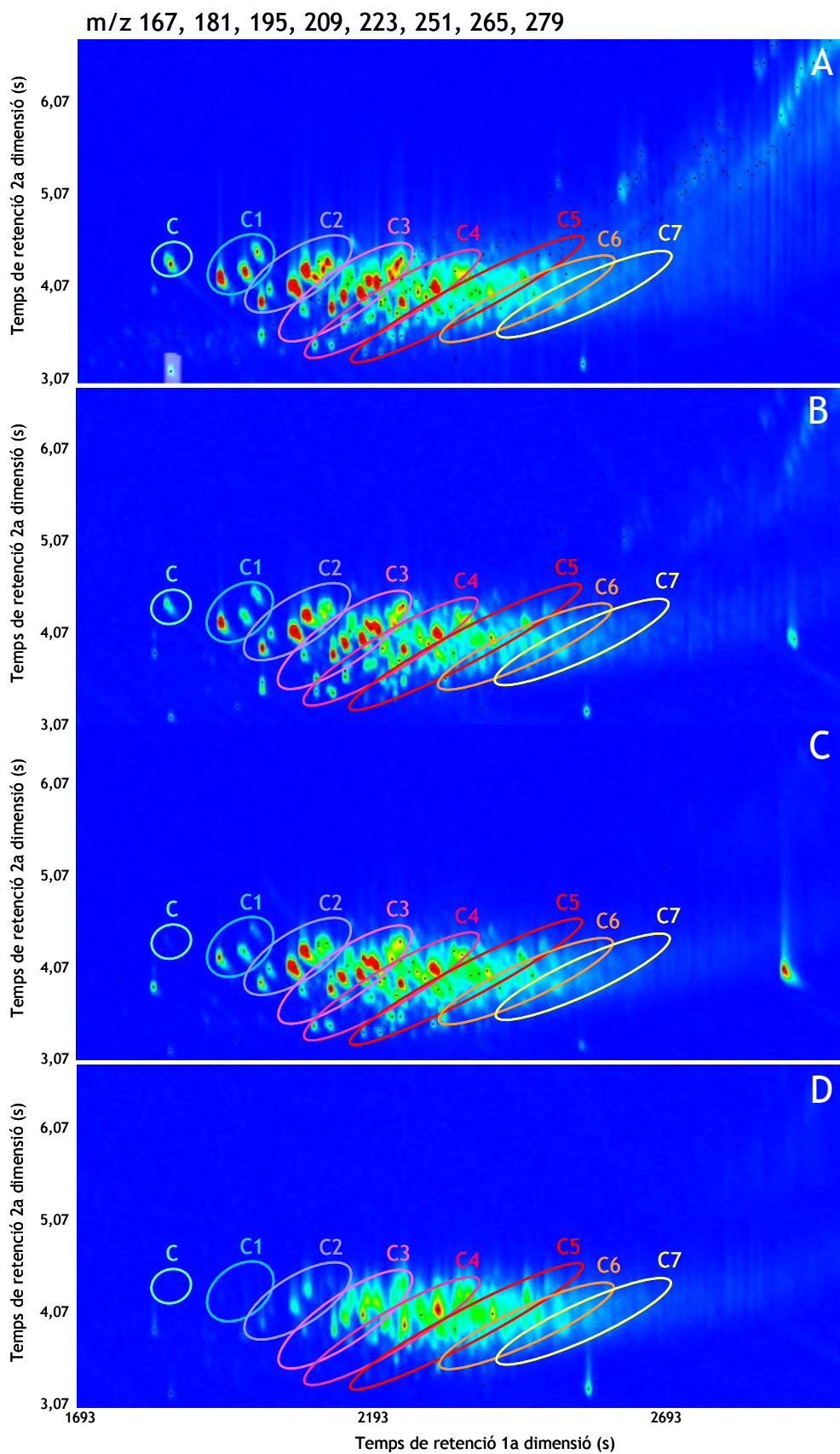


Figura 8.17. Mapa bidimensional (obtingut per GCxGC-ToF) de les traces iòniques dels carbazols (m/z 167-279) d'una mostra de: A) fuel original, B) fuel fotooxidat, C) fuel original als 10 dies de biodegradació i D) fuel fotooxidat als 10 dies de biodegradació. Els nombres mostren el grau d'alquilació. L'abundància relativa de cada compost segueix una escala cromàtica de vermell (més abundant) a blau-blanc (menys abundant).

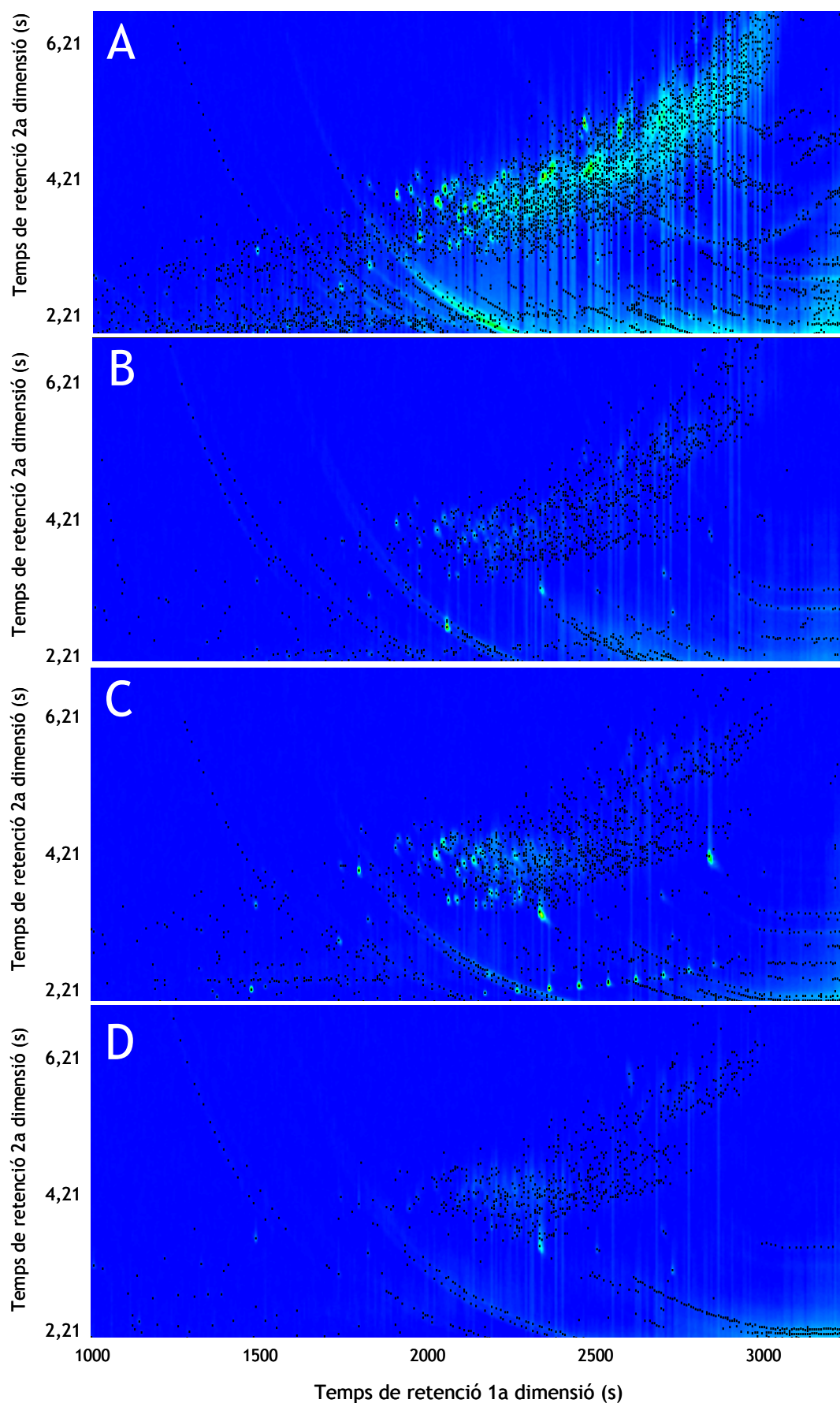


Figura 8.18. Mapa bidimensional de la fracció dels carbazols de: A) fuel original, B) fuel fotooxidat, C) fuel original als 10 dies de biodegradació i D) fuel fotooxidat als 10 dies de biodegradació. Cadascun dels punts negres representa un compost identificat amb el programa de processament de dades especificat.

Així mateix, s'aprecia una biodegradació isomeroespecífica dels compostos C1- i C2-, que ha estat descrita anteriorment a l'ambient (Clegg et al., 1998; Huang et al., 2003). Pel que fa als C1-, l'abundància relativa de l'1-metilcarbazol respecte del 4- decreix amb la biodegradació (figura 8.19), resultats que corroboren els descrits per Huang et al. (2003). Quant als C2-, l'isòmer 1,8 es degrada més ràpidament que la resta, tal com mostra la relació (1,8-DMC/DMC totals) (figura 8.19). Zhang et al. (1999) van suggerir que l'efecte pantalla dels substituents en determina el grau de degradació.

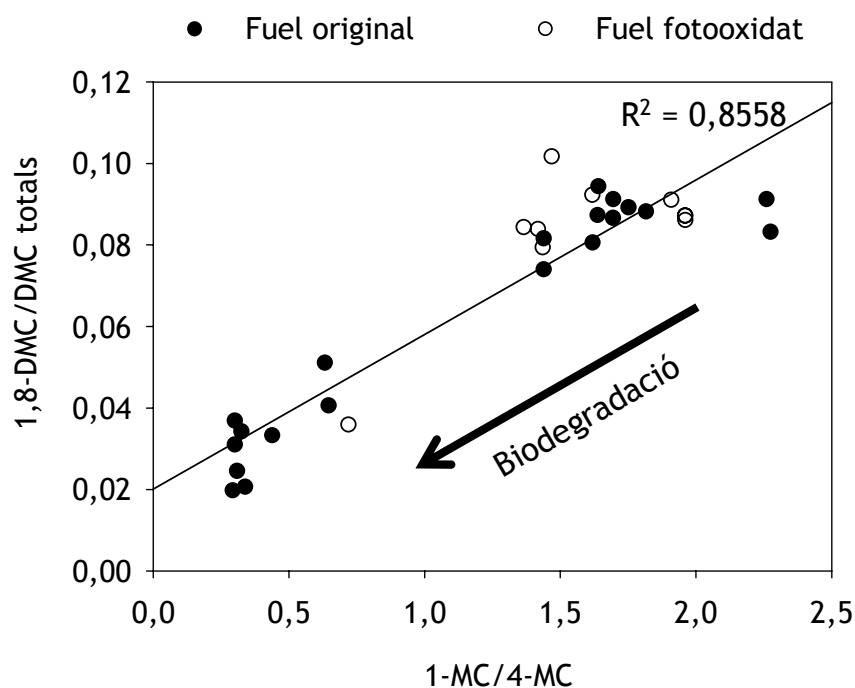


Figura 8.19. Diagrama de dispersió que mostra l'evolució de les relacions basades en isòmers de metilcarbazols (MC) i dimetilcarbazols (DMC) amb la biodegradació.

En el cas dels benzocarbazols l'isòmer benzo[*b*] (que presenta una conformació lineal, figura 8.15) és més recalcitrant que els altres dos (figura 8.20). De manera que poden usar-se aquests compostos com a bons indicadors de biodegradació. En estudis anteriors s'ha constatat que la relació benzo[*b*]/benzo[*c*] augmenta amb la maduresa del petroli (Li et al., 1997; Clegg et al., 1998; Bennett et al., 2002; Huang et al., 2003).

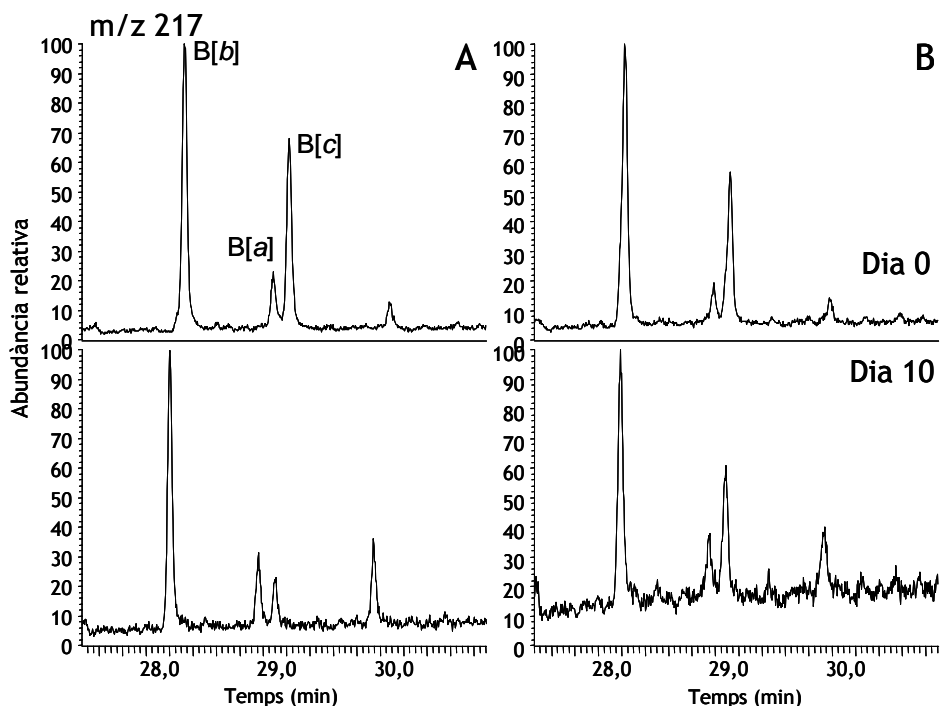


Figura 8.20. Evolució dels benzocarbazols (m/z 217) a l'inici de la incubació de: A) fuel original i B) fuel fotooxidat. Cadascun dels pics es presenta a una escala relativa al pic més gran.

Com en el cas dels alcans i alguns dels HAP, la fotooxidació accelera la degradació dels carbazols més alquilats: les semivides dels compostos di i trimetilats disminueixen gairebé 3 i 2 vegades, respectivament (taula 8.3). Per contra, no s'observen diferències significatives en els benzocarbazols.

Taula 8.3. Semivides ($t_{1/2}$) dels carbazols en les parcel·les control i fertilitzada i els percentatges de degradació als 60 dies d'incubació.

Compost	Fuel original			Fuel fotooxidat		
	$t_{1/2}$ (dies)	R^2	% eliminació	$t_{1/2}$ (dies)	R^2	% eliminació
Carb	6,3	0,686	100	9,9	0,810	100
Carb1	7,7	0,814	100	6,2	0,770	92
Carb2	11,0	0,663	97	4,5	0,858	94
Carb3	17,3	0,756	96	10,3	0,760	96
Bcarb	8,7	0,845	100	9,8	0,712	98

8.5. Resines

Les resines constitueixen la fracció més polar del petroli. Formades per un nucli aromàtic o naftenoaromàtic amb heteroàtoms i cadenes laterals, són, a diferència dels asfaltens, solubles en pentà o hexà (Tissot i Welte, 1984). Ambdós components són força recalcitrants i romanen al camp temps després que les fraccions més làbils hagin desaparegut. Amb tot, també són susceptibles als processos de degradació.

8.5.1. Efecte de la fotooxidació

Les resines es fototransformen amb la radiació solar (Tjessem et al., 1983; Boukir et al., 2001). Els canvis esdevinguts a l'estructura de la fracció s'han analitzat per FT-IR (figura 8.21).

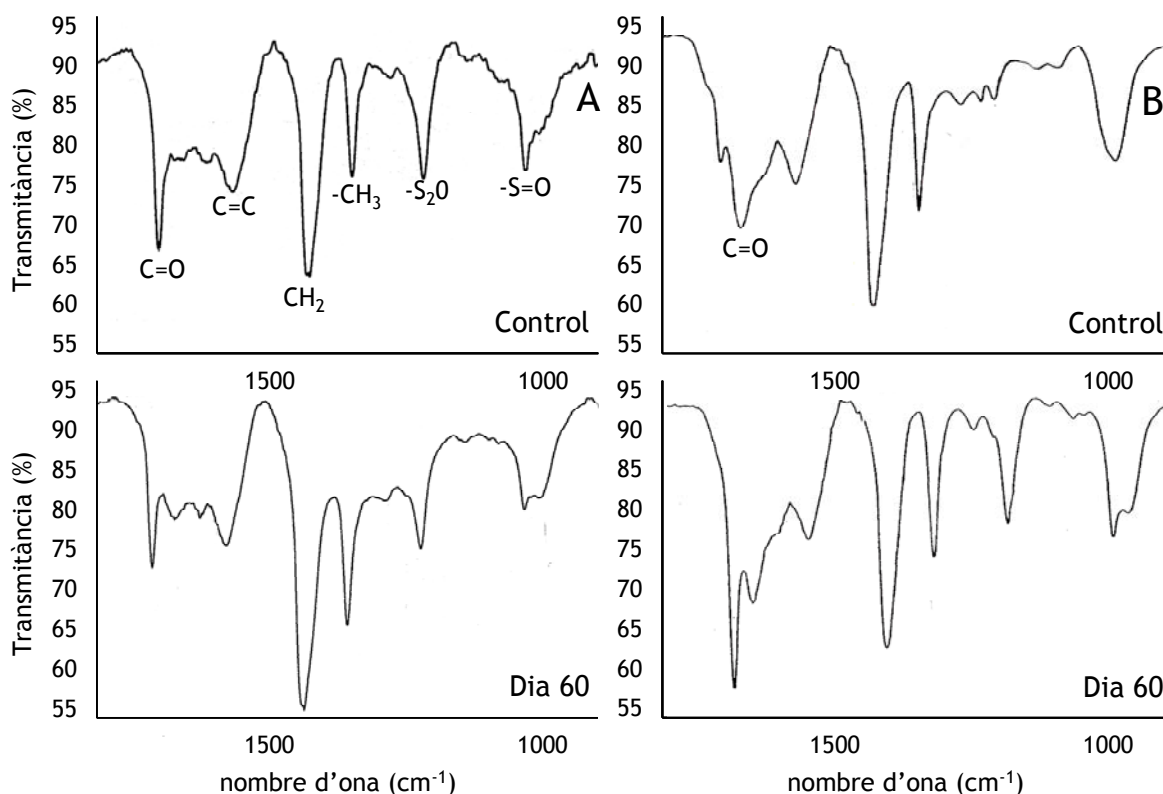


Figura 8.21. Espectre de FT-IR de les resines, de les mostres de A) fuel original i B) fuel fotooxidat, a l'inici de l'experiment i al dia 60 de biodegradació.

A la zona dels carbonils ($1.700\text{--}1.800\text{ cm}^{-1}$), s'observa una oxidació del grup aldehid ($1.740\text{--}1.720\text{ cm}^{-1}$) a carboxil ($1.725\text{--}1.700\text{ cm}^{-1}$) (Boukir et al., 2001). Així mateix, el senyal corresponent al grup sulfòxid ($\text{C}_2\text{S}=\text{O}$) (1.030 cm^{-1}) decreix, tot i que no s'aprecia un increment paral·lel del senyal a l'interval dels grups sulfònics ($1.200\text{--}1.300\text{ cm}^{-1}$), sinó una disminució, en contra del que Colthup i col·laboradors (1975) havien descrit.

No hi ha canvis significatius, en canvi, a la banda corresponent a la vibració d'estirament de l'enllaç $\text{C}=\text{C}$ (1.600 cm^{-1}), o a les bandes de les absorcions dels diferents grups metils ($1.450\text{--}1.370\text{ cm}^{-1}$).

L'anàlisi de la fracció derivatitzada per GCxGC-ToF (figura 8.22) mostra un increment considerable de les espècies polars, que apareixen a la part superior del mapa bidimensional (figura 8.23 B). Aquest fet podria ser degut tant a la formació de derivats oxidats de les pròpies resines com a la migració en aquesta fracció de compostos oxidats, i per tant més polars, de fraccions anteriors.

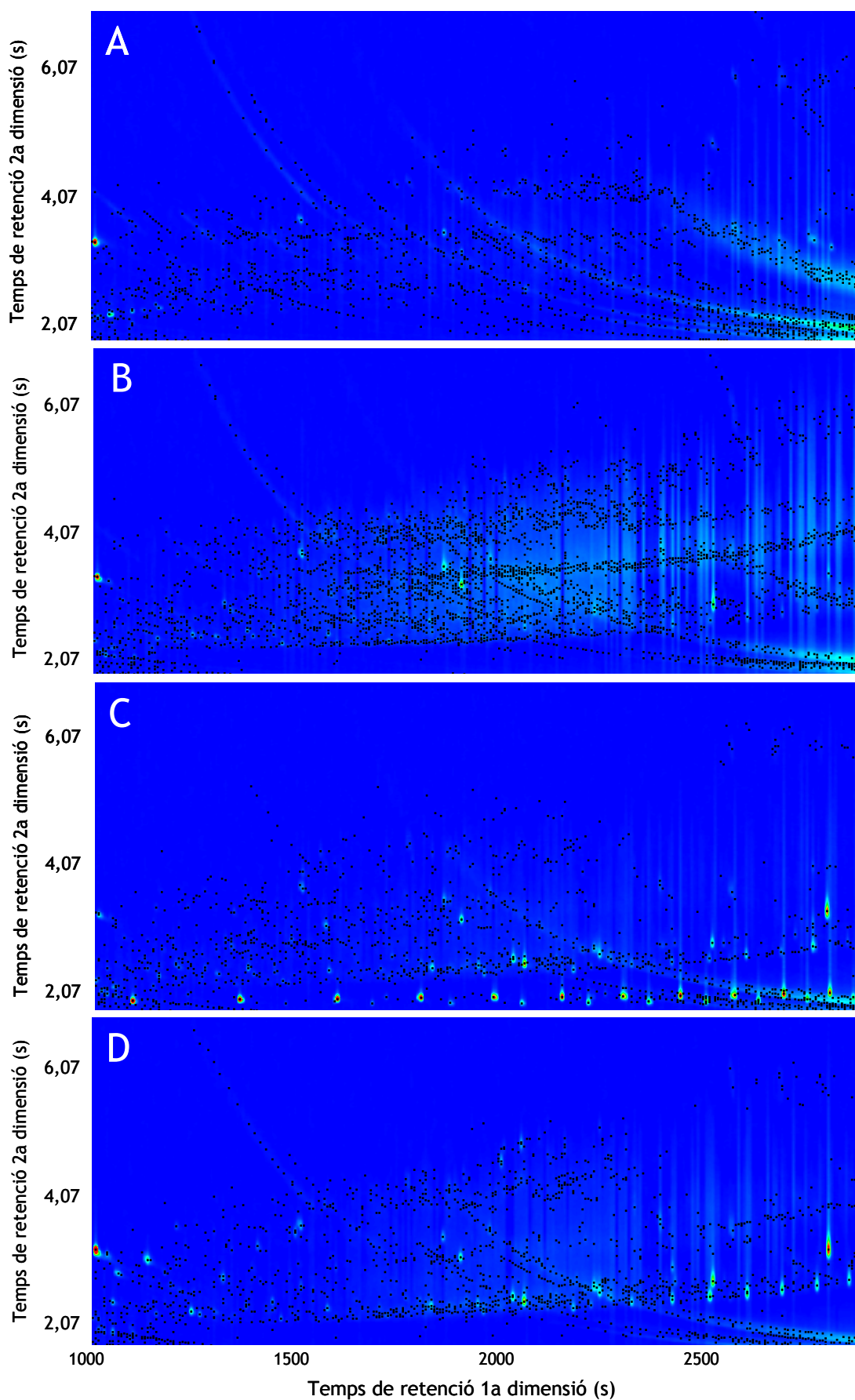


Figura 8.22. Mapa bidimensional de les resines d'una mostra de: A) fuel original, B) fuel fotooxidat, C) fuel original als 10 dies de biodegradació i D) fuel fotooxidat als 10 dies de biodegradació.

8.5.2. Efecte de la biodegradació

Tot i que l'anàlisi per TLC-FID no permet determinar si hi ha hagut biodegradació de les resines, se n'han descrit transformacions cometabòliques (Rontani et al., 1985). Així mateix, s'han trobat soques de *Pseudomonas* que semblen degradar-les quan es fan cultius amb resines i asfaltens com a font de carboni, en presència d'*n*-alcans lleugers (de 12 a 18 àtoms de carboni) (Austin et al., 1977; Atlas, 1981) o sense (Venkateswaran et al., 1995).

Més recentment, Jenisch-Anton et al. (2000) indicaren que les geomacromolècules són susceptibles a la biodegradació aeròbia i pot haver-hi canvis en els grups funcionals de les cadenes laterals. D'altra banda, Kim et al. (2009) detectaren canvis en els compostos heteroatòmics (NSO) per FT-ICR MS.

L'anàlisi per FT-IR (figura 8.21) permet identificar canvis durant la incubació tant en el fuel original com en el fotooxidat. En concret, en el fuel original la banda corresponent al carbonil del grup aldehyd ($\sim 1.740 \text{ cm}^{-1}$) disminueix. Per contra, en el fuel fotooxidat incrementa significativament. El mateix ocorre amb les bandes corresponents als grups sulfòxid (1.030 cm^{-1}) i sulfònics ($1.200\text{--}1.300 \text{ cm}^{-1}$).

D'altra banda, els mapes bidimensionals obtinguts per GCxGC-ToF (figura 8.22) mostren una disminució significativa en el nombre de substàncies presents tant en el fuel original com en el fuel fotooxidat. Aquests resultats suggereixen que l'acció conjunta d'ambdós processos (biodegradació i fotooxidació) pot incrementar la degradació del producte.

8.6. Conclusions

El procés de fotooxidació transforma de manera extensiva el fuel, principalment la fracció dels HAP, i genera compostos més polars que migren a la fracció de les resines. A més, aquest procés provoca canvis en la biodegradabilitat del producte resultant. Les taxes de biodegradació dels *n*-alcans, els HAP i els carbazols més pesants i més alquilats incrementen de manera significativa, però no hi ha efectes significatius en la biodegradació dels compostos més biodegradables i volàtils. La degradació del fuel augmenta amb l'acció conjunta dels dos processos.

Les relacions D2/D3 i P2/P3 així com les basades en isòmers de metilpirens o metildibenzotiofens poden ser, en general, bones indicadores d'envelliment, ja que ambdós processos de degradació les alteren en el mateix sentit. També són bones indicadores d'envelliment les basades en isòmers dels metil o dimetilcarbazols.

