



# Bioremediació d'un aqüífer contaminat per alquilbenzens


## Estratègies de bioestimulació i oxidació química i caracterització de les comunitats microbianes implicades

Eulàlia Martínez Pascual

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Eulàlia Martínez Pascual  
BIOREMEDIACIÓ  
D'UN AQUÍFER  
CONTAMINAT PER  
ALQUILBENZENS

Estratègies de bioestimulació  
i oxidació química i caracterització  
de les comunitats microbianes  
implicades.

Departament de Microbiologia. Facultat de Biologia.  
Universitat de Barcelona

# Bioremediació d'un aqüífer contaminat per alquilbenzens.

Estratègies de bioestimulació i oxidació química  
i caracterització de les comunitats microbianes  
implicades.

Memòria de tesi presentada per Eulàlia Martínez Pascual

Dirigida per:

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

Dr. Marc Viñas Canals Investigador  
Investigador IRTA  
GIRO Unitat mixta IRTA-UPC

Programa de doctorat: "Microbiologia Ambiental i Biotecnologia"  
Bienni 2006-2008



## Agraïments

En primer lloc, vull donar les gràcies a la persona que ha fet possible que estigui escrivint aquestes línies: gràcies Anna Maria, per acollir-me dins el grup, pel teu suport i la teva positivitat. Agraïxo també al Marc el seu entusiasme, per veure possibilitats i per obrir-me les portes del Giro en tot moment. En tercer lloc, he d'agrair també al Tim la possibilitat de treballar al grup de sòls, i confiar en el meu criteri i iniciativa.

Gràcies a tots els que han compartit el laboratori 5 amb mi, des dels inicis fins avui. Al costat Solanas, minoritari, al Salva, per haver-me ensenyat els primers passos al laboratori, la seva positivitat i per encomanar-nos la seva manera de veure la vida a través de cançons. A la Núria, per la seva paciència i ànims, i perquè sempre hi és quan la necessites, fins i tot a molts quilòmetres. No em puc oblidar tampoc de la Marina, la Cèlia, la Maggie o el Dàmir. I al costat Grifoll, el Quim i la Marga, per la seva ajuda, per fer-me passar bones estones i per prestar-me de tot en la nostra etapa de *pobres*. Gràcies també a la Sara, Daniela, Andrés, William, Naiara, Marta.. i tots els que han passat pel laboratori per formar part d'aquest laboratori.

Gràcies també als altres membres del departament, perquè sempre és agradable ser-hi, per les pràctiques compartides, els dinars... Al laboratori 2, per adoptar-me de vegades, pels préstecs i les respostes a preguntes (molts cops tontes). Especialment a la Silvia i l'Amanda, per tot el del departament i fora del departament.

Gràcies també a tots els del Giro, per haver-me tractat tant bé. Especialment l'Ana i l'Anna, per estar sempre disposades a donar un cop de mà, per ser tan i tan majísimes i perquè compartir laboratori i despatx amb vosaltres ha estat genial.

Gràcies també a la Georgina, per la seva energia i els seus esforços per fer-me entendre la velocitat de Darcy i a la Paula, que ha fet els mostrejos més fàcils.

I no puc oblidar tampoc els que van fer més fàcil la meua estada holandesa. Als meus companys de despatx, per fer d'aquella la millor "room" i pels miniborrelles; al Diego, per la seva gran ajuda logística. Al grup de sòls, especialment a la Nora, el Daniel i l'Erik, per acollir-me i fer les estones de laboratori més entretingudes amb les classes d'holandès (sense gaire resultats).

Gràcies també a tots aquells que m'heu acompanyat en aquests anys fora dels despatxos i poiates. A la Míriam, la Oli i la Laura per les grans estones i riures, passades i per passar. Als Gingko belover's/Team ub, i afegits, per les birres amb debat i perquè sempre comencem els anys amb tanta il·lusió. A les *petisui*. A la Laura i la Susan, per formar un equip fantàstic. A tots, per aguantar-me el rollo de la tesi, que sé que el deixo anar sovint (sobretot últimament!).

Gràcies a la meua família. A la meua família *extensa*, per ser tan caòtica, parlar alt, fer reunions d'escala i sempre assabentar-se misteriosament de tot, per fer-me passar tan bones estones. Als meus pares, pel suport incondicional, per estar sempre al meu costat i per tenir sempre bons consells. A la Mar, pels càntics variats i entendre'm i fer-me riure sempre. A tots, per estimar-me tant.

Per últim, gràcies Carlos. Per acompanyar-me durant tot aquest temps, per aguantar-me en els mals moments i per compartir i multiplicar els bons.

Aquesta tesi no hagués estat possible sense tots vosaltres. **Gràcies.**



*A la meva família*





# Continguts

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Contaminació dels aqüífers	3
1.2. Destí ambiental dels contaminants als aqüífers	5
1.3. Marc normatiu	7
1.4. LABs	9
1.5. Tècniques de descontaminació d'aqüífers	13
1.5.1. Tractaments in situ	14
1.5.1.1. Tractaments biològics in situ	14
1.5.1.2. Tractaments fisicoquímics in situ	14
1.5.1.3. Tractaments tèrmics in situ	15
1.5.2. Tècniques ex situ	16
1.5.2.1. Tractaments biològics ex situ	16
1.5.2.2. Tractaments fisicoquímics ex situ	16
1.5.3. Complementos per a la remediació	17
1.6. Biodegradació	21
1.6.1. Factors que condicionen la biodegradació	21
1.6.2. Avantatges i limitacions de la bioremediació in situ	29
1.6.3. Estratègies de millora	30
1.7. Oxidació química	31
1.8. Mètodes d'anàlisi de les comunitats microbianes	33
2. OBJECTIUS	39
3. MATERIAL I MÈTODES	43
3.1. Mètodes d'anàlisi química	45
3.1.1. Extracció de TPH	45
3.1.1.1. Líquid-líquid	45
3.1.1.2. Sòlid-líquid	45
3.1.1.2.1. Extracció Soxhlet	45
3.1.1.2.2. Microwave Assisted Extraction	45
3.1.2. Determinació cromatogràfica	46
3.1.2.1. GC-MS	46
3.1.2.2. GC-FID	46
3.1.3. Quantificació	46
3.1.4. Determinació de l'aromaticitat	47
3.1.5. Determinació de la biodisponibilitat	47
3.1.6. Anàlisi dels gasos de l'espai de cap	47
3.1.7. Determinació del pes sec i la matèria orgànica	48
3.1.8. Preparació del sòl	48
3.1.9. Set up de les columnes de sòl	48
3.1.10. Caracterització hidrodinàmica de les columnes de sòl	48
3.2. Mètodes microbiològics	49
3.2.1. Medis de cultiu i reactius	49
3.2.2. Recòmptes de microorganismes	50
3.2.3. Aïllament de microorganismes	50
3.2.4. Enriquiment in situ de poblacions microbianes en BioSeps	50
3.2.5. Extracció d'àcids nucleics	51

3.2.6.	Amplificació de gens 16S rRNA per PCR	51
3.2.7.	Estudi de les comunitats microbianes per DGGE	51
3.2.8.	Seqüenciació	53
3.2.9.	Quantificació per PCR quantitativa	54
3.2.10.	Anàlisi de comunitats microbianes per piroseqüenciació	57
3.3.	Estratègies experimentals	58
3.3.1.	Caracterització preliminar de l'emplaçament contaminat	58
3.3.2.	Assaig de degradació d'alquilbenzens lineals en condicions aeròbies a escala de laboratori	58
3.3.3.	Avaluació de la biodegradabilitat d'alquilbenzens lineals en diferents condicions redox	60
3.3.4.	Avaluació d'un sistema d'oxidació química acoblat a la bioremediació en reactors de tipus batch	61
3.3.5.	Avaluació de l'efecte de l'aplicació de MFR en columnes de sòl: afectació de les poblacions microbianes	63
3.3.6.	Caracterització microbiològica de les aigües subterrànies i diferents estratègies de bioremediació mitjançant la combinació de tècniques de cultiu, DGGE i bar-coded piroseqüenciació	65
4.	CHARACTERITZACIÓ PRELIMINAR DE L'EMPLAÇAMENT CONTAMINAT	67
4.1.	Descripció de l'emplaçament	69
4.2.	Caracterització hidrogeològica de l'aqüífer	69
4.3.	Caracterització química de l'aqüífer i condicions ambientals	69
4.4.	Caracterització de la contaminació	72
4.5.	Caracterització microbiològica	73
5.	ASSAIG DE DEGRADACIÓ IN VITRO D'ALQUILBENZENS LINEALS EN CONDICIONS AERÒBIES	79
5.1.	Biodegradació dels LABs per part del consorci TD	81
5.2.	Biodegradació dels LABs per part de la microbiota autòctona	82
5.3.	Evolució de la ràtio isomèrica	84
5.4.	Determinació de l'evolució de l'aromaticitat	87
5.5.	Estudi de la comunitat microbiana	89
5.5.1.	Enumeració de poblacions heteròtrofa i degradadora	89
5.5.2.	Anàlisi de l'estructura poblacional	89
5.6.	Assaig de degradació amb <i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	93
6.	AVALUACIÓ DE LA BIODEGRADABILITAT D'ALQUILBENZENS LINEALS EN DIFERENTS CONDICIONS REDOX	95
6.1.	Degradació en condicions aeròbies, desnitrificants i seqüencials aeròbies desnitrificants	97
6.2.	Evolució de la ràtio isomèrica	98
6.3.	Caracterització i dinàmica de la comunitat microbiana	99
6.3.1.	Quantificació per NMP	9
6.3.2.	Estudi de les comunitats microbianes per DGGE	101
6.3.2.1.	Evolució de la diversitat	108
6.3.3.	Quantificació de població total i gens funcionals	109
6.4.	Assaig de degradació amb <i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	112

7. AVALUACIÓ DE LA IMPLANTACIÓ D'UN SISTEMA D'OXIDACIÓ QUÍMICA ACOBLAT A LA BIOREMEDIACIÓ EN REACTORS DE TIPUS BATCH .....	115
7.1. Efectivitat degradadora dels oxidants i efectivitat global .....	118
7.2. Afectació de la fracció biodegradable .....	118
7.3. Recuperació de l'activitat metabòlica de les poblacions microbianes després del procés d'oxidació química .....	120
7.3.1. Respirometria .....	120
7.3.2. Anàlisi de les comunitats microbianes durant el procés de bioestimulació .....	121
7.3.3. Evolució quantitativa de les comunitats microbianes i gens funcionals .....	126
8. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DE L'APLICACIÓ DE MFR EN COLUMNES DE SÒL: AFECTACIÓ DE LES POBLACIONS MICROBIANES .....	131
8.1. Muntatge columnes .....	133
8.2. Colonització de les columnes de sòl per part de la microbiota de les aigües subterrànies .....	136
8.2.1. Estudi de l'evolució de la comunitat microbiana durant el procés de colonització de les columnes de sòl .....	136
8.3. Efecte de la MFR en l'activitat microbiana i l'eliminació de LABs en columnes de sòl .....	140
8.3.1. Degradació de LABs .....	140
8.3.2. Caracterització de les poblacions microbianes .....	142
8.3.2.1. Avaluació de l'activitat microbiana .....	142
8.3.2.2. Estudi de l'estructura de la comunitat microbiana .....	144
8.3.2.3. Quantificació de la població total i gens funcionals .....	154
8.4. Material complementari: colonització de les columnes de sòl .....	158
9. CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE LES AIGÜES SUBTERRANIES I DIFERENTS ESTRATÈGIES DE BIOREMEDIACIÓ MITJANÇANT LA COMBINACIÓ DE TÈCNiques DE CULTIU, DGGE I BAR-CODED PIROSEQUENCIACIÓ. ....	165
9.1. Aïllament de microorganismes .....	167
9.2. Anàlisi de les poblacions microbianes en perles BioSep .....	171
9.2.1. Avaluació de diferents mètodes d'extracció de DNA .....	171
9.2.2. Caracterització de la població microbiana .....	172
9.2.2.1. Quantificació de la població total i gens funcionals .....	172
9.2.2.2. Estructura de la comunitat microbiana .....	174
9.3. Anàlisi de la composició de la comunitat microbiana mitjançant piroseqüenciament .....	181
9.3.1. Gèneres principals .....	185
9.4. Avaluació dels diferents mètodes de caracterització microbiana .....	192
9.5. La comunitat microbiana com a indicadora dels processos de descontaminació .....	199
10. ACTUACIONS IN-SITU .....	201
10.1. Aplicabilitat dels resultats per a la presa de decisions i gestió a l'emplaçament .....	203
10.2. Actuacions in-situ .....	204
11. CONCLUSIONS .....	207
12. REFERÈNCIES .....	211



# Capítol 1

## Introducció



### 1.1. Contaminació dels aquífers

Un aquífer és una formació geològica en què s'emmagatzemen i circulen les aigües subterrànies aprofitant la porositat i la fissuració de la roca que les acull (Agència Catalana de l'Aigua).

A Catalunya les aigües subterrànies representen el 35% del total dels recursos hídrics utilitzats (Agència Catalana de l'Aigua), sent una font de gran importància per al subministrament d'aigua per la indústria i l'agricultura i en l'abastiment d'aigua potable. Actualment els recursos d'aigua subterrània disponibles s'estimen en uns 900 hm<sup>3</sup>/any, dels quals se n'aprofita tan sols una part (Agència Catalana de l'Aigua).

Les conques internes de Catalunya, on es concentren les poblacions més importants i amb més desenvolupament d'activitats industrials i turístiques, són les zones on es troba més aprofitament de les aigües subterrànies. Particularment, la façana litoral.

L'entrada de contaminants als sòls i aigües subterrànies va lligada tant a processos naturals com antropogènics. Aquests últims cada any alliberen al medi grans quantitats de compostos químics, tant orgànics com inorgànics. La contaminació de sòls i aigües és doncs una conseqüència habitual de les activitats humanes, especialment lligada en la majoria de casos a les activitats industrials (Ulrici 2008).

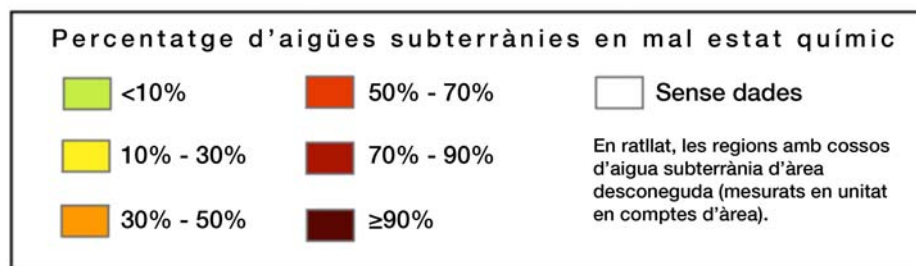
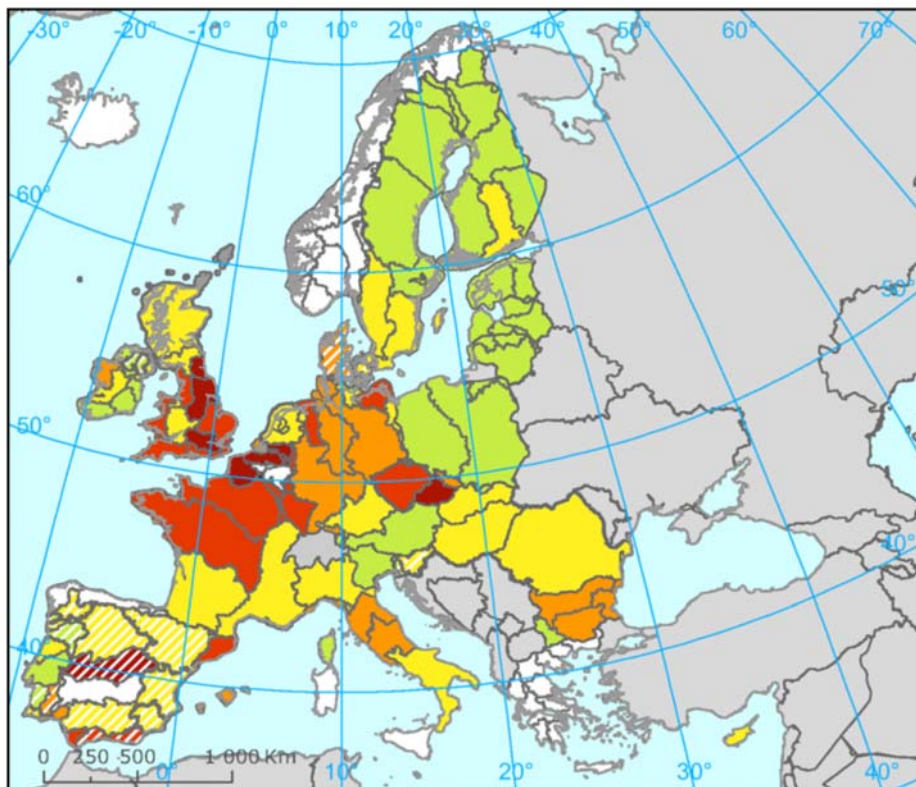
Les masses d'aigua en risc per contaminació d'origen industrial a Catalunya, així com els principals punts de contaminació d'origen industrial es poden veure a la figura 1.1.



**Figura 1.1.** Episodis de contaminació d'origen industrial a Catalunya. Font: Agència Catalana de l'Aigua.

La contaminació de les aigües subterrànies constitueix un problema d'abast global. A Catalunya s'estima que entre el 50 i el 70% de les masses d'aigua subterrània presenten problemes de contaminació (EEA Report No 8/2012) (figura 1.2).

**Figura 1.2.** Estat químic dels cossos d'aigua subterrània: percentatge d'aigües subterrànies que presenten contaminació química. Font: EEA Report No 8/2012.



Els riscos per a la salut humana i el medi ambient relacionats amb la contaminació de les aigües subterrànies depenen considerablement del contaminant específic, les condicions del lloc i la potencial exposició del receptor. Així doncs, cada cas ha de ser objecte d'una anàlisi individualitzada.

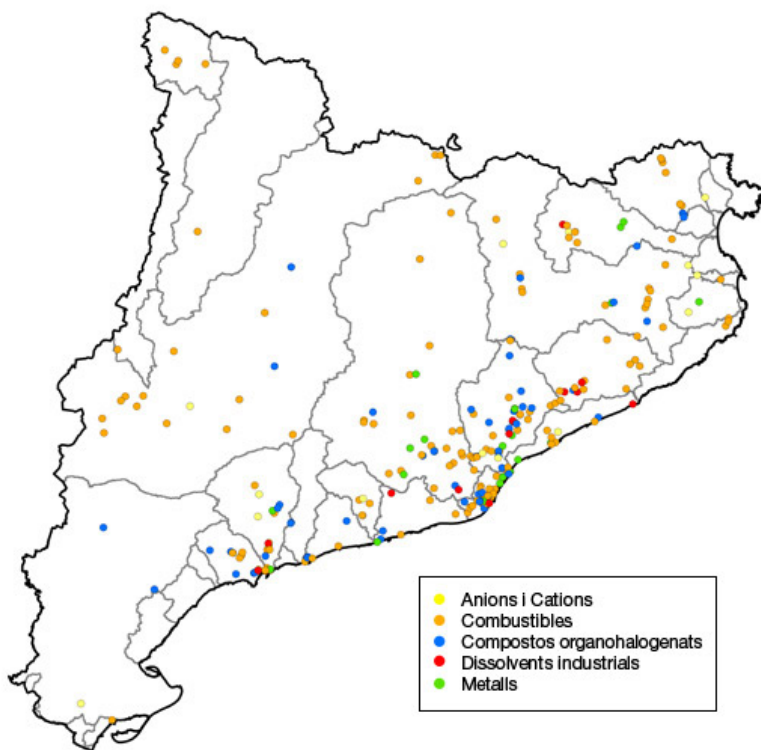
Els hidrocarburs derivats del petroli són també un dels principals contaminants de sòls i aigües subterrànies. Els hidrocarburs són compostos



químics d'ús habitual: productes com els combustibles, lubricants, dissolvents, pintures, asfalts, components farmacèutics i sabons estan elaborats completament o parcialment amb hidrocarburs derivats del petroli. Les fuites i accidents (provinents d'instal·lacions de producció, emmagatzematge, transport i distribució) constitueixen l'origen d'un elevat nombre de casos de contaminació puntual.

A Europa, els sòls i aigües subterrànies contaminats ho estan principalment per hidrocarburs (EEA Report No 8/2012). Els principals contaminants de sòls són els metalls pesats i olis minerals, mentre que en aigües subterrànies els contaminants més freqüents són els hidrocarburs clorats i olis minerals.

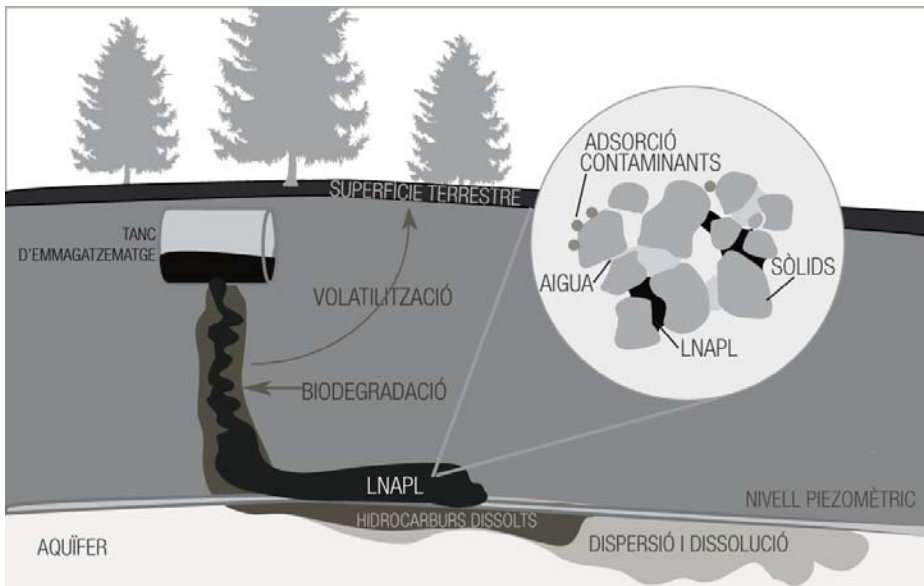
A Catalunya, la major part d'episodis de contaminació es deuen a combustibles, com es veu a la figura 1.3.



**Figura 1.3.** Episodis de Contaminació a Catalunya. Font: Agència Catalana de l'Aigua.

## 1.2. Destí ambiental dels contaminants als aqüífers

Al subsòl, les característiques fisicoquímiques de cada compost i la seva interacció amb l'entorn determinaran el seu destí i els processos d'alteració als que son sotmesos. El contaminant es distribueix entre les diverses fases de l'aqüífer: aquosa, sòlida (adsorbit al sòl) i gasosa, a cadascuna de les quals es sotmès a processos d'alteració (figura 1.4.).



**Figura 1.4.** Destí ambiental dels contaminants als aqüífers

En cas dels hidrocarburs i altres contaminants poc solubles, quan la quantitat de contaminant és prou elevada, es forma una quarta fase, la fase lliure (*Nonaqueous Phase Liquid*, NAPL), corresponent a l'hidrocarbure que es troba sense ser dissolt en l'aigua ni adsorbit al medi. Nombroses observacions en camp mostren que els NAPLs són sovint extremadament persistents, sobretot en les aigües subterrànies. (Alexander 1999).

Els hidrocarburs no clorats són menys densos que l'aigua, generant una fase lliure d'elevada viscositat anomenada LNAPL (*Light Nonaqueous Phase Liquid*). Quan es produeix una fuga o contaminació puntual, el LNAPL migra per gravetat cap avall, infiltrant-se al sòl fins a trobar una barrera física; un estrat de baixa permeabilitat o la superfície piezomètrica (làmina d'aigua). Un cop assolit aquest punt, el LNAPL s'expandeix al llarg de la superfície piezomètrica formant una capa damunt d'aquesta, que migra principalment en la direcció de màxim gradient hidràulic, tot i que és possible que es produeixi també migració lateral en altres direccions. Aquesta migració de la fase lliure forma un plomall de contaminació. L'aigua subterrània en contacte amb aquest LNAPL dissoldrà els components solubles generant un plomall de contaminant dissolt en la fase aquosa. Els LNAPL es converteixen doncs en una font contínua de contaminació dissolta.

La mescla de contaminants s'alterarà al llarg del temps per processos fisicoquímics i biològics, modificant la seva composició. Els processos de transformació i eliminació als quals es veuen sotmesos els contaminants són diversos, com es mostra a continuació.

Els processos de transformació no eliminen el contaminant, sinó que faciliten la reducció de les concentracions però no la massa total. Aquests processos inclouen l'advecció, la difusió per gradient de concentració, la volatilització, la dispersió i la sorció en la matriu de sòl.

El procés d'advecció és el transport pel moviment de les aigües subterrànies, sent el paràmetre clau en el transport de contaminants en aigües subterrànies. La dispersió hidrodinàmica té l'origen en processos de dispersió mecànica i en la interacció entre advecció i matriu porosa del sòl. La massa de contaminants s'estén tant en la mateixa direcció del flux com transversalment, provocant l'allunyament dels contaminants de la línia central del plomall.

La difusió es produeix a causa dels gradients de concentració dels contaminants a les aigües. Tot i que és negligible en alguns casos, pren importància en sistemes amb velocitats de transport d'aigües subterrànies molt baixes.

El resultat d'aquests processos (difusió, advecció i dispersió) és l'expansió del plomall afectant aigües no contaminades en origen, provocant la dilució dels contaminants.

La volatilització o evaporació depèn de les propietats fisicoquímiques del contaminant (pressió de vapor), i en menor mesura de la saturació a la capa frontera, la temperatura, la profunditat del nivell freàtic o el tipus de matriu sòlida de l'aquífer. Sol ser un procés important en plomalls recents, reduint-se al llarg del temps amb la desaparició de les fraccions més volàtils.

La sorció és la retenció a la fase sòlida, mitjançant absorció o adsorció, reduint la mobilitat i disponibilitat del contaminant. Aquesta reducció de disponibilitat també afecta a altres processos d'atenuació, com la volatilització o la biodegradació.

Entre els processos d'eliminació existeixen els processos químics i biològics. Les reaccions químiques abiòtiques es produeixen sense microorganismes ni enzims extra moleculars. Les més comuns són la hidròlisi, la substitució i les reaccions oxidació-reducció.

La biodegradació és la transformació o alteració dels contaminants mitjançant processos d'oxidació-reducció mediat per enzims. Aquestes reaccions poden ser tan de tipus aerobi com anaerobi, en funció de l'acceptor final d'electrons disponible i usat al medi ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Mn$ ).

### **1.3. Marc normatiu**

#### **1.3.1. Normativa europea**

Dins el marc normatiu europeu, en matèria d'aigües subterrànies, es poden destacar les directives 2000/60/CE i 2006/118/CE.

La directiva 2000/60/CE o Directiva Marc de l'Aigua (DMA) estableix un marc comunitari d'actuació en la política d'aigües de la Comunitat Europea. La DMA té com a objectiu garantir la qualitat i la quantitat dels sistemes aquàtics a través d'un ús sostenible de l'aigua. Organitza la gestió dels recursos hídrics superficials, continentals, de transició, costers i subterrànies amb la finalitat de prevenir i reduir la contaminació, fomentar el seu ús sostenible, protegir el medi aquàtic i millorar la situació dels ecosistemes. La pròpia directiva estableix un propòsit ambiental clar per l'any 2015: haver assolit el bon estat dels sistemes aquàtics de tots els països de la Unió Europea. En el cas de les aigües subterrànies, aquest objectiu implica recuperar-ne el bon estat químic i quantitatiu.

D'altra banda la directiva 2006/118/CE, relativa a la protecció de les aigües subterrànies contra la contaminació i el deteriorament, estableix un marc de prevenció i control de la contaminació de les aigües subterrànies, incloent tant mesures d'avaluació de l'estat químic de les aigües com mesures per reduir la presència de contaminants. En aquest context destaca l'establiment de llimdars de concentració per a contaminants associats principalment a contaminacions difoses (nitrats i pesticides), mentre que la resta de contaminants han de ser normats a nivell de cada estat membre.

### **1.3.2. Normativa estatal**

La normativa estatal aplicable en la gestió de la contaminació d'aigües subterrànies comprèn la Ley de aguas (Ley 29/1985), el Reglamento del dominio público hidráulico (Real Decreto 849/1986), el Real Decreto de Suelos contaminados (9/2005) i la Ley de Responsabilidad medioambiental (26/2007).

La Ley de aguas (Ley 29/1985), modificada pel Real Decreto Legislativo 1/2001, estableix les bases del marc legal estatal en gestió d'aigües. Entre els seus principis bàsics destaquen el caràcter públic de les aigües, la planificació hidrològica com instrument d'ordenació i els organismes de conca. Aquesta llei contempla les indemnitzacions per danys i perjudicis al domini públic hidràulic. Amb independència de les sancions imposades, s'estableix la necessitat d'obligar als infractors a reparar els danys i perjudicis, i reposar les coses al seu estat anterior (Article 110, Ley de Aguas)

El Reglamento del Dominio Público Hidráulico (Real Decreto 849/1986), modificat pel Real Decreto 9/2008, tracta en un dels seus apartats (Article 257) els abocaments de les substàncies perilloses a les aigües subterrànies. S'obliga a evitar o limitar la introducció de les substàncies llistades a les aigües subterrànies segons la seva classificació (compostos organohalogenats, mercuri, cadmi, olis minerals i hidrocarburs d'origen petrolífer persistents, etc. s'han d'eliminar, mentre que productes com zinc, coure, estany, compostos organosilícics, amoníac, nitrats, etc. s'han de limitar), a més de l'obligatorietat de garantir que els abocaments no afectin altres sistemes aquàtics.

Amb l'entrada en vigor del Reial Decret 9/2005 s'estableix la relació d'activitats potencialment contaminants del sòl i els criteris i estàndards per a la declaració de sòls contaminats. Amb aquest marc s'inicia, doncs, un procés obligatori de revisió i gestió de la qualitat del sòl, i per tant del medi subterrani, als emplaçaments on s'hi ubiquen o s'hi han ubicat activitats industrials atenent a llur potencial contaminador. Per declarar que un sòl està contaminat, és necessari demostrar que els compostos químics presents impliquen un risc inacceptable per l'ús del sòl. El risc es defineix aleshores com la probabilitat que un contaminant entri en contacte amb algun receptor provocant conseqüències adverses per la salut humana o el medi ambient. En cas que hi hagi evidències o indicis de contaminació de les aigües subterrànies, caldrà comunicar-ho a l'administració hidràulica competent, encarregada de llur gestió i avaluació.

Finalment, a la llei de Responsabilitat Ambiental (26/2007) defineix els operadors de les activitats econòmiques potencialment contaminants com a responsables dels (potencials) danys ambientals, essent obligats a adoptar i executar les mesures de prevenció, evitació i reparació dels danys quan en siguin

responsables (Article 9), assegurant alhora una previsió econòmica per a fer front a potencials despeses de reparació. En cas que aquests danys es produeixin, a més d'estar obligat a reparar-ho, ha de posar-ho en coneixement de les autoritats competents.

Aquest marc normatiu atorga a les administracions competents la competència de vigilància i gestió d'expedients (gestió administrativa), així com la capacitat sancionadora. Paral·lelament, defineix els rols de causant i responsable de la contaminació, obligant a reparar el dany d'acord al principi de *qui contamina paga*.

### **1.3.3. Normativa autonòmica**

L'Ordenació del domini públic hidràulic defineix les competències relacionades amb la gestió de les aigües. En el nostre entorn, l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA) té competències plenes en el cicle integral de l'aigua de les conques internes de Catalunya, i competències compartides amb la Confederació Hidrogràfica de l'Ebre en el cas de la conca de l'Ebre.

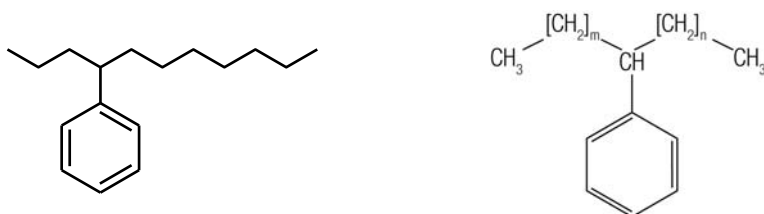
Entre les competències reconegudes, es troba en primer lloc la intervenció administrativa de les aigües subterrànies i superficials, i dels abocaments que puguin afectar aquestes o les aigües marines. També instruir i formular les propostes de resolució en expedients sancionadors per infracció. Finalment, també és competència de l'ACA executar les mesures destinades a la restitució o indemnització de danys causats en el domini públic hidràulic.

En el cas dels casos de contaminació d'origen puntual a Catalunya, i per a homogeneïtzar-ne els criteris de gestió, l'ACA utilitza com a criteri els valors recollits a la guia *Valors genèrics per a la restauració d'aigües subterrànies en emplaçaments contaminats per fonts d'origen puntual*, que proporciona els valors genèrics de no-risc i els valors genèrics d'intervenció de diversos contaminants. Aquests valors són obtinguts mitjançant la metodologia d'anàlisi de risc, definida per a uns usos específics de l'aigua i representatius de l'entorn, i aplicant-ne una anàlisi de sensibilitat per als paràmetres que presenten major incertesa. A partir dels valors de càlcul obtinguts, es deriven els valors genèrics per a cada contaminant, nivells de referència per determinar la necessitat d'actuació en cada cas concret (Agència Catalana de l'Aigua).

## **1.4. Alquilbenzens de cadena lineal (linear alkylbenzenes, LABs)**

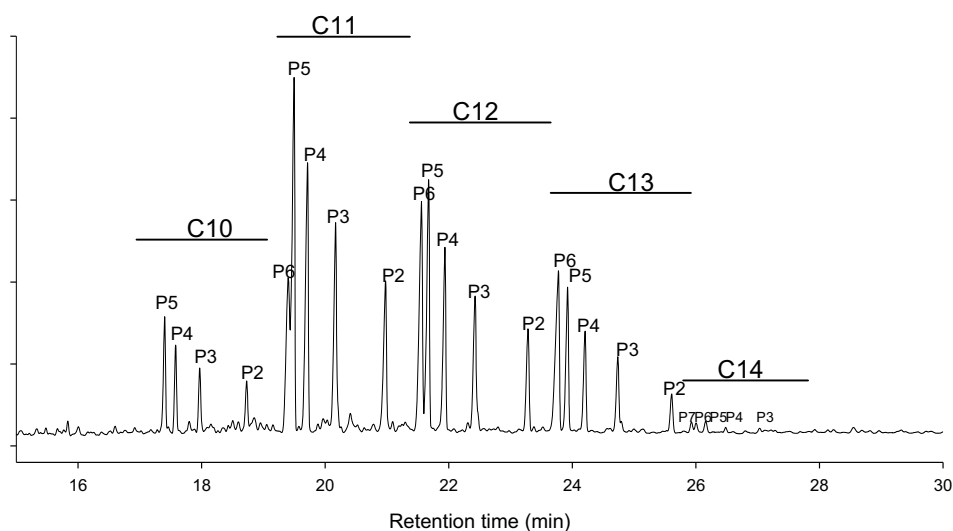
### **1.4.1. Estructura química**

L'estructura química dels alquilbenzens es pot veure a la figura 1.5. El producte pot ser visualitzat com una cadena alquílica d'entre 10 i 14 carbonis amb un sol grup fenil adjunt en algun punt de la cadena.



**Figura 1.5.** Estructura general dels LABs ( $m, n = 0$  a  $7$  i  $m+n = 7$  a  $11$ )

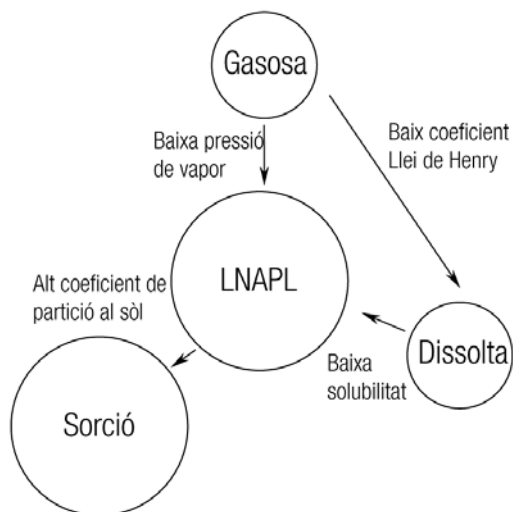
És destacable que, al contrari que els compostos del grup BTEX, els isòmers terminals no es troben en els LABs comercials. Aquest fenomen és degut a l'existència d'un producte inestable energèticament durant la producció (Swisher, Kaelble et al. 1961). El perfil cromatogràfic d'una barreja de LABs comercials es pot veure a la figura 1.6.



**Figura 1.6.** Perfil cromatogràfic d'una barreja comercial d'hidrocarburs que comprèn de  $C_{10}$  a  $C_{14}$ , i amb isòmers a partir de la posició 2.

#### 1.4.2. Propietats

Les propietats fisicoquímiques dels LABs (taula 1.1.) condicionen el seu comportament i el seu destí quan actuen com a contaminants. La pressió de vapor baixa, l'alt valor tant del coeficient de la llei de Henry, com del coeficient octanol-aigua ( $K_{ow}$ ) fan que els LABs siguin un producte amb tendència a quedar absorbit al sòl, amb baixa solubilitat en aigua. Aquesta baixa solubilitat afecta també a la biodegradació del producte, donat que aquesta es produeix principalment en la fracció aquosa. La partició dels LABs en les diverses matrius ambientals es pot veure a la figura 1.7.



**Figura 1.7.** Partició dels alquilbenzens lineals al sòl (no a escala). Les fletxes indiquen la partició preferencial, d'acord amb els valors de les constants. Adaptació de Johnson (2003).

**Taula 1.1.** Propietats físiques dels alquilbenzens lineals (C<sub>12</sub>) (LABs). Font: Adaptat de Johnson (2003)

Propietat	Valor
Densitat (20°C)	0.86 kg/L <sup>(1)</sup>
Punt d'ebullició	72'6 °C <sup>(1)</sup>
Viscositat a 20°C	8.1 mm <sup>2</sup> /s <sup>(1)</sup>
Punt d'inflamació	150 °C <sup>(1)</sup>
Solubilitat en aigua	Immiscible, <0.01mg/L <sup>(1)</sup> 0.41 mg/L <sup>(2)</sup> 4-7 nmol/L <sup>(3)</sup>
Pressió de vapor a 25°C	4.9 x 10 <sup>-4</sup> mmHg <sup>(2)</sup> 0.038 – 0.067 Pa <sup>(3)</sup>
Constant de la Llei de Henry	7.1 x 10 <sup>2</sup> torr.L/mol <sup>(2)</sup>
Koc	2.2 x 10 <sup>4(2)</sup>
Kow	5.72 – 5.75 <sup>(2)</sup> 4.97 – 5.08 <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Shell health, safety and environment data sheets, <sup>(2)</sup>(Gledhill, Saeger et al. 1991), <sup>(3)</sup>(Sherblom, Gschwend et al. 1992).

### 1.4.3. Nomenclatura

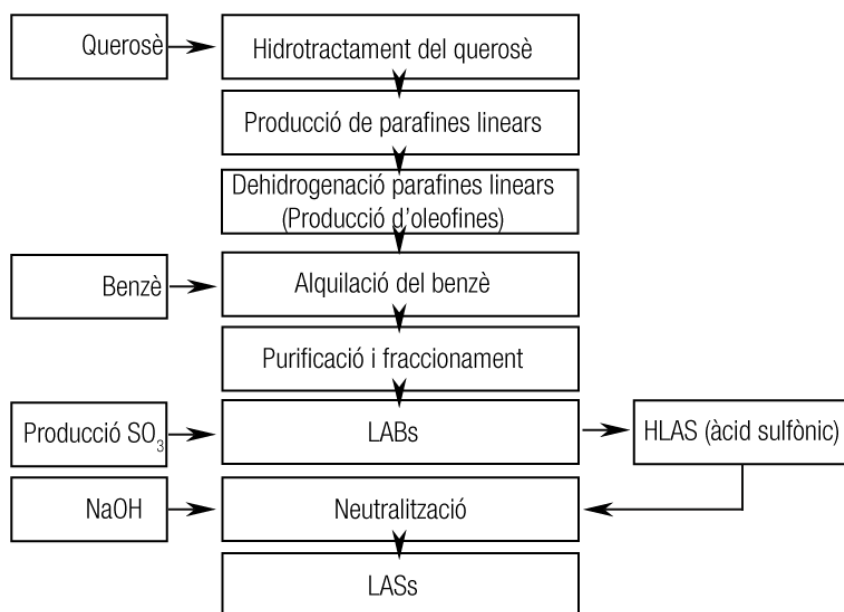
Una gran varietat de nomenclatures és usada per denominar els alquilbenzens lineals, existint fins a quatre noms diferents per a cada isòmer. El producte pot ser anomenat d'acord amb la longitud de la cadena alquímica, indicant la posició d'un anell benzènic. Segons altres autors, l'anell benzènic constitueix la part principal de la molècula, que compta amb cadenes alquílques com una substitució funcional. És comú d'altra banda usar el terme nC<sub>m</sub> LAB, on es troba que n representa la posició de l'anell benzènic i m representa el nombre de carbonis de la cadena alifàtica.

En el cas més comú, l'isòmer  $C_{18}H_{30}$  podria ser definit com a dodecil-3-benzè, 2-fenildodecà o (1-metilundecil)-benzè, o simplement com a  $2C_{12}$  LAB.

#### 1.4.4. Producció i ús

Els alquilbenzens lineals es troben de manera natural en el cru de petroli (Wilhelms, Larter et al. 2001, Dutta, Harayama 2001) i són produïts sintèticament per a la fabricació d'alquilbenzens lineals sulfonats (LASs), un dels components més habituals en detergents.

Els LABs són manufacturats en processos industrials mitjançant diverses tècniques, a partir de n-parafines, querosè i benzè (figura 1.8.). Les tecnologies convencionals estan basades en l'alquilació usant com a catalitzadors l'àcid fluorhídric (HF) o el clorur d'alumini. Aquestes tecnologies estan actualment en procés de decreixement a favor del procés Detal®, que elimina la necessitat d'ús de HF (ChemSystems 2009)



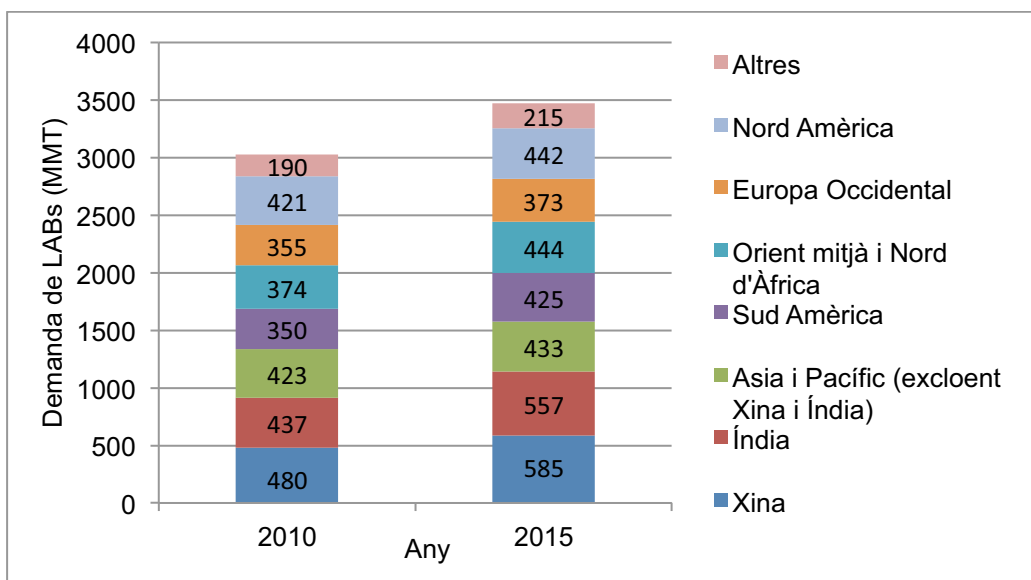
**Figura 1.8.** Esquema de la producció de LABs i LASs. Font: Adaptació de European Chemical Industry Council.

Aproximadament el 98% dels alquilbenzens lineals (LABs) és destinat a la manufactura d'alquilbenzens lineals sulfonats, usats freqüentment en la fabricació de detergents. El 2% restant és destinat a altres aplicacions, entre les quals hi ha herbicides, oli per el recobriment de cables d'alta tensió, solvents per a tinta i la indústria de la pintura.

La demanda de LABs (figura 1.9.) va ser de 3,03 milions de tones (MMT) el 2010, i s'espera que creixi un 2,7% en cinc anys, arribant a 3,47 MMT el 2015. La



demanda augmenta sobretot en països emergents en vies de desenvolupament, com la Xina o l'Índia.



**Figura 1.9.** Demanda de LABs el 2010 i previsió per al 2015. Font: American Oil Chemist's Society.

### 1.5. Tècniques de descontaminació d'aqüífers

La complexitat dels processos que ocorren als aqüífers i la diversitat dels contaminants que els afecten ha fet necessari el desenvolupament d'una gran varietat de tecnologies per a la descontaminació i recuperació d'aqüífers. A l'hora de seleccionar un o diversos tractaments, s'ha de fer una valoració dels avantatges i inconvenients, escollint en cada cas la tècnica més adient segons les característiques del contaminant, el medi i el pressupost disponible.

Les tècniques més comunes per a la remediació d'aqüífers es poden dividir en tractaments *in situ* (tenen lloc al mateix emplaçament contaminat) i *ex situ* (la matriu, sòl o aigua contaminada, es tracta un cop extreta de l'emplaçament contaminat) o *on site* quan es tracta externament en una zona propera (a la superfície per exemple).

Els principals avantatges de les tecnologies *in situ* respecte les *ex situ* són el menor cost d'operació (els costos d'extracció i transport poden ser elevats), i la menor exposició al contaminant. Els inconvenients són el major temps d'operació i que els tractaments *ex situ/on site* permeten exercir un control de les condicions durant el tractament.

A continuació es descriuen les principals tècniques de descontaminació d'aqüífers (Remediation Technologies, EPA). Els contaminants objectiu per a cadascuna de les tecnologies descrites es mostra a la taula 1.2. La taula 1.3. mostra una comparativa entre les característiques dels tractaments descrits, com l'eficiència, el temps d'actuació, els efluent originats i el preu aproximat d'aplicació.

### **1.5.1. Tractaments *in situ***

#### **1.5.1.1. Tractaments biològics *in situ***

##### **Bioremediació**

La bioremediació és la tecnologia de descontaminació que usa processos microbiològics per a transformar els contaminants en compostos més innocus. Per a fer-ho empra la microbiota autòctona o bé inòculs exògens especialitzats. El seu desenvolupament es basa en el control i modificació de les condicions ambientals per optimitzar l'activitat microbiana.

##### **Fitocorrecció**

La fitocorrecció és la degradació dels contaminants usant plantes i arbres per descontaminar masses d'aigües amb nivells piezomètrics poc profunds. Les plantes actuen com a filtres biològics que poden descompondre, absorbir o establir contaminants (habitualment metalls pesants i compostos orgànics). Es tracta d'una tècnica passiva, estèticament agradable i dependent de l'energia solar.

##### **Atenuació natural monitoritzada**

L'atenuació natural és el conjunt de processos naturals (degradació, dispersió, dilució, volatilització, sorció i precipitació) pels quals es redueix la concentració dels contaminants. Aquesta tecnologia pot ser vista com una "no actuació", però requereix control i monitoratge per garantir que els processos esperats es produeixen.

#### **1.5.1.2. Tractaments fisicoquímics *in situ***

##### **Bioslurping**

El bioslurping combina els principis de l'extracció de fases i els del bioventeig. L'objectiu és succionar el contaminant (mitjançant el buit) i alhora promoure l'aïració del sòl (zona vadosa, no saturada) per tal d'afavorir tant l'extracció de vapors contaminants com l'activitat degradadora dels microorganismes. El sistema es constitueix per pous amb un o dos tubs de succió des dels quals es succiona la capa de fase lliure i aquosa per a posteriorment separar-les.

##### **Air sparging**

L'air sparging es basa en la volatilització dels contaminants mitjançant la injecció d'aire a l'interior de la matriu saturada d'aigua subterrània per facilitar la transferència del contaminant, dissolt a la fase líquida, cap a la fase gas. L'aire injectat travessa horitzontalment i verticalment la columna arrossegant els contaminants.

### **Extracció de fases**

L'extracció de fases consisteix en l'extracció simultània de líquids i vapors. Es basa en l'aplicació del buit al subsòl, mitjançant tubs de succió, per a l'extracció de fases (lliure, aquosa, gas) a superfície. La fase líquida i la fase vapor es separen i poden ser tractats posteriorment de forma independent.

### **Oxidació química**

L'oxidació química es basa en la reacció química de l'oxidació dels contaminants mitjançant l'addició d'un agent oxidant, per tal d'oxidar els compostos fins a CO<sub>2</sub> i aigua. Entre els oxidants més populars és troben el reactiu de Fenton, el KMnO<sub>4</sub> i l'ozó.

Cal tenir en compte que els oxidants no són selectius i reaccionen amb tot allò que sigui oxidable, com ara la matèria orgànica i la biomassa de la microbiota autòctona.

### **Barreres impermeables per al confinament**

Les barreres impermeables pretenen reduir el moviment horitzontal de la contaminació. Una de les tècniques més populars és instal·lació de murs pantalla, el sòl s'excava en una rasa profunda perpendicular al flux del plomall i es rebla amb material impermeable (poden ser ciment i bentonita, formigó, làmines sintètiques...). S'empren les barreres impermeables per tal d'impedir la migració dels NAPLs en situacions concretes, com son l'existència de pous de captació d'aigua d'us humà de propers).

### **Barreres reactives**

El flux d'aigua subterrània contaminada es passa a través d'una paret reactiva permeable, una barrera instal·lada perpendicular al flux del plomall.

Aquestes barreres constitueixen una tecnologia de remediació semi-passiva *in situ* que utilitza les reaccions físiques, químiques o bioquímiques per transformar o immobilitzar contaminants mitjançant materials reactius, sorbents o fons hi tot mitjançant l'establiment de biofilms microbians amb activitat degradadora de contaminants. Els contaminants es transformen a través de la barrera.

#### **1.5.1.3. Tractaments tèrmics *in situ***

##### **Tractaments tèrmics**

Els tractaments tèrmics empren la calor per promoure la mobilització dels contaminants. Els compostos mobilitzats es dirigeixen cap a la zona no saturada on són absorbits mitjançant el buit i dirigits a la superfície, on són tractats o retinguts en carbó actiu. Els tractaments tèrmics engloben diferents tecnologies, principalment, la injecció d'un flux d'aire a elevades temperatures i l'aplicació de resistències elèctriques o ones electromagnètiques.

Els processos tèrmics es poden aplicar en sòls argilosos, a diferència d'altres mètodes, i en emplaçaments contaminats per NAPLs. A més, poden ser usats per arrossegar grans quantitats d'hidrocarburs i retardar la migració subterrània de contaminants orgànics.

## **1.5.2. Tractaments *ex situ***

### **Bombeig i tractament**

El bombeig i tractament consisteix en bombejar a l'exterior l'aigua subterrània i posteriorment tractar-la en una planta usant els mètodes convencionals del tractament d'aigües.

#### **1.5.2.1. Tractaments biològics *ex situ***

##### **Bioreactors**

Els contaminants es degraden mitjançant processos microbiològics en reactors. Per al tractament d'hidrocarburs no halogenats els bioreactors solen comptar amb una aportació d'aire, creant condicions aeròbies sota les quals els microorganismes utilitzen la matèria orgànica en dissolució. La injecció d'aire també origina turbulència evitant la sedimentació dels sòlids continguts al tanc; evitant que entressin en descomposició anaeròbia, amb despreniments de gasos com àcid sulfhídric o metà.

#### **1.5.2.2. Tractaments fisicoquímics *ex situ***

##### **Air stripping**

L'air stripping és un procés de transferència de massa que augmenta la volatilització de compostos dissolts a l'aigua gràcies a la injecció d'aire. El bombolleig és un dels processos més comuns per la remediació de compostos volàtils (COVs). El procés idealment és apropiat per concentracions baixes (<200 ppm). El procés consisteix en un flux a contracorrent d'aigua i aire a través d'un material de rebliment. Un cop els contaminants es troben al corrent d'aire, aquest es passa per un filtre de carbó actiu per evitar emissions de gasos contaminants al medi ambient.

##### **Adsorció de carboni**

En l'adsorció el contaminant es transfereix de l'aigua a una superfície sòlida, típicament al carbó actiu. El tractament es fa en una columna reblida de carbó actiu, típicament columnes de corrent contínua, organitzades en sèries.

##### **Bescanvi iònic**

El bescanvi iònic està basat en una resina que reté els contaminants iònics objectiu. És un procés ràpid i reversible en el qual els ions presents a l'aigua (cations o anions) són retinguts per la resina i reemplaçats per ions ( $H^+$  o  $OH^-$ ) que

es desprenen d'aquesta. La resina ha de ser regenerada periòdicament per restaurar-la a la seva forma iònica original.

### **Separador d'hidrocarburs**

Es basa en la separació per gravetat de les substàncies insolubles en aigua, les partícules més pesades queden al fons i els hidrocarburs i substàncies més lleugeres surten sobre l'aigua. Com a mesura de seguretat el sistema consta d'un flotador que sura sobre l'aigua però no sobre d'hidrocarbur, que actua com a obturador, de manera que tanca la sortida en el cas de que tot el separador s'ompli d'hidrocarbur.

### **1.5.3. Complements per a la remediació**

#### **Pous direccionals**

Els pous direccionals de tipus horitzontal són pous que tenen un angle de curvatura que permet arribar a zones de contaminació on és més difícil accedir-hi, Són molt útils quan el plomall de contaminació es situa a sota d'alguna construcció.

#### **Mobilització de contaminants**

La baixa solubilitat de molts compostos en dificulta la seva disponibilitat per al tractament (físicoquímic o biològic). Aquest factor es pot millorar mitjançant la utilització de surfactants, cosolvents o matèria orgànica dissolta.

### **1.5.4. Combinació de tractaments**

Cal tenir en compte que l'aplicació d'un tractament concret té unes conseqüències que poden afavorir o dificultar l'aplicació d'altres tractaments. Per exemple, l'aire injectat per l'air sparging o l'augment de la temperatura que aporten els tractaments tèrmics pot afavorir la biodegradació del contaminant per part de la microbiota autòctona en àrees properes, mentre que els oxidants químics poden dificultar una posterior biodegradació ja que podrien perjudicar les poblacions microbianes actives de l'emplaçament a l'oxidar no selectivament els compostos orgànics.

**Taula 1.2.** Contaminants objectiu de les tecnologies de remediació

	Tipus de Tractament	Tecnologia	BTEX	COVs	SVOCs	COVs halogenats	SCOVs halogenats	HAPs	TPHs	Hydrocarbur halogenats	Metalls	Biocides	Altres	
In situ	Biològics	Bioremediació	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓		✓	✓	Surfactants	
		Fitocorrecció		✓✓	✓✓	✓✓	✓✓		✓✓		✓	✓✓		
	Fisicoquímics i biològics	Atenuació natural monitoritzada	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓		✓	✓	Surfactants	
		Bioslurping	✓✓						✓✓	✓✓				
	Fisicoquímics	Air sparging	✓✓	✓✓	✓✓									
		Extracció de fases			✓✓									
		Oxidació química	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	
		Barreres impermeables	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓		✓✓	✓✓	LNAPL i DNAPL
		Barreres reactives passives i actives		✓✓	✓✓	✓✓	✓✓				✓✓	✓✓		
	Tèrmics	Tractaments tèrmics		✓✓	✓✓	✓✓	✓✓							
Ex situ		Bombeig i tractament											Miscibles en aigua	
	Biològics	Bioreactors	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓		✓	✓		
	Fisicoquímics	Air stripping	✓✓	✓✓		✓✓								
		Adsorció de carboni	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓					✓✓	
		Bescanvi iònic										✓✓		Ions

**Taula 1.3.** Característiques de les tecnologies de remediació

Tipus	Tecnologia	Eficiència esperable	Temps d'actuació	Efluent originats	Preu
In situ	Bioremediació	90-95% (variable segons la degradabilitat del compost)	Mitjà (3-10 anys)	Mínima producció de residus i fluxos residuals.	Injecció d'oxigen: 20-40\$/m
	Fitocorrecció	70-80%	Mitjà-llarg (3 a >10 anys)	Plantes contaminades (poden requerir gestió).	~160\$ / tona de material a tractar
	Atenuació natural monitoritzada	50-99%	Llarg (>10 anys)		Costos monitoratge
	Bioslurping	95% (fase lliure)	Mitjà (3 a 10 anys)	Flux d'aire amb líquid. Emulsió hidrocarburs /sòl/ aigua/ aire.	25-125 \$/m <sup>2</sup> ; 15 \$/l de LANPL; 80.000 € instal·lació-40.000 \$/any funcionament
	Air sparging	70-95%	Curt (<3 anys)	Aire contaminat (pot requerir tractament previ a l'emissió)	27-84 \$/m. Elevat cost energètic 0.1-0.2 kWh per m/h
	Extracció de fases	90%	Curt (<3 anys)	Efluent líquid i efluent gasós.	Cost inversió: 300.000 a 1.000.000 \$ i cost manteniment 20-50 \$/m
	Oxidació química	95-99%	Curt (<3 anys)		Instal·lació: 300.000 a 1.000.000 \$ i funcionament 0,7-5\$ m.
	Barreres impermeables	>99%	Curt	Vapors dels contaminants volatilitzats	Mur-pantalla estàndard 100-225 €/m
	Barreres reactives passives i actives	99% (eficiència menor per a hidrocarburs)	Mitjà-llarg (3 a >10 anys)	Material de reompliment de la barrera (substitució), que pot contenir adsorbents els contaminants tractats.	(2006) Instal·lació: 880 - 1792 \$ / m <sup>3</sup> de barrera; Tractament: 0.07 - 0.21 \$/m <sup>3</sup>
Tractaments tèrmics	90%	Curt (menys de 3 anys)	Efluent d'aire contaminat i efluent de vapor contaminat	45-275 \$/m	

Ex situ	Bombeig tractament	Eficiència del bombeig	Curt-mitjà (menys de 3 anys a 10 anys)	Gran efluent d'aigua a tractar	0,5 a 250 \$/m
	Bioreactors	80-95%		Aigua tractada i llot de depuradora	16.000-330.000 €
	Air stripping	70-99%		Aigua tractada i vapor contaminat	Cost d'instal·lació 60.000 a 200.000 € i cost de manteniment
	Adsorció de carboni	80-99%		Aigua tractada i carbó actiu contaminat	Cost d'inversió 2.000 a 34.000 € i cost de manteniment 0,45€/m
	Bescanvi iònic	99%		Aigua tractada i resines d'intercanvi	Cost d'inversió de 102.000 a 175.000 €
	Separador d'hidrocarburs	99%		Efluent d'aigua i hidrocarbur	3.800 a 8.600 €
Complements	Pous direccionals				60 a 250 \$/m de pou
	Mobilització		Dies		



## 1.6. Biodegradació

La biodegradació és la reducció en complexitat de compostos químics catalitzada biològicament (Alexander 1999). Entre totes les opcions, la degradació microbiana constitueix el principal procés de descontaminació natural (Prince 1993).

La biodegradació comprèn un seguit d'etapes que poden resultar en la mineralització final del compost, o en metabòlits menys biodegradables. En el cas que es produeixi una mineralització, o degradació total del compost, els elements que constitueixen la matèria orgànica són transformats a  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  (mineralització), o incorporats a la biomassa. En cas contrari, part del substrat persisteix en forma parcialment degradada.

La biodegradació pot ser duta a terme per un sol microorganisme, o bé per un grup de microorganismes amb diverses capacitats catabòliques, en una actuació seqüencial on un primer grup efectua un atac inicial, un segon en transforma els metabòlits i així successivament (Karrick 1977, Alexander 1999).

El procés de biodegradació es pot accelerar o millorar mitjançant l'aplicació de tecnologies de la bioremediació (Alexander 1999).

### 1.6.1. Factors que condicionen la biodegradació

Entre els diversos factors que condicionen la biodegradació d'un producte concret s'hi troben els lligats al substrat o producte, els lligats a les característiques del medi i les variables ambientals (taula 1.4).

**Taula 1.4.** Factors que condicionen la biodegradació

Factors lligats al substrat	Variables ambientals	Factors hidrogeològics
Estructura química del substrat	Acceptors d'electrons	Conductivitat hidràulica
Solubilitat	Nutrients	Estructura i estratificació de l'aquífer
Concentració	pH	
	Temperatura	

#### Factors lligats al substrat

##### Estructura química del substrat

L'estructura química del contaminant determina en gran mesura la seva biodegradació. Es pot afirmar que com més complexa sigui l'estructura química del compost, més dificultat comporta la seva degradació.

A priori, els compostos amb menor pes molecular (generalment menys de nou carbonis) seran més fàcilment degradables, mentre que els de major pes presentaran majors dificultats.

Si bé la massa molecular té un paper clau en aquesta dificultat, l'estructura del compost influeix fortament en la seva biodegradabilitat.

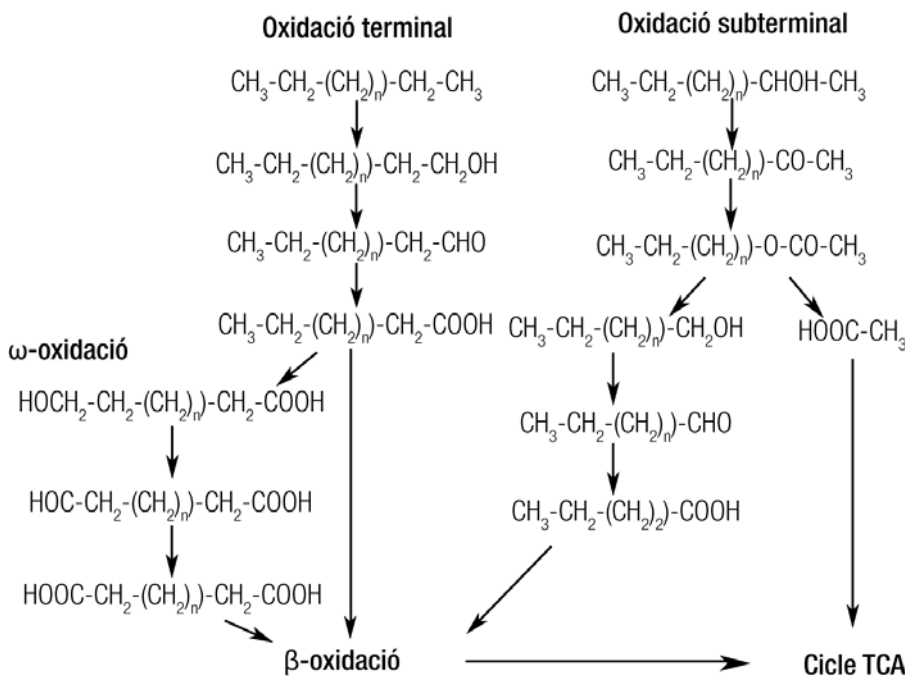
Hidrocarburs alifàtics

Els n-alcans són els compostos alifàtics que es degraden més ràpidament (Atlas 1981). La catàlisi es duu a terme mitjançant oxigenases. En funció de la posició de la cadena on es produeix l'oxidació s'han descrit diverses rutes metabòliques (figura 1.10.). La ruta majoritària és l'oxidació terminal. Aquesta ruta inclou una primera oxidació terminal formant un grup alcohol, una segona oxidació creant un grup aldehyd i l'última a l'àcid gras corresponent. Els àcids grassos resultants són transformats mitjançant beta-oxidació (figura 1.11.), on es generen àcids grassos de cadena més curta, arribant a àcid acètic o propiònic.

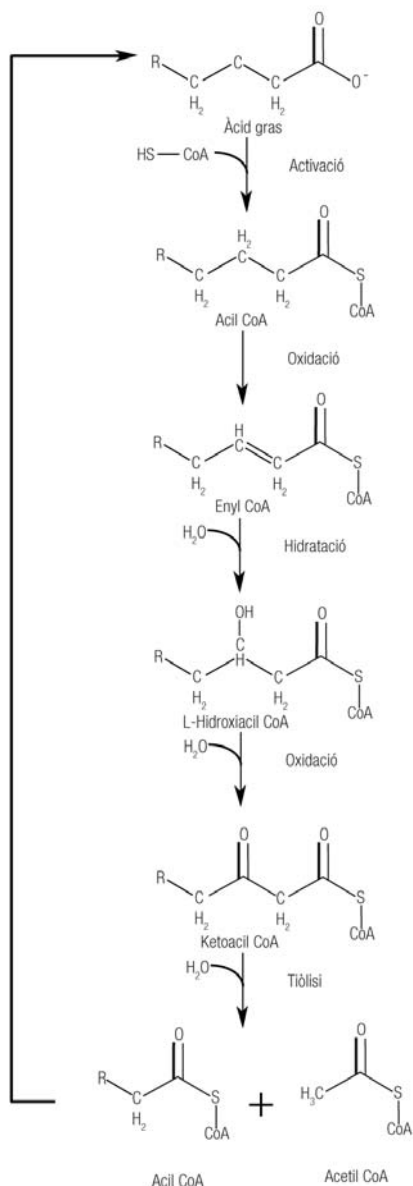
La biodegradabilitat d'un alcà disminueix amb la longitud de la cadena. Els alcans entre C10 i C20 es consideren els més biodegradables. (Watkinson, Morgan 1990).

Els alcans ramificats, com els isoprenoides, presenten una menor biodegradabilitat per al mateix nombre de carbonis (Alexander 1999).

Finalment, els cicloalcans són especialment resistent a la oxidació (Venosa, Zhu 2003), especialment els hopans i esterans (Atlas 1981).



**Figura 1.10.** Rutes de degradació microbiana de n-alcans. Adaptat de Van Beilen, Witholt (2003).



**Figura 1.11.** Ruta de la beta oxidació. Adaptat de Johnson (2003)

Hidrocarburs aromàtics

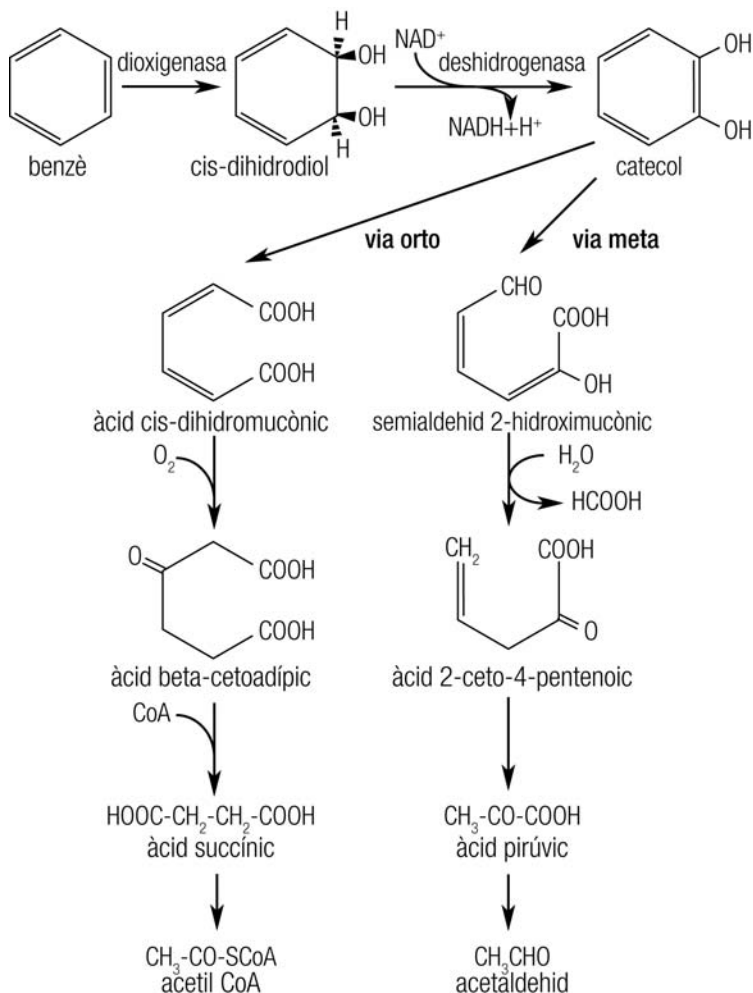
En general, els compostos aromàtics és degraden amb més dificultat que els alifàtics, a causa de la major estabilitat dels enllaços entre carbonis presents en la seva estructura. La biodegradabilitat, igual que en el cas dels alcans, disminueix en augmentar el nombre de carbonis o anells aromàtics (Prince, Garrett et al. 2003).

La capacitat de degradar compostos aromàtics lleugers s'ha descrit en nombroses soques (Van Hamme, Singh et al. 2003). En canvi, relativament poques són capaces de degradar els de major pes molecular (Juhasz, Naidu 2000, Cerniglia 1992, Kanaly, Harayama 2000). La recalcitrància dels HAP pesants pot ser atribuïda a la

toxicitat i a la condensació d'anells aromàtics caracteritzats per la seva energia de ressonància (Cerniglia 1992).

De la mateixa manera que els hidrocarburs alifàtics, la degradació dels hidrocarburs aromàtics es produeix amb més facilitat en condicions aeròbies.

Per trencar l'anell aromàtic es duen a terme reaccions d'introducció de grups hidroxil catalitzades per mono- o di-oxygenases (Figura 1.12.)



**Figura 1.12.** Metabolisme bacterià aerobi de l'anell aromàtic per via *orto* o *meta*. Adaptat de Cerniglia (1984)

### LABs

Els LABs, tal com s'ha exposat a l'apartat 1.3.1., tenen una estructura mixta, presentant una part alifàtica i una part aromàtica. La seva biodegradació, per tant, es regeix pels patrons descrits als apartats anteriors per als dos tipus d'hidrocarburs (alifàtics i aromàtics).

Els LABs es solen presentar com una barreja d'isòmers i homòlegs, amb diferent nombre de carbonis en la cadena alquílica (10 a 14) i diferents posicions relatives de l'anell aromàtic (de la posició 2 a la posició 7). Així com estudis de biodegradació indiquen una jerarquia de facilitat de degradació respecte a complexitat de la molècula, existeix també una gradació de degradabilitat dels LABs. En relació a aquesta biodegradació selectiva, cal esmentar l'estudi dut a terme pel mateix grup de recerca (Bayona, Albaigés et al. 1986), que mostra la diferent composició de LABs en els sediments i en el producte comercial, a causa de la biodegradació selectiva dels isòmers.

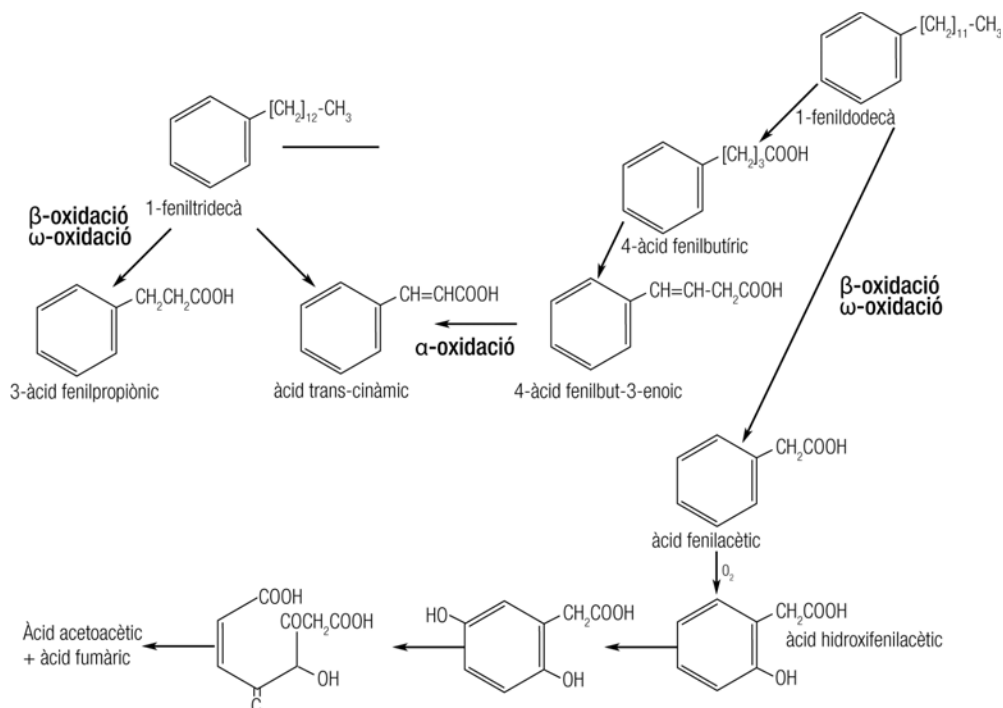
El patró de biodegradació suposa una degradació preferencial dels isòmers externs (amb l'anell benzènic en posició propera a la terminal) respecte als interns (amb l'anell benzènic en posició propera a la central).

Estudis posteriors han corroborat aquest patró de biodegradació (Takada, Ishiwatari 1990, Takada, Ishiwatari et al. 1992, Angley, Brusseau et al. 1992, Chalaux, Bayona et al. 1992, Johnson 2003, Martinez-Pascual, Jimenez et al. 2010).

D'altra banda, també ha estat documentada més facilitat en la degradació de cadenes curtes (Bayona, Albaigés et al. 1986, Angley, Brusseau et al. 1992).

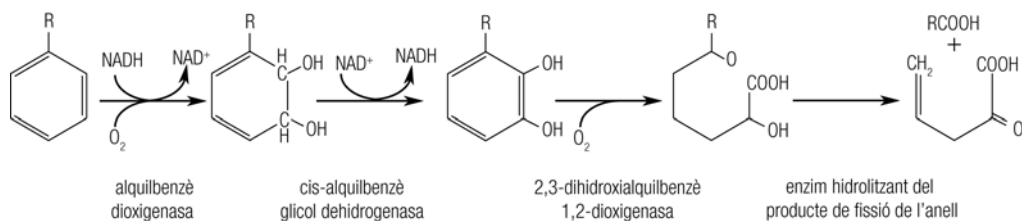
La recerca en degradació de LABs s'ha fet sobretot sobre isòmers terminals. La seva representativitat no és clara, ja que en les mescles comercials no inclouen aquests isòmers (Eganhouse 1986).

La degradació aeròbia de 1-fenilalcans ha estat comprovada en diversos gèneres: *Nocardia* (Sariaslani, Harper et al. 1974), *Acinetobacter* (Amund, Higgins 1985) i *Pseudomonas* (Bayona, Albaigés et al. 1986, Smith, Ratledge 1989) (figura 1.13).



**Figura 1.13.** Rutes de degradació de 1-feniltridecà i 1-fenildodecà.

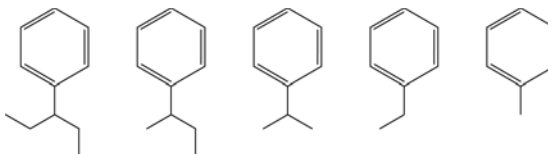
Diversos autors (Smith, Ratledge 1989, Smith 1990) han dilucidat rutes de biodegradació aeròbia pels alquilbenzens terminals entre C1 i C7 (figura 1.14.), C12 i C13. L'atac per a C12 i C13 s'inicia amb una  $\beta$ - o  $\omega$ -oxidació de l'últim metil de la cadena. És possible doncs que ambdós metils terminals siguin atacats en cas d'isòmers no terminals.



**Figura 1.14.** Ruta general pel catabolisme aerobi dels alquilbenzens. Adaptació de Smith i Ratledge (1989).

La degradació de les cadenes alquiliques pot ser similar a la degradació dels àcids grassos per  $\beta$ -oxidació (figura 1.11.). Si un isòmer terminal de LABs és oxidat mitjançant aquesta via, el resultat seria o bé toluè o etilbenzè.

La  $\beta$ -degradació dels isòmers existents en les mescles comercials de LABs (no terminals) pot acabar en una de les estructures mostrades en la figura 1.15., depenent de les cadenes inicials (nombre de carbonis parell o senar), si ambdues cadenes son atacades i de la capacitat de l'enzim per actuar en proximitat del grup fenil.



**Figura 1.15.** Possible punts finals per a la  $\beta$ -oxidació dels LABs. Adaptat de Johnson (2003).

Conèixer l'estructura dels contaminants presents al medi dóna una idea de la seva biodegradabilitat i de l'efectivitat que es pot assolir amb tractaments de biodegradació.

## Solubilitat

Els processos de biodegradació tenen lloc principalment a la fase aquosa i per tant necessiten de concentracions mínimes de compostos dissolts en aigua. Una sorció elevada a la matriu mineral-orgànica del sòl-aquífer ( $K_{oc}$  elevada), implica que el contaminant romangui a la fase sòlida i per tant sigui menys biodisponible per als microorganismes. La solubilitat és també un factor que condiona el transport al flux subterrani. Els compostos de cadenes senzilles són més solubles, i per tant potencialment més degradables que compostos de cadenes llargues o pes molecular més elevat.

## **Concentració**

Concentracions massa elevades de contaminant poden anar associades a toxicitat, mentre concentracions baixes (<0'1 ppm), poden estar sota la concentració llindar per la utilització per part dels microorganismes i ser per tant difícils de reduir.

## **Variables ambientals**

Per promoure la biodegradació, es necessita controlar una sèrie de paràmetres ambientals.

A causa de la manca de grups funcionals, els hidrocarburs són extremadament apolars i tenen una baixa reactivitat química. Són una font de carboni i energia, però al no contenir altres elements (com el nitrogen i el fòsfor), els nutrients disponibles al medi es solen esgotar ràpidament aturant-se el procés de biodegradació en aquell instant (Breedveld, Sparrevik 2000). La disponibilitat de nutrients, principalment nitrogen i fòsfor, però també oligoelements com el ferro o el manganès, té un efecte molt important en les taxes de degradació. Les proporcions molars de C:N:P descrites a la bibliografia són molt diverses. La EPA recomana proporcions de C:N 100:1 a 1000:1 en sòls contaminants per hidrocarburs (U.S. EPA, 1995). Al grup de recerca s'ha determinat amb anterioritat una proporció òptima de 300:10:1 (Vinas, Sabate et al. 2005).

Tant els nutrients com els acceptors d'electrons cal que estiguin biodisponibles al medi. Alguns compostos tendeixen a adsorbir-se a la fase sòlida, precipitar o formar compostos quelats, de manera que la seva disponibilitat és limitada.

L'activitat microbiana es veu influïda per factors ambientals, com el pH i la temperatura. Aquests afecten directament a les característiques químiques dels compostos contaminants, la solubilitat dels mateixos i la fisiologia i diversitat de la microbiota autòctona dels sòls (Das, Chandran 2011).

A pH extrems, l'activitat degradadora no és viable. Habitualment als aquífers el pH sol ser neutre i força tamponat, el que facilita l'activitat microbiana.

La temperatura és un dels factors que més afecta a l'activitat metabòlica dels microorganismes i les taxes de degradació. El rang d'activitat dels microorganismes mesòfils típicament responsables de la biodegradació d'hidrocarburs es sol situar entre 5°C i 45°C, tenint el seu rang ideal entre 20°C i 30°C (Alexander 1999).

Per al funcionament de l'activitat microbiana cal la presència d'un acceptor d'electrons (AE) al medi. La major part d'hidrocarburs són degradats amb més facilitat de manera aeròbia, és a dir, usant O<sub>2</sub> com a acceptor final d'electrons. En absència d'oxigen, els hidrocarburs poden ser degradats en altres condicions redox (usant com a acceptor final d'electrons nitrats, Fe<sup>3+</sup>, sulfats o ió manganès) amb cinètiques de degradació inferiors a les aeròbies (Grishchenkov, Townsend et al. 2000, Holliger, Zehnder 1996, Leutwein, Heider 1999, Massias, Grossi et al. 2003) (figura 1.16).

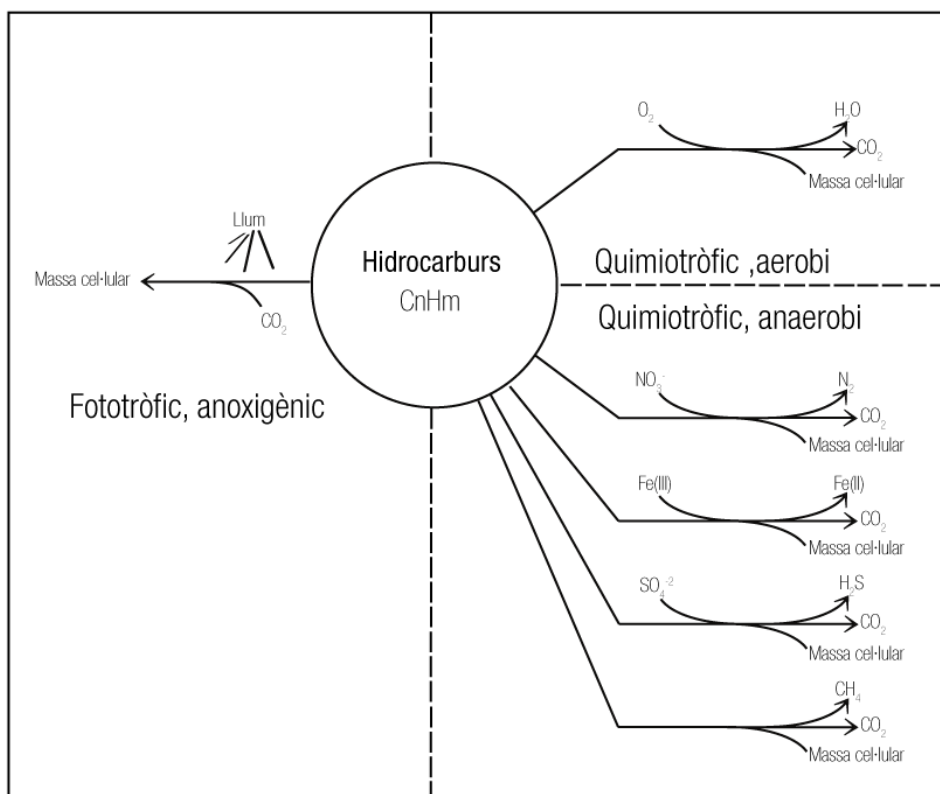
Tanmateix, amb freqüència, quan es produeix un episodi de contaminació en sòls o aigües subterrànies, l'oxigen no és disponible o està en concentracions limitants (concentracions per sota de la demanda biològica d'oxigen necessària per promoure una biodegradació aeròbia completa dels contaminants a l'aquífer, on no hi ha entrades massives suplementàries d'oxigen molecular).

L'opció d'una biodegradació aeròbia complerta no és possible majoritàriament sense l'addició d'oxigen al subsòl, amb el cost que aquesta aireació suposa, i la potencial alteració de l'ambient redox microaeròfilic, existent amb freqüència en les aigües subterrànies, podent causar alteracions geoquímiques a l'aquífer (permeabilitat hidràulica, composició iònica, alteració del potencial microbiològic). Així doncs, la possibilitat de degradació sense injecció d'oxigen és una opció atractiva, ja que els costos d'implantació de la bioremediació disminueixen substancialment, i s'eviten potencials alteracions de les condicions ambientals i per tant del potencial metabòlic que pot albergar la comunitat microbiana ja adaptada a les condicions ambientals.

No obstant, la informació fent referència a la biodegradabilitat i els possibles mecanismes de degradació de LABs usant acceptors terminals d'electrons alternatius a l'oxigen és escassa. Si que s'ha descrit la degradació de LASs en condicions desnitrificants, però requerint de més temps o més etapes que la degradació aeròbia (Almendariz, Meraz et al. 2001, Angelidaki, Torang et al. 2004, Lobner, Torang et al. 2005) o bé detectant-se metabòlits amb anells benzènics en els efluentes de sortida (Mogensen, Ahring 2002).

D'altra banda, els processos anaerobis de degradació de contaminants són essencials per promoure la degradació de compostos halogenats (etenoclorats, etanoclorats, PCBs i dioxines) (Meckenstock, Mouttaki 2011).

Els processos anaerobis de degradació d'hidrocarburs no halogenats són més lents que els aerobis, i la major part dels mecanismes bioquímics encara no estan descrits.



**Figura 1.16.** Biodegradació d'hidrocarburs al medi. Adaptació de Widdel i Rabus (2001)



## Factors hidrogeològics

Finalment, a l'hora de dur a terme una bioremediació *in situ* en un aqüífer, s'ha de tenir en compte també els factors hidrogeològics. La conductivitat hidràulica és un factor de màxima importància al marcar la velocitat de l'aigua dins l'aqüífer. El valor pot variar diversos ordres de magnitud, considerant-se valors aptes aquells superiors a  $10^{-4}$  cm/s. També són factors rellevants l'estructura i l'estratificació de la matriu de l'aqüífer. La presència de fractures pot modificar el transport i originar fluxos preferencials, distribuint desigualment el plomall i afectant l'eficàcia de la biodegradació *in situ*.

### 1.6.2. Avantatges i limitacions de la bioremediació *in situ*

A l'hora de valorar les diverses tecnologies disponibles per a la descontaminació d'un emplaçament (sòl, aqüífer) és important diferenciar aquelles que suposen un trasllat del contaminant a un altre compartiment ambiental d'aquelles que potencialment poden transformar els contaminants en productes innocus (Alexander 1999). La tecnologia de la bioremediació, basada en el potencial metabòlic dels microorganismes per eliminar o transformar els contaminants del medi té avantatges respecte els mètodes fisicoquímics. D'una banda, el menor cost d'operació (Ulrici 2000) i de l'altra, la no afectació dels altres compartiments ambientals i l'optimització de recursos (Flathman, Jerger et al. 1994, Klein 2001)

És cert però que la bioremediació també presenta limitacions, tant lligades al desconeixement del procés com de tipus tècnic. Entre les més importants hi ha el temps d'operació i l'enriquiment en compostos recalcitrants. Durant un procés de bioremediació es produeix una ralentització de la biodegradació, ja sigui pel mencionat enriquiment en la fracció més recalcitrant o per una disminució de la biodisponibilitat dels contaminants (Alexander 1999, Alexander 2000).

**Taula 1.5.** Avantatges i limitacions de la bioremediació.

Avantatges	Limitacions
El contaminant es destrueix i no es transfereix a un altre medi	Manca de coneixement dels mecanismes de biodegradació
Capaç de degradar hidrocarburs fins a la seva mineralització	Concentracions romanents potencialment elevades
Minimització de l'exposició directa a la contaminació	Possibilitat de productes inhibitoris o recalcitrants
Mínima producció de residus	Temps més llargs
Mínima ocupació d'espai, compatible amb activitat en superfície	Sovint impossibilitat d'eliminar la fase lliure
Baixos requeriments tecnològics d'operació	Possibles problemes relacionats amb la complexitat tecnològica
Combinable amb altres tecnologies	
Baix consum energètic	
Baix cost	

Les tècniques fisicoquímiques, tot i ser més ràpides i efectives, solen alterar o eliminar completament la microbiota del sòl, en modifiquen les característiques fisicoquímiques i sovint no eliminen els contaminants, sinó que els traslladen a una

altra matriu o compartiment ambiental. Per tant, no compleixen els criteris de sostenibilitat en els quals s'hauria de basar qualsevol remediació.

Tot i que els tractaments biològics tenen gran importància tradicionalment en el sector del tractament d'aigües residuals, no s'han implantat de manera habitual en el tractament de sòls i aigües subterrànies fins fa relativament poc temps (US-EPA, 2000; US-EPA, 1998).

### 1.6.3. Estratègies de millora

A l'hora d'aplicar la tecnologia de la bioremediació, existeixen diverses estratègies que permeten millorar-ne els punts febles minimitzant els possibles problemes.

Depenent del tipus de matriu, del contaminant i de la microbiota present, les estratègies habituals per afavorir la *bioestimulació* de les poblacions (aireació o presència d'altres acceptors d'electrons, addició de nutrients en proporcions adequades, etc.) poden no donar resultats prou satisfactoris. En aquests casos, s'ha de detectar quin és el factor que limita la bioremediació i actuar en conseqüència, intentant minimitzar-lo.

En el cas que el problema sigui la baixa mobilitat o biodisponibilitat del contaminant, es pot optar per l'ús de surfactants (biològics o químics). Els surfactants són molècules que es caracteritzen per tenir un cap hidrofílic i una cua hidrofòbica. Gràcies a aquesta estructura amfifílica, es formen micel·les (agregats de diverses molècules) en solució. Aquestes micel·les són capaces de dissoldre molècules hidrofòbiques al seu interior. La major disponibilitat dels compostos hidrofòbics en presència de surfactants és deguda a dos motius. En primer lloc, augmenta la seva solubilitat en aigua com a conseqüència de la fracció lipofílica de les micel·les (Edwards, Luthy et al. 1991). A més, el transport de contaminant de la fase sòlida (en sorció) a la líquida es veu afavorit degut a la disminució de la tensió superficial de l'aigua dels porus presents al sòl (Volkering, Breure et al. 1997).

En cas que el problema sigui el baix nombre de microorganismes es pot optar per dur a terme un *bioaugment* o *bioreforç*, consistent en inocular microorganismes al·lòctons com a suplement a la població existent. Una altra opció seria l'ús de co-substrats, afegint així una font de carboni fàcilment assimilable per la microbiota capaç de degradar hidrocarburs.

L'addició de compostos fàcilment assimilables (co-substrats) en un emplaçament contaminat té com a objectiu incrementar la presència de microorganismes heteròtrofs al sòl, augmentant en conseqüència la degradació dels hidrocarburs contaminants. El co-substrat pot fer variar la relació C:N del sòl, afavorir el creixement microbià i incrementar la producció d'enzims involucrats en la degradació d'hidrocarburs (Lu, Zhang et al. 2010). Cal, però, anar amb compte, perquè també poden tenir efectes adversos al competir com a font d'energia i carboni amb el contaminant (Quantin, Joner et al. 2005).

En el cas d'elevades concentracions de contaminant, o si el problema és el temps de remediació, es pot optar per l'ús de diverses tecnologies acoblades. Una bona aproximació per millorar la degradació és la combinació de tecnologies fisicoquímiques amb la biodegradació. Gran varietat d'agents químics poden ser usats per assolir els objectius. Destaca en aquest punt l'ús d'agents oxidants forts, com l'ozó, el reactiu de Fenton, el permanganat de potassi o el permanganat de sodi. No obstant no s'estudia habitualment el seu impacte sobre el potencial biodegradador de la

microbiota nativa de l'emplaçament, en cas que es volgués promoure processos de biodegradació a continuació dels processos fisico-químics aplicats (Singh, Ward 2004).

### 1.7. Oxidació química

L'oxidació química *in-situ* (ISCO) és un tractament ràpid i efectiu per eliminar els contaminants de les aigües subterrànies. Es tracta d'un tractament agressiu, en el qual els oxidants químics són bombejats a la subsuperfície per oxidar els contaminants orgànics (Grotenhuis, Rijnaarts 2011). Aquesta tecnologia ha estat usada amb èxit per degradar hidrocarburs (Crimi, Taylor 2007). És interessant destacar que l'oxidació química, a diferència de la bioremediació, és un tractament que afecta tant la fase aquosa com l'adsorbida o el NAPL present a la matriu de l'aqüífer. Degut al funcionament no biològic d'aquesta tecnologia, és possible oxidar un gran nombre de contaminants en lapses de temps menors sense problemes relacionats amb la toxicitat (Grotenhuis, Rijnaarts 2011).

Aquesta tecnologia també presenta inconvenients. És possible que després de l'oxidació quedi una fracció de contaminant romanent degut a les limitacions d'alliberament de l'oxidant. Els oxidants químics no són selectius i, per tant, oxidaran també la matèria orgànica present. Aquesta inespecificitat, a més de reduir l'efectivitat de l'oxidació per pèrdua d'oxidants per reacció amb la matriu del sòl, pot conduir a altres problemes. Alguns autors han descrit la possibilitat de la mobilització de metalls al sòl (Crimi, Siegrist 2003). S'ha també alertat de la potencial reducció de permeabilitat, ja que l'oxidació promou l'acumulació de precipitats i la formació de gas (Grotenhuis, Rijnaarts 2011). Finalment, s'ha de considerar que l'oxidació química és una tecnologia cara a causa de les quantitats d'oxidants que es necessiten.

Els oxidants més emprats per a la oxidació *in situ* són el permanganat de potassi ( $\text{KMnO}_4$ ), el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) mitjançant la reacció de Fenton, el persulfat de sodi ( $\text{NaSO}_4$ ) i l'ozó ( $\text{O}_3$ ). Les reaccions i condicions relacionades amb aquests oxidants es poden veure a la taula 1.7. El tipus i format de l'oxidant (sòlid, líquid, gas) determinaran els requeriments d'injecció en cas de ser aplicats *in situ*. Cal tenir en compte la persistència de l'oxidant en la subsuperfície. Aquest factor afecta el temps de contacte i el transport cap a les zones objectiu. Els oxidants considerats en el present estudi han estat el permanganat de potassi i la reacció de Fenton modificada.

D'altra banda, l'ús d'oxidants químics a elevada concentració per degradar els contaminants pot ser perjudicial per a les comunitats microbianes en sòls i aigües. Diversos estudis han demostrat que els tractaments d'oxidació química afecten les poblacions microbianes i la geoquímica de la subsuperfície (Kulik, Goi et al. 2006, Cassidy, Northup et al. 2009). Els canvis provocats al sòl i l'aigua, com l'estrès oxidatiu, variacions del pH per la reacció del permanganat (Sahl, Munakata-Marr 2006) i de les condicions redox, poden ser tòxics per a les poblacions microbianes.

Els potencials efectes de l'oxidant químic sobre les poblacions microbianes són diversos. El permanganat de potassi oxida el DNA cel·lular, descomponent-ne l'estructura (Bui, Cotton 2002). El radical OH generat en la reacció de Fenton contribueix a la mort cel·lular, la mutagènesi i el dany a les membranes (Imlay, Linn 1988, Izawa, Inoue et al. 1996).

En altres casos, l'oxidació química ha influït positivament, incrementant la disponibilitat o reactivitat del substrat (Sahl, Munakata-Marr 2006).

**Taula 1.6.** Avantatges i inconvenients de l'aplicació de l'oxidació química *in situ*.

Avantatges	Inconvenients
Aplicable a un gran nombre de contaminants	Possibles problemes d'alliberació de l'oxidant degut a la naturalesa heterogènia del subsòl
Transforma els contaminants dissolts, adsorbits o en NAPL	Demanda d'oxidant alta en alguns aqüífers i sòls
Millora de la transferència de massa (desorció i dissolució)	Curta persistència deguda a ràpides taxes de reacció
Producció de calor (H <sub>2</sub> O)	Potencial mobilització dels contaminants
Relativament ràpida	Limitacions per a l'aplicació en llocs amb altes concentracions de contaminants
Potencial millora de l'activitat microbiana posterior (alliberament oxigen, temperatura, transformació contaminants)	Mescles complexes de contaminants poden requerir tractaments combinats
	Potencial perillositat a causa de les característiques dels oxidants forts

Font: EPA Engineering Issue In-Situ Chemical Oxidation. (Agost 2006) (EPA/600/R-06/072)

A la literatura es troben diversos estudis que avaluen l'oxidació química dels LABs i estructures similars (cable oil) (taula 1.8.). En experiments de tipus *batch* s'ha avaluat l'efecte del peròxid d'oxigen, el CaO<sub>2</sub> i el permanganat (Xu, Pancras et al. 2011). A més, s'ha testat l'oxidació per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en columnes (Silva, Zagatto et al. 2005) i *in-situ* (Vitolins, Nelson et al. 2003). Tanmateix, cap d'aquests treballs ha investigat la influència dels oxidants químics en les poblacions microbianes, i a la literatura hi ha pocs estudis que ho hagin avaluat.

**Taula 1.7.** Oxidants químics

Oxidant	Reacció	eV	pH òptim
Reactiu de Fenton	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH \cdot OH^- + Fe^{3+}$	3-4	2.8
Reactiu de Fenton modificat (MFR)	$H_2O_2 + OH \cdot \rightarrow HO_2 \cdot + H_2O$ $HO_2 \cdot \rightarrow O_2 \cdot^- + H^+$ $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Neutre	Radical hidroxil (OH <sup>-</sup> )
Persulfat activat per metall	$Mn^+ + S_2O_8^{2-} \rightarrow SO_4^{\cdot-} + SO_4^{2-} + Mn^{+1}$	3-4	2.6 (radical sulfat)
Persulfat activat per calor	$S_2O_8^{2-} + heat \rightarrow 2SO_4^{\cdot-}$	Neutre	2.6 (radical sulfat)
Persulfat activat per alcalinitat	Reacció desconeguda	>10.5	2.6 (radical sulfat)
Ozó	$O_3 + OH^- \rightarrow O_2 + 2OH \cdot$	Neutre	2.1
Permanganat	$MnO_4^- + 2H_2O + 3e^- \rightarrow MnO_2(s) + 4OH^-$ $2KMnO_4 + C_2HCl_3 \rightarrow 2CO_2 + 2MnO_2(s) + 3Cl^- + H^+ + 2K^+$	Neutre	1.7

**Taula 1.8.** Resum de la recerca duta a terme en la viabilitat i cerca de condicions òptimes per a la combinació d'oxidació química i bioremediació aeròbia. Adaptació. (Sutton, Grotenhuis et al. 2011).

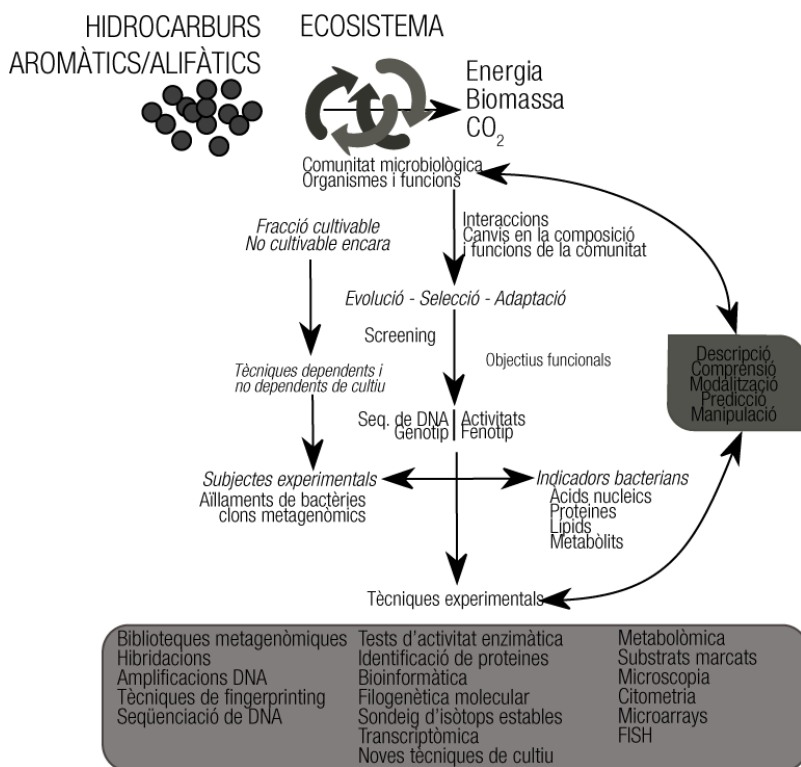
Contaminant i concentració inicial	Oxidació química	Biodegradació	Eficiència global	Referència
Jet fuel (27 mg/L)	Permanganat Peròxid d'hidrogen Peròxid de magnesi	19 setmanes, nutrients, font de carboni, elements traça	15-80%	(Xie, Barcelona 2003)
Dièsel (2700 ppm)	Ozó	9 setmanes	>50%	(Jung, Ahn et al. 2005)
HAPs (1490 i 2370 ppm)	Ozó Reactiu de Fenton	8 setmanes	75-94% i 55-75%	(Kulik, Goi et al. 2006)
HAPs (3960 ppm)	MFR	5-16 setmanes	36-54%	(Palmroth, Langwaldt et al. 2006)
HAPs (3318 ppm)	MFR	8-16 setmanes	43-59%	(Palmroth, Langwaldt et al. 2006)
Fuel oil (5000 ppm)	Reactiu de Fenton	17 setmanes, nutrients i font de carboni	47-75%	(Tsai, Kao et al. 2008)
Fuel oil (1000-5000-10000 ppm)	Reactiu de Fenton	17 setmanes	100% (amb biosurfactant)	(Tsai, Kao et al. 2008)
HAPs (1203 ppm)	Reactiu de Fenton	No determinat, nutrients	75%	(Valderrama, Alessandri et al. 2009)
Cru de petroli (28000 ppm)	Ozó	18 setmanes, nutrients	35-40%	(Liang, Nostrand et al. 2009)
2,4-dinitrotoluenè (11450 ppm)	Ozó MFR Persulfat de sodi activat per ferro	2-14 setmanes nutrients	98%	(Cassidy, Northup et al. 2009)

### 1.8. Mètodes d'anàlisi de les comunitats microbianes

Els organismes procariotes tenen un paper predominant en els cicles biogeoquímics. Se suposa que existeixen milions d'espècies microbianes (Torsvik, Ovreas et al. 2002), tot i que se n'han descrit formalment tan sols unes 10.000 (Euzéby 2012). La microbiota autòctona ambiental és el motor que dirigeix el procés de bioremediació en un emplaçament contaminat: la composició i activitat de la comunitat microbiana determinen doncs la funcionalitat de la biodegradació (Rittmann, Hausner et al. 2006).

Les aproximacions racionals per optimitzar els processos de bioremediació necessiten informació sobre el comportament de les comunitats microbianes, les seves

interaccions i les funcions metabòliques interessants pel procés que s'intenta optimitzar (figura 1.17).



**Figura 1.17.** Estratègies d'anàlisi del potencial degradador d'hidrocarburs de la comunitat microbiana. Visió general de les interrelacions d'aproximacions de mètodes dependents i no dependents de cultiu, i de mètodes basats en seqüenciació o en activitat. Adaptació. (Junca, Pieper 2010).

Per caracteritzar les comunitats microbianes en aqüífers i altres sistemes ambientals contaminats, existeixen mètodes de caracterització microbiana dependents i independents de cultiu.

**Metodologies dependents de cultiu**

Entre les metodologies clàssiques es troben els mètodes dependents de cultiu. Formen part d'aquest grup els recomptes de viables en placa i el nombre més probable (NMP) emprats per quantificar cèl·lules actives de mostres ambientals, les plaques *Biolog* i els agars mínims amb fonts de carboni i energia específiques per a l'aïllament de microorganismes en placa. En el cas de mostres ambientals, però, cal tenir en compte que només entre un 0,001% i un 1% dels microorganismes ambientals poden ser cultivats (Torsvik, Ovreas et al. 2002, Giovannoni, Stingl 2005). Les metodologies dependents de cultiu proporcionen doncs unes dades força esbiaixades respecte a l'abundància real de microorganismes.

Aquests mètodes encara s'utilitzen malgrat les seves limitacions, ja que presenten certs avantatges en determinades situacions: el fet de disposar de cultius purs permet avaluar-ne les capacitats metabòliques i les funcions. A més, la millora en l'especificitat i selectivitat d'aquestes metodologies, afavorirà que es puguin cultivar microorganismes ambientals amb potencials biotecnològics fins ara desconeguts, per

poder estudiar la seva fisiologia i per tant tenir informació complementària a les caracteritzacions de diversitat per mètodes moleculars.

La combinació de tècniques clàssiques de cultiu amb tècniques moleculars pot permetre una millora del coneixement per entendre millor la complexitat de la diversitat i la seva funció de les comunitats microbianes ambientals.

### ***Metodologies independents de cultiu***

A causa de les limitacions que presenten les tècniques dependents de cultiu, és freqüent en l'ecologia microbiana l'ús de metodologies d'anàlisi que no requereixin el cultiu previ dels microorganismes (Riesenfeld, Schloss et al. 2004). Aquestes tècniques es basen en l'observació directa dels microorganismes actius (FISH) i l'estudi de marcadors com els fosfolípids de membrana (FALP) o els àcids nucleics (mètodes basats en PCR).

Les metodologies basades en l'anàlisi dels àcids nucleics es fonamenten generalment en l'estudi de gens que codifiquen pel 16S rRNA. Aquestes tècniques es poden emprar amb diverses finalitats, com realitzar estudis metagenòmics (tècniques de seqüenciació massiva o NGS), o caracteritzar estructures de comunitats microbianes (*fingerprinting*) (DGGE, T-RFLP).

Per a aquestes tècniques és imprescindible l'extracció d'àcids nucleics a partir de mostres ambientals. Aquest punt és sovint limitant o esbiaixant. La qüestió clau és l'eficiència d'alliberament i lisi de cèl·lules del sòl. Idealment, totes les cèl·lules s'haurien de lisar, però degut a problemes inherents a la matriu del sòl (desorció incompleta de les partícules de sòl), o bé a una lisi cel·lular incompleta i esbiaixada, poden introduir biaixos substancials en les anàlisis (van Elsas, Boersma 2011).

L'electroforesi en gels de gradients desnaturalitzants (DGGE) és una tècnica de *fingerprinting* de la diversitat microbiana usada extensivament en ecologia microbiana en els darrers 20 anys (Muyzer, Smalla 1998). La interpretació dels perfils de DGGE mostra l'impacte de l'addició o presència de contaminants i la bioestimulació en les comunitats microbianes autòctones ambientals. Es tracta d'una tècnica econòmica i rutinària, idònia per obtenir descripcions ràpides de la microbiota i comparar un gran nombre de mostres corresponents a diversos punts temporals o diversos tractaments en un temps curt. No obstant, s'han de tenir en compte les limitacions d'aquesta tècnica, com la seva baixa resolució (el llindar de la tècnica és del 0'1% del total), que no permetrà detectar els canvis en les comunitats microbianes no majoritàries (van Elsas, Boersma 2011).

L'emergència de les tècniques de seqüenciació massiva o NGS (*next generation sequencing*), com la piroseqüenciació 454, ha revolucionat l'ecologia microbiana molecular, fent possible superar les limitacions de resolució inherents al DGGE i altres tècniques de *fingerprinting* associades a amplificacions prèvies per PCR com el t-RFLP i les llibreries de clons (Urich, Lanzén et al. 2008). La caracterització de comunitats microbianes complexes en les que es pugui incloure microorganismes que, tot i trobar-se en minoria dins les poblacions microbianes (detectables per NGS), poden tenir capacitats interessants en el camp de la biodegradació, pot assolir noves dimensions de comprensió i aplicabilitat.

D'altra banda, els mètodes no dependents de cultiu no diferencien les poblacions metabòlicament actives dels bacteris no actius o morts. Per tant, no es pot afirmar que els microorganismes identificats tinguin un paper actiu en les funcions catabòliques de la comunitat. Una estratègia per caracteritzar amb precisió la comunitat microbiana activa és usar eines que facilitin la formació de biofilms actius en les condicions ambientals *in situ*, emprant la tecnologia dels BioSeps. Els BioSeps

poden ser dopats amb una gran varietat de compostos orgànics, presentant així biofilms formats principalment per microorganismes que utilitzen aquests compostos. L'ús combinat de BioSep dopats i no dopats permet determinar quines poblacions microbianes són activament relacionades amb l'ús de LABs *in-situ*.

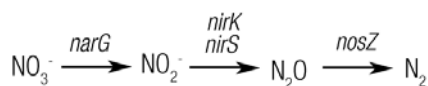
Tot i que hi ha certa controvèrsia, la caracterització de la microbiota d'un aquífer contaminat es troba més fidedignament representada pels biofilms existents que pels organismes planctònics en aigua subterrània mostrejada (White, Gouffon et al. 2003, Sublette, Peacock et al. 2006).

Els BioSep permeten la formació de biofilms i per tant un mostreig més acurat. (Sublette, Plato et al. 1996, Peacock, Chang et al. 2004, Geyer, Peacock et al. 2005, Sublette, Peacock et al. 2006). S'ha demostrat que aquesta metodologia reflecteix canvis espacials i temporals en les comunitats microbianes dels aquífers que no poden ser percebuts a partir de l'anàlisi directe de mostres d'aigua (Sublette, Peacock et al. 2006). Un altre detall important a tenir en compte, tenint en compte la  $K_{ow}$  i  $K_{oc}$ , és que la major part de la massa dels contaminants lligats a fuels i derivats del petroli els trobarem lligats a la matriu sòlida (orgànica-mineral) dels aquífers i no en la fracció líquida, afavorint per tant la formació de biofilms en substrats sòlids hidrofòbics.

És encara difícil caracteritzar, o fins i tot predir, l'evolució de les funcions o la xarxa metabòlica de les comunitats microbianes ambientals (Junca, Pieper 2010). Una aproximació per a caracteritzar l'evolució de les poblacions microbianes és l'anàlisi de diversos gens funcionals, que codifiquen per determinades funcions, ja sigui relacionades amb les condicions del medi (acceptors finals d'electrons) com per la degradació dels contaminants objectiu.

El procés de desnitrificació heteròtrofa és el principal mecanisme biològic pel qual el nitrogen fixat al sòl i als ecosistemes aquàtics retorna a l'atmosfera. Els microorganismes capaços de dur a terme la desnitrificació estan àmpliament distribuïts, però es coneix poc sobre la seva abundància real.

El procés de desnitrificació implica la reducció seqüencial del nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), a òxid nítrós ( $\text{N}_2\text{O}$ ), i finalment a nitrogen molecular gas ( $\text{N}_2$ ). Cadascun dels diferents passos bioquímics estan governats per un enzim determinat (figura 6.1.)



**Figura 1.18.** Procés de desnitrificació i enzims implicats.

D'entre aquest grup de gens, *nosZ* s'ha escollit *nosZ* com a indicador de potencial desnitrificació per diverses raons. Primerament, està implicat en producció de nitrogen molecular, pas determinant per poder parlar de desnitrificació completa. En segon lloc, tots els organismes que tenen el gen *nosZ* contenen també *narG*. Per últim, el gen *nosZ* és més robust per ser estudiat per qPCR, i no tant polifilètic com el gen *narG*, pel qual es necessita utilitzar un fragment gènic excessivament gran per poder-lo quantificar mitjançant qPCR (Philippot 2002).

*Gens funcionals interessants a ser estudiats en processos de degradació d'alquilbenzens:*

Donat que els alquilbenzens contenen grup alquílic de cadena llarga (tipus alcà) i un anell aromàtic, els gens funcionals estudiats codifiquen per a enzims que estan relacionats amb processos de biodegradació d'alcans ( $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{20}$ ) i compostos monoaromàtics alquilats (tipus BTEX), tant en condicions aeròbies com anaeròbies.



Pel que fa a la biodegradació de hidrocarburs l'*alkB* és el gen que codifica per l'alcà hidroxilasa, hidroxilant els alcans en posició terminal. Té una gran variabilitat, amb uns 60 homòlegs. Tot i que el mecanisme de la hidroxilació d'alcans encara no ha estat completament entès, s'ha comprovat que l'alcà hidroxilasa és un dels enzims clau del procés (Rojo 2009). *alkB* és la hidroxilasa més important i prevalent en els bacteris degradadors d'hidrocarburs, per davant d'altres oxidases com P450, *AlmA* i *LadA* (Wang, Wang et al. 2010). Aquest gen, doncs, pot ser emprat com a marcador molecular de microorganismes degradadors d'alcans i per predir la potencial bioatenuació dels emplaçaments contaminats (Wang, Wang et al. 2010).

El *bssA* és un gen catabòlic que codifica per la subunitat llarga (alfa) de la benzil succinat sintasa, associat amb el primer pas de la degradació anaeròbia de toluè i xilè. Ha estat detectat en cultius que degraden el toluè sota condicions desnitrificants, sulfat reductores, ferro reductores i metanogèniques (Beller, Kane et al. 2002).

El gen *tod* codifica per la toluè dioxigenasa, l'enzim que catalitza la reacció de dioxigenació del toluè. Està associat al primer pas de la degradació aeròbia dels anells aromàtics (Baldwin, Nakatsu et al. 2003).

Malgrat la gran diversitat de tècniques existents per a l'anàlisi de les comunitats microbianes i la seva evolució al llarg dels episodis de contaminació i bioremediació, no n'hi ha cap que proporcioni una informació exempta de limitacions o biaixos (taula 1.9.). La millor aproximació per a l'estudi de les poblacions microbianes és la combinació de diverses metodologies.

**Taula 1.9.** Vista general de mètodes disponibles per la valoració de bacteris al sòl. Adaptació de (van Elsas, Boersma 2011). En negreta, les tècniques emprades en aquesta tesi. Reproducibilitat: Alta (SD mitja <10%), Mitja (SD mitja 10-25%), Baixa (SD mitja >25%).

Mètode	Repr	Interpretació resultats	Avantatges	Desavantatges	Observacions
<b>Cultiu (plating)</b>	Mitja	Informació limitada de les poblacions actives	Permet posterior anàlisi metabòlic o genomes totals	Baixa resolució, morfotips difícils de distingir, falta de representativitat. Pocs microorganismes poden ser cultivats.	
<b>Extracció de DNA</b>	Alta	Panorama de la microbiota existent	Fàcil accés als gens de la població microbiana total	Propens al mostreig esbiaixat, dependència de la matriu.	Base dels anàlisis moleculars
<b>PCR/qPCR</b>	Alta	Representació dels organismes o gens amplificats i/o quantificats	Tècniques rutinàries, alta sensibilitat, permeten quantificació.	Inhibició, biaixos	
<b>Fingerprinting</b>	Alta	Visió general de les comunitats microbianes predominants i canvis poblacionals	Facilita la comparació entre mostres	Només 0'1% de la comunitat es representada. Biaixos, obstacles deguts a la naturalesa de les tècniques de separació.	El DGGE/t-RFLP és un mètode rutinari per al fingerprinting.
Llibreries de clons	Mitja	Recomptes de les seqüències dominants en la comunitat	Permet estimació de diversitats	Preparació de la mostra laboriosa. Biaixos de clonatge.	
Isòtops estables	Alta	Informació sobre la incorporació dels compostos objectiu a la comunitat microbiana: microbiota activa	Informació sobre la població activa, permet elucidar la relació entre estructura i funció.	Problemes amb microorganismes oportunistes, l'activitat dels microorganismes que transformen inicialment el contaminant pot ser molt baixa.	Apreciat per descriure activitats <i>in situ</i> .
Micro-arrays	Mitja	Diversitat en nivell filogenètic o funcional	Informació directa en seqüències	Només els gens buscats es troben. Problemes deguts a cross-hybridation entre seqüències de baixa homologia.	
<b>NGS</b>	Mitja-Alta	Gran quantitat d'informació en la totalitat de la comunitat	Alt potencial per estudis comparatius	Propens a error, problemes amb la interpretació de resultats.	Molts estudis en els darrers 5 anys.

# Capítol 2

## Objectius



Els **objectius generals** de la present tesi són:

- Avaluar diferents aproximacions per a la remediació d'un emplaçament real contaminat per alquilbenzens lineals (LABs), amb l'objectiu de proporcionar informació per a la presa de decisions en la gestió de la contaminació.
- Caracteritzar les comunitats microbianes presents en l'emplaçament contaminat i conèixer la seva dinàmica poblacional enfront diferents estratègies de bioestimulació i remediació fisicoquímica. Assignar funcionalitats potencials a la diversitat microbiana trobada

Aquests objectius generals es poden concretar en uns **objectius específics**, que són:

- Avaluar la biodegradabilitat dels LABs en condicions *in vitro* per part tant de consorcis microbians al·loctons com de la microbiota autòctona, i avaluar l'efecte de diferents condicions de bioestimulació.
- Avaluar la biodegradabilitat dels LABs *in vitro* a escala de laboratori per part de la microbiota autòctona en condicions aeròbies i desnitrificants.
- Estudiar els canvis en la comunitat microbiana al llarg del procés de biodegradació dels LABs en diverses condicions redox.
- Estudiar l'acoblament de tècniques químiques i tècniques biològiques de remediació, valorant l'efectivitat global de la combinació de processos i llur afectació sobre les poblacions microbianes implicades.
- Avaluar l'efectivitat de tecnologies de bioestimulació i d'oxidació química en columnes de sòl. Estudiar l'efecte dels diversos factors sobre la microbiota autòctona implicada.
- Comparar els resultats obtinguts mitjançant l'ús de diferents tècniques microbiològiques, clàssiques i moleculars, després de la seva aplicació a una mateixa comunitat microbiana, tant *in vitro* com *in situ*.
- Transferir els resultats obtinguts al laboratori als responsables de la gestió de l'emplaçament contaminat, per tal de facilitar la presa de decisions en la implementació de la biotecnologia de la bioremediació.



# Capítol 3

## Material i mètodes





### **3.1. Mètodes d'anàlisi química**

#### **3.1.1. Extracció de TPH**

##### **3.1.1.1. Líquid-líquid**

S'han realitzat extraccions líquid-líquid per al seguiment dels TPH presents en medi líquid en els capítols 5 i 6 (assaigs de degradació en *batch*). Abans de l'extracció, s'ha afegit una solució de pentadecilbenzè en acetona a cada erlenmeyer o ampolla com a patró intern, amb una concentració final de 30 µg/ml. Cada mostra es va acidificar amb HCl 0'5N fins a un pH inferior a 2'5. Seguidament, cada mostra es va extreure 3 vegades consecutives amb 15 ml de diclorometà (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) qualitat equivalent per l'anàlisi de pesticides (Scharlab) Els extractes s'han deshidratat per percolació a través de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre, i concentrat en un rotavapor (Büchi) fins a un volum aproximat de 1 ml.

Per a realitzar un *clean-up* de l'extracte, aquest s'ha concentrat sota un flux suau de nitrogen fins a un volum aproximat de 100 µl, el qual s'ha carregat i eluït a través d'una columna d'alúmina (2 g), amb una barreja de 10 ml d'hexà:diclorometà (1:1). L'extracte s'ha concentrat novament fins a 1 ml, per poder ser analitzar posteriorment mitjançant cromatografia de gasos (apartat 3.1.2.)

##### **3.1.1.2. Sòlid-líquid**

Per a la determinació i seguiment del contingut en TPH en mostres de sòl s'han realitzat extraccions sòlid-líquid mitjançant Soxhlet i mitjançant microones.

###### **3.1.1.2.1. Extracció mitjançant Soxhlet**

El mètode d'extracció mitjançant Soxhlet s'ha emprat per determinar la concentració del contaminant al sòl in situ (capítol 4)

El sòl, tamisat a 2 mm, s'ha assecat a temperatura ambient durant 24 hores. A continuació, s'ha afegit a 10 g de sòl una solució de pentadecilbenzè com a patró intern. El sòl s'ha barrejat amb 10 g de sulfat sòdic anhidre, i s'ha mesclat el conjunt. A partir d'aquesta barreja, s'ha realitzat una extracció en Soxhlet durant 6 hores, emprant com a solvent una mescla diclorometà:acetona (1:1) (v/v). L'extracte orgànic resultant s'ha deshidratat usant Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre i evaporat en un rotavapor (Büchi) fins a 1 ml.

Els extractes s'han netejat per percolació a través d'una columna d'alúmina (2 g), eluint amb una barreja d'hexà:diclorometà (1:1). L'extracte final s'ha concentrat fins a 1 ml.

###### **3.1.1.2.2. Extracció mitjançant microones (Microwave Assisted Extraction)**

El mètode d'extracció mitjançant microones s'ha emprat durant els experiments d'acoblament de les tècniques de bioremediació i oxidació química (capítols 7 i 8).

Abans de l'extracció, s'ha afegit a una solució de pentadecilbenzè en acetona a cada erlenmeyer, obtenint una concentració final de 50 µg/ml als microcosmos com a patró intern.

Primerament, l'aigua s'ha eliminat de les mostres abocant-la amb cura. A continuació, per assecar la mostra, s'han afegit 4 g de sulfat de sodi anhidre. Un cop assecada la mostra, s'han afegit 30 ml d'una solució hexà:acetona (1:1).

Les extraccions s'han dut a terme amb un sistema d'extracció assistida per microones de recipient tancat Ethos Ex (Milestone), a 120°C durant una hora. A continuació, el solvent s'ha separat de la fase sòlida per decantació, i s'ha rentat tres

vegades amb 5 ml d'hexà. El producte s'ha evaporat usant un rotavapor i ajustat a 10 ml d'hexà sota un flux de nitrogen.

Els extractes s'han deshidratat percolant a través de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre.

### **3.1.2. Determinació cromatogràfica de TPH**

#### **3.1.2.1. GC-MS**

Els anàlisis de GC-MS s'han dut a terme per identificar els compostos inicialment.

Els anàlisis de GC-MS s'han dut a terme usant un cromatògraf Hewlett-Packard 5890 series II amb un detector selectiu de masses 5989. Els compostos s'han separat en una columna capil·lar HP-5 de 30 m x 0,25 mm de diàmetre intern x 0,25 µm de gruix de pel·lícula. Com a gas portador s'ha usat heli.

Les dades s'han adquirit en mode *full scan* amb un interval de masses de 50 a 490 daltons (2,4 escombrats s<sup>-1</sup>) a una energia de 70 eV, amb un retard de dissolvent de 5 minuts.

La rampa de temperatura és la mateixa que per al GC-FID. La temperatura de l'injector i el detector s'ha fixat en 290 i 315°C, respectivament.

#### **3.1.2.2. GC-FID**

Els anàlisis de GC-MS s'han dut a terme per quantificar els compostos un cop identificats per GC-MS.

Les fraccions resultants del *clean-up* es van injectar en un cromatògraf de gasos Trace 2000 (Thermo Quest, Milà, Itàlia), acoblat a un detector de ionització en flama (GC-FID), equipat amb una columna capil·lar DB-5 (J&W Scientific Products GmbH, Köln, Germany), de 30 m x 0,25 mm de diàmetre intern x 0,25 µm de gruix de pel·lícula. Com a gas portador s'ha usat hidrogen d'elevada puresa (5.0, Abelló Linde) a una velocitat mitjana de 40 cm s<sup>-1</sup>.

La temperatura de l'injector s'ha fixat a 280°C i s'ha operat sense partició de cabal (*splitless*), mantenint les vàlvules tancades 0,80 min. El programa tèrmic ha consistit en: 50 °C inicials durant 2 min més tres rampes, la primera de 10°C min<sup>-1</sup> fins a 150°C, la segona a 6°C min<sup>-1</sup> fins a 250 °C i la tercera a 10°C min<sup>-1</sup> fins a 300°C, amb una isoterma final de 5 min. Les temperatures del detector s'ha fixat a 310°C. El flux d'heli (puresa 5.0, Abelló Linde)s'ha fixat en 1.1 ml min<sup>-1</sup> i el volum d'injecció en 1 µl.

##### **3.1.2.2.1. Quantificació (GC-FID)**

L'àrea de pic del patró intern de la mostra s'ha usat per corregir les dades quantitatives. La degradació de les mostres s'ha avaluat relacionant les àrees (obtingudes per GC-FID) dels diversos isòmers usant corbes de calibratge estàndard per a cada isòmer, a partir de patrons de LABs terminals C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub> (AccuStandard).

#### **Tractament estadístic**

Per tal de confirmar (o descartar) l'existència de diferències estadísticament significatives entre mostres, s'han realitzat tests ANOVA de comparació de mitjanes, utilitzant el paquet estadístic SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

### 3.1.3. Determinació de l'aromaticitat

L'aromaticitat d'extractes orgànics no fraccionats s'ha determinat per ressonància magnètica nuclear ( $^{13}\text{C}$ -RMN) en un espectròmetre Mercury 400F, operant a 300 MHz. La variació de la intensitat de la mostra s'ha quantificat en relació amb l'estàndard intern tetrametilsilà dissolt en  $\text{CDCl}_3$ .

La quantitat de carboni aromàtic s'ha obtingut a partir de la intensitat dels pics en el rang 100-170 ppm, mentre que la quantitat de carboni alifàtic s'ha obtingut a partir del rang entre 8-58 ppm. La quantitat d'hidrogen aromàtic s'ha obtingut a partir de la intensitat dels pics en el rang 6-9 ppm, mentre que la quantitat de carboni alifàtic s'ha obtingut a partir del rang entre 0-4 ppm. L'índex d'aromaticitat (IA) s'ha definit segons l'equació descrita prèviament (Sugiura, Ishihara et al. 1997).

$$\text{IA Carboni} = \frac{\text{carbonis aromàtics}}{\text{carbonis aromàtics} + \text{carbonis alifàtics}}$$
$$\text{IA Hidrogen} = \frac{\text{protons aromàtics}}{\text{protons aromàtics} + \text{protons alifàtics}}$$

### 3.1.4. Determinació de la biodisponibilitat de la mostra

La fracció biodisponible s'ha determinat per triplicat usant extraccions de Tenax® tal i com ha estat prèviament descrit (Cuypers, Pancras et al. 2002).

Per cada gram de sòl sec s'han afegit 1 g de Tenax®, 10 mg de  $\text{NaN}_3$  i  $\text{CaCl}_2$  0'01 M fins a un volum total de 40 ml. Després d'agitar horitzontalment durant 24 h a 20°C, el Tenax® s'ha separat de les partícules de sòl emprant un embut de decantació i rentat amb  $\text{CaCl}_2$  0'01M.

Per tal d'obtenir la fracció TPH biodisponible, els grànuls de Tenax® s'han extret mitjançant extracció per microones (MAE, apartat 3.1.1.2.2.)

### 3.1.5. Anàlisi dels gasos de l'espai de cap

L'anàlisi dels gasos en l'espai de cap s'ha realitzat durant els experiments d'acoblament de les tècniques de bioremediació i oxidació química (capítols 7 i 8).

La determinació de les concentracions d'oxigen i diòxid de carboni en *batch* (flascons de 110 mL de capacitat nominal amb 4 g de sòl i 10 mL d'aigua subterrània) es va dur a terme mostrejant l'espai de cap a través del tap de tefló crimpat, amb una xeringa hamilton de mostreig de gasos de 2 ml de capacitat en diferents campanyes de mostreig durant els períodes d'incubació.

L'anàlisi  $\text{O}_2$  i  $\text{CO}_2$  a l'espai de cap s'ha dut a terme en un cromatògraf GC 2010 (Shimadzu) amb columnes en paral·lel, a 65°C amb heli com a *carrier gas*. La injecció de tipus *loop* i el detector de conductivitat (TCD) s'han realitzat a 120°C i 150°C, respectivament.

Usant el volum d'espai de cap i el contingut de  $\text{O}_2$  i  $\text{CO}_2$  del gas present es va calcular la producció acumulativa de  $\text{CO}_2$  i el consum d'oxigen.

El monitoratge ha permès tant quantificar la respiració microbiana com assegurar condicions d'aerobiosi o anaerobiosi dins les ampolles. En el cas de voler mantenir les condicions d'aerobiosi, el gas dins les ampolles s'ha canviat per aire quan la concentració d'oxigen era menor al 10%.

### **3.1.6. Determinació del pes sec i la matèria orgànica del sòl**

El pes sec s'ha calculat per diferencial en gravimetria abans i després de 24 hores a 105°C. El contingut en matèria orgànica s'ha determinat per diferencial de gravimetria abans i després de dotze hores d'ignició a 550°C. El pH del sòl s'ha mesurat en el sobrenedant d'una mescla d'1g de sòl amb 2'5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0'01M (Pansu, Gautheyrou 2006).

### **3.1.7. Preparació del sòl contaminat**

El sòl, procedent dels testimonis dels piezòmetres P11, P12, P13 i P14, s'ha triturat amb una trituradora de mandíbules (Servei de Làmina Prima, Facultat de Geologia, UB), s'ha quartejat per obtenir-ne alíquotes representatives i s'ha tamisat amb un tamís de 2 mm de llum. El sòl considerat contenia un 2'24% de matèria orgànica.

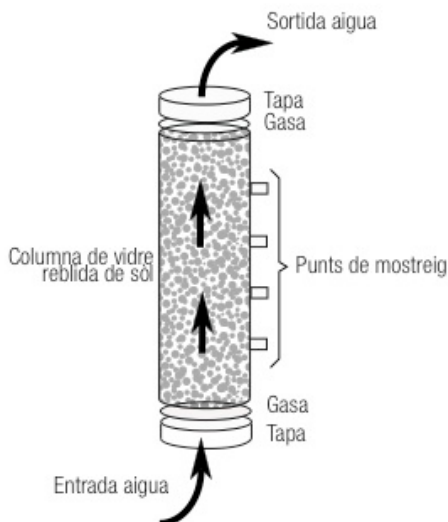
A continuació, el sol es va dopar amb LABs de la fase lliure dissolta en una solució amb 1:1 acetona:hexà la qual es va barrejar amb el sòl en una campana d'extracció de gasos. La mescla es va deixar evaporar i el sòl es va homogeneïtzar en un contenidor rodant rodabarrils durant 24 hores. La concentració mitjana de TPH del sol dopat fou al sòl emprat al capítol 7 i 6035 mg/kg ± 147 mg/kg per al sòl emprat en el capítol 8.

### **3.1.8. Set up de columnes de sòl**

Les columnes usades per empaquetar el sòl dopat eren de vidre, feien 25 cm de longitud i 4 cm de diàmetre, amb 4 punts de mostreig situats cada 5 cm. La base i el cap de la columna eren estancs mitjançant taps de rosca de tefló. Les columnes s'han reblert de sòl dopat assecat. Les columnes s'han connectat a un sistema de flux que fa circular l'aigua desionitzada per humidificar-les de baix cap a dalt. Un cop estables, les columnes s'han caracteritzat hidrodinàmicament i s'han colonitzat amb aigua procedent de l'aqüífer a (velocitat) durant 15 dies.

### **3.1.9. Caracterització hidrodinàmica de les columnes de sòl**

S'ha realitzat un estudi de les propietats hidrodinàmiques de les columnes de sol emprant assaigs de traçador per assegurar la homogeneïtat de la columna. Els assajos s'han dut a terme usant una solució de NaCl de 925 µS/cm i realitzant un seguiment de la conductivitat en continu amb un conductímetre (Crison), per poder construir les corbes de saturació.



**Figura 3.1.** Esquema del muntatge de cada columna de sòl

### 3.2. Mètodes microbiològics

#### 3.2.1. Medis de cultiu i reactius

Llevat que s'indiqui el contrari, els medis de cultiu preparats (TSB, extracte de llevat, triptona), els agars i les agaroses son de Conda. Les sals amb què s'han preparat els medis son de Merck. Tots els medis s'han preparat en aigua milliQ.

Els medis preparats i els reactius usats han estat els següents:

- Brou Bushnell-Haas (BHB): 0,2 g/L  $MgSO_4$ , 1g/L  $KH_2PO_4$ , 0,02 g  $CaCl_2$ , 1 g/L  $(NH_4)_2HPO_4$ , 1 g/L  $KNO_3$ , 0,05 g/L  $FeCl_3$ .
- LB (medi Luria-Bertani): 10 g/L triptona, 5 g/L extracte de llevat, 10 g/L NaCl. Ajustat a pH 7'0.
- Barreja LABs per als recomptes per NMP: 15 mg/mL d'una barreja de  $1C_{10}$ - $1C_{15}$ , de AccuStandard
- TSA
- TSB
- GAE: 22 g/L glucosa, 1'125 g/L extracte de llevat, 2'25 g/L L-asparagina
- LB agar: LB+15g/L agar.
- LB ampil·lina: LB + 0,1 g/L ampil·lina (Roche Molecular Biochemicals)
- LB ampil·lina agar: LB agar + 0,1 g/L ampil·lina.
- LB AXI agar: LB ampil·lina agar + 0,1 g/L Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranòsid (IPTG, Merck), 40 mg/L 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranòsid (X-gal, Merck).
- Medi mineral (BMTM): 4,25 g/L  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 1 g/L  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 2 g/L  $NH_4Cl$ , 0,2 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 123 mg/L àcid nitril triacètic-diNa, 12 mg/L  $FeSO_4$ , 3 mg/L  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 3 mg/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mg/L  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ .
- TAE 50x: 2 M tris base (Pharmacia Biotech), 1 M acetat sòdic, 50 mM EDTA Tritriplex III. pH 8,0.
- TBE 10x: 0,9 M tris base, 0,9 M, 0,9% àcid bòric (Sigma-Aldrich), 20 mM EDTA. pH 8,0.
- TE: 10 mM tris i 1mM EDTA. pH 8,0.
- Solució concentrada de nutrients (capítol 6):  $KH_2PO_4$  1.1M,  $Na_2HPO_4$  0.3M,  $NH_4Cl$  0.056M,  $Mg_2SO_4$  0.4mM,  $NaNO_3$  0.2M,  $NaNO_2$  0.2M), 0.05 ml de solució de

vitamines (biotina 20 mg/L, tiamina 50 mg/L, riboflavina 50 mg/L, àcid fòlic 20 mg/L, àcid pantotènic 50 mg/L, B12 1 mg/L, àcid p-aminobenzoic 50 mg/L, hidroclore de piridoxina 100 mg/L, àcid tiòctic 50 mg/L i nicotinamida 50 mg/L) i 0.05 ml de solució d'elements traça (EDTA 250 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  25 mg/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  25 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  7.5 mg/L,  $\text{ZnSO}_4$  110 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  7.5 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  5 mg/L i  $\text{CaCl}_2$  5.5 mg/l, ajustada a pH 6 amb KOH)

- Solució concentrada de nutrients (capítols 7 i 8): solució concentrada (1:10) formada per 10 ml de solució de macro nutrients (170 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 37 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 9 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) i 0.6 ml de solució d'elements traça (2 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2g/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.5g/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 30mg/L  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg/L  $\text{ZnCl}_2$ , 50mg/L  $\text{HBO}_3$ , 90mg/L  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 100mg/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1g/L EDTA (tripex 2), 1ml/L HCl 36%)

- Solució catalitzadora (experiment d'oxidació química): mescla composta d'àcid cítric (34,8 g/L) i  $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (19'4 g/L).

### **3.2.2. Recompte de microorganismes mitjançant el Nombre Més Probable (NMP)**

Les poblacions heteròtrofa i degradadores d'alquilbenzens s'han quantificat mitjançant la tècnica del nombre més probable (MPN) miniaturitzat en plaques de microtitulació amb vuit rèpliques per dilució (Wrenn, Venosa 1996).

Per al recompte d'heteròtrofs s'han usat els medis TSB i TSB 1:10. Per al recompte de degradadors d'alquilbenzens s'ha usat el medi BMTM amb una barreja de LABs (vegeu punt 3.2.1.), i alternativament amb extracte de LNAPL (fase lliure rica en LABs) a la mateixa concentració.

### **3.2.3. Aïllament de microorganismes potencialment degradadors de LABs**

S'ha procedit a l'aïllament de soques en plaques d'agar a partir de mostres reals d'aigua subterrània contaminada per LABs. S'han sembrat plaques (per extensió i en estria) en medi mineral (BMTM) suplementat per LABs (0'1%) per obtenir soques potencialment degradadores de LABs. Les plaques s'han incubat en la foscor a temperatura ambient. Simultàniament s'han sembrat controls en agar mineral (BMTM sense font de carboni (LABs). Un cop aïllats, els microorganismes s'han resseminat en medi ric (GAE i LB).

### **3.2.4. Enriquiment in-situ de poblacions microbianes en BioSepts**

Les perles Bio-Sep® són esferes formades per un 75% de carbó actiu i un 25% de polímer aramid (Nomex), amb una estructura porosa (74% de porositat i 600 m<sup>2</sup>/g d'àrea superficial). Els Bioseps es poden dopar amb diferents fonts de carboni i acceptors d'electrons per promoure el creixement d'aquelles poblacions microbianes actives en les condicions ambientals de l'aquífer.

Els BioTraps (contenidors de tefló amb ranures de 1 mm) contenint les perles Bio-Sep®, dopades o no amb LABs, s'han incubat dins l'aquífer durant 30 dies. A continuació, s'han retirat i transportat en fred (4°C) al laboratori, on s'han obert els BioTraps i s'ha procedit a l'extracció d'àcids nucleics de les comunitats microbianes que han colonitzat la superfície dels Bioseps. La comunitat microbiana s'ha estudiat per PCR-DGGE del gen 16SrRNA.

### 3.2.5. Extracció d'àcids nucleics

El DNA genòmic de tota la comunitat s'ha extret de diferents orígens (aigua, sòl, BioSeps, filtres de 0,2 µm) usant el kit d'extracció PowerSoil (MoBioLaboratories, SolanoBeach, CA, EUA) seguint les instruccions del fabricant. No s'ha requerit posterior purificació per tal d'evitar inhibicions en la posterior PCR. Els extractes de DNA s'han visualitzat en gels d'agarosa (1 i 1.5% p/v en tampó TBE 0.5x ) a 100 V durant 60 minuts. S'han tenyit durant 15 min en una solució de bromur d'etidi (Sigma-Aldrich) a una concentració final de 0,75 µg/mL en TBE 0,5x. Els gels s'han observat en un transil·luminador sota llum UV i digitalitzat en un ImageMaster (PharmaciaBiotech). Per a l'estimació de la longitud dels fragments de DNA separats, s'ha usat el marcador λ-HindIII (Promega) i el marcador 100bp ladder (Gibco BRL).

### 3.2.6. Amplificació de gens 16S rRNA per PCR

Les regions hipervariables V3-V5 del gen 16sRNA s'han amplificat per PCR a partir del DNA genòmic extret de diferent tipologia de mostres, bandes de DGGE escindides, i plasmidis de clons seguint el mateix protocol. Les reaccions de 25 µl de volum final s'han dut a terme en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). La composició de cada reacció de PCR es presenta a la taula 3.1.

**Taula 3.1.** Composició d'una reacció de PCR

Component	Volum (µl)	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	17, 375	
Tampó (10x) (20 mM Mg <sup>2+</sup> )	2,5	1X (2 mM)
Solució de dNTP (2,5 mM)	2	200 µM
Encebador F (10 µM)	1,25	0,5 µM
Encebador R(10 µM)	1,25	0,5 µM
Polimerasa ExTaq Hot Start (10 U/µl)	0,125	2,5 U

### 3.2.7. Estudi de les comunitats microbianes per DGGE

Els amplicons de la regió V3-V5 de gens 16SrRNA obtinguts prèviament per PCR s'han fet migrar mitjançant electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant (DGGE) de poliacrilamida al 8% (p/v), de 0.75 mm de gruix i amb un gradient desnaturalitzant amb concentracions creixents de formamida-urea en el sentit de migració electroforètica. El 100% desnaturalitzant es defineix a la concentració 7 M d'urea amb un 40% de formamida desnaturalitzada (p/v).

L'electroforesi s'ha dut a terme a 60°C i 100 V durant 16h en una solució 1x TAE, en un aparell *DGGE-4001* (CBS Scientific Company, Del Mar, CA).

Posteriorment, els gels de DGGE s'han tenyit durant 45 min en una solució de SybrGold™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) en 1x TAE. A continuació s'han escanejat sota llum bava gràcies a una placa convertidora de llum UV a llum blava (UV Products Ltd).

**Taula 3.2.** Encebadors utilitzats en les PCR.

Encebador	Referència	Posició <i>E coli</i>	Seqüència 5' – 3'	Bases
16F341-GC*	Yu i Morrisson, 2004	341-357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	17
16F341	Yu i Morrisson, 2004	341-357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	17
16R907	Lane, 1991	907-926	CCG TCA A TT CCT TT(A/G) AGT TT	20

\*GC: seqüència de quaranta bases rica en GC unida a l'extrem 5' de l'encebador F341 quan s'utilitza per a estudis de DGGE: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'.

**Taula 3.3.** Descripció del programes tèrmics de PCR emprats.

Programa	Touch down	Temperatures (temps)						
		Desnaturalització inicial	Cicles	Desnaturalització	Hibridació	Elongació	Elongació final	Final
DGGE	Si	94°C (4 min)	20	94°C (1 min)	55°C (30 s)	72°C (1 min)	72°C (10 min)	4°C
Amplificació bandes	No	95°C (5 min)	20	94°C (30 s)	55°C (30 s)	72°C (45 s)	72°C (5 min)	4°C
Seqüenciació	No	95°C (5 min)	25	96°C (10 s)	55°C (5 s)	60°C (4 min)	-	8°C



Les bandes de DGGE predominants o significatives s'han escindit del gel amb un bisturí estèril, resuspès en 50 µl d'aigua milli-Q estèril i conservat a 4°C tota la nit. Una dilució 1:50 del sobrenadat s'ha reamplificat per PCR usant els encebadors R907 i F341.

Les imatges s'han processat amb el programa Quantity One 4.5.1. (Bio Rad Laboratories), corregint els carrils i bandes manualment. Els perfils de DGGE obtinguts s'han sotmès a una anàlisi estadística amb els programes StatistiXL1.8 (paquet estadístic Excel) i SPSS (versió 17, Windows, SPSS Inc. Chicago).

**Taula 3.4.** Composició de les solucions mare per preparar el gradient desnaturalitzant en un gel de DGGE.

Reactius	Concentració de les solucions mare per al gradient							
	0%	20	30	40	50	60	70	80
		%	%	%	%	%	%	%
Solució 80% desnaturalitzant (ml)	0	2,2	3,3	4,4	5,5	6,6	7,7	8,8
Solució 0% desnaturalitzant (ml)	8	6,6	5,5	4,4	3,3	2,2	1,1	0
TEMED (µl)	8	8	8	8	8	8	8	8
APS (µl)	45	45	45	45	45	45	45	45

### 3.2.8. Seqüenciació

La seqüenciació s'ha dut a terme emprant el mètode de Sanger et al. (1977), usant el kit ABI Prism Big Dye Terminator versió 3.1. (Perkin-Elmer Applied Biosystems) d'acord amb les instruccions del fabricant.

Les reaccions d'amplificació s'han realitzat en un termociclador Mastercycler (Eppendorf), segons el programa descrit en la taula 3.3., usant els encebadors F341 i R907. La mescla mare està descrita a la taula 3.5., afegint en cada cas la concentració de DNA motlle adequada en funció de la concentració.

**Taula 3.5.** Composició de la mescla mare per a una reacció de seqüenciació Sanger.

Component	Volum (µl)	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	fins a volum final 10 µl	
Encebador F (3,2µM)	1	0,32 uM
Encebador R (3,2µM)	1	0,32 uM
Polimerasa Big Dye Terminator v 3.1.	1	

Les seqüències de nucleòtids dels capítols 5, 6 i 9 s'han obtingut als Serveis Científicotècnics (Universitat de Barcelona), mitjançant un seqüenciador automàtic d'electroforesi capil·lar ABI Prism DNA 3700 (Perkin- Elmer). Les seqüències de nucleòtids dels capítols 7 i 8 s'han obtingut a Macrogen (Macrogen Europe).

### Anàlisi de les seqüències

Les seqüències s'han editat amb el programa BioEdit versió 7.0.9 (Hall, 2007) i s'han corregit manualment. S'han sotmès a una anàlisi amb el programa Check Chimera del Ribosomal Database Project II (Cole, Chai et al. 2005). Les anàlisis filogenètiques s'han dut a terme amb el programa Mega4 (Tamura, Dudley et al. 2007), que alinea les seqüències mitjançant l'eina ClustalW (Thompson, Higgins et al. 1994).

Les seqüències s'han enviat a les bases de dades genòmiques NCBI BLAST i RDP (Altschul, Madden et al. 1997, Cole, Chai et al. 2005) per a la seva comparació.

#### 3.2.9. Quantificació per PCR quantitativa

El nombre de còpies gèniques, tant de 16S rRNA com dels fragments *nosZ*, *bssA*, *tod* i *alkB* rRNA s'han quantificat amb PCR quantitativa en temps real. Cada mostra ha estat analitzada per triplicat mitjançant tres extractes independents.

La quantificació s'ha dut a terme usant Brilliant II SYBR® Green qPCR Master Mix (Stratagene) i Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR MM (Stratagene), en les condicions descrites a les taules 3.9 i 3.10. La especificitat de l'amplificació de PCR s'ha determinat per observació de la corba de melting i de l'electroforesi en gel d'agarosa del producte final. L'anàlisi de corba de melting s'ha realitzat després de l'última extensió amb una rampa de temperatura de 0.05°C/cicle entre 55°C i 95°C amb detecció continua de la fluorescència de SybrGreen.

Per a la PCR quantitativa amb SybrGreen (16S rRNA, *nosZ*, *alkB* i *TOD*) i amb sonda (*bssA*), cada reacció s'ha fet en un volum de 5 µl i 10 µl respectivament. La mescla mare s'ha fet seguint la composició de la taula 3.6 (amb SybrGreen) i la taula 3.7 (amb sonda). S'ha afegit 0.5 i 1 µl de DNA motlle respectivament (aproximadament 100 i 200 ng de DNA).

**Taula 3.6.** Mescla mare qPCR amb SybrGreen

Component	Volum (µl)	Concentració a la reacció
Aigua	1,3	
Ready reaction mix	2,5	
Encebador F (10 µM)	0,1	200 nM
Encebador R(10 µM)	0,1	200 nM
ROX Marcador/tint de referència	0,5	30 nM

**Taula 3.7.** Mescla mare qPCR amb sonda

Component	Volum (µl)	Concentració a la reacció
Aigua	1,55	
Ready reaction mix	5	
Encebador F (10 µM)	0,625	625nM
Encebador R(10 µM)	0,625	625nM
Sonda (10 µM)	0,2	200 nM
ROX Marcador/tint de referència	1	30 nM

Els primers emprats per a les reaccions de qPCR són descrits en la taula 3.8, tots ells purificats per HPLC. Les corbes estàndard han estat construïdes amb els gens de referència descrits (Taula 3.8.) clonats dins el *vector plasmídic* PGEM usant PGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI). Tots els gens de referència s'han quantificat mitjançant Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent usant MX3000P (Stratagene) com a sistema detector. Les corbes estàndard s'han creat usant dilucions seriades de quantitats conegudes del plasmidi en el rang de 10 a 10<sup>8</sup> còpies.

**Taula 3.8.** Característiques dels encebadors.

Gen	Encebador	Referència	Seqüència 5' – 3'	Bases
16S	16S-519F	(Muyzer, Smalla 1998)	5'-GCCAGCAGCCGCGGTAAT-3'	18
	16S-907R		5'- CCGTCAATTCCCTTTGAGTTT -3'	20
nosZ	nosZ-f	(Kandeler, Deiglmayr et al. 2006)	5'-CGYTGTTTCMTGACAGCCAG-3'	20
	nosZ-r		5'-ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC-3'	23
alkB	alkB-f	(Powell, Ferguson et al. 2006)	5'-AAC TAC MTC GAR CAY TAC GG-3'	20
	alkB-r		5'-TGA MGA TGT GGT YRC TGT TCC-3'	21
TOD	TOD-f	(Baldwin, Nakatsu et al. 2003)	5'-ACC GAT GAR GAY CTG TACC-3	18
	TOD-r		5'-CTTCGGTCMAGTAGCTGGTG-3	20
bssA	bssA-f	(Beller, Kane et al. 2002)	5'-ACGACGGYGGCATTCTC-3'	18
	bssA-r		5'-GCATGATSGGYACCGACA-3'	18
	bssA sonda Zen (IDT)		FAM-5'- CTTCTGGTTCTTCTGCACCTGGACACC- 3'TAMRA	28

En tots els casos, les eficiències d'amplificació han estat majors del 95%, i els coeficients de correlació de les corbes estàndard han estat entre 0.997 i 0.993. Tots els resultats han estat processats amb el software de MxPro™ QPCR Software.

**Taula 3.9.** Condicions de la PCR quantitativa amb SybrGreen

Programa tèrmic									
Gen	Primers	Desnaturalització inicial	Desnaturalització	Hibridació	Extensió	Cicle	Lectura	Font primers	Estàndard
16S	519F 907R	95° 10 min	95°C 30 sec	50°C 30 sec	72°C 30 sec	40	80°C 15sec end	Lane, 1992 Muyzer 1995	Desulfovibrio vulgariss sp. vulgaris ATCC 29579, inserted in a TOPO TA vector (Invitrogen, Belgium)
nos Z	nosZ-F nosZ-R	95° 10 min	95°C 30 sec	62°C 60 sec	72°C 45 sec	40	80°C 15sec end	Kandeler 2006 Throback 2004.	Pseudomonasfluorescens DSM 50415.
alkB	alkB-F alkB-R	94° 10 min	94°C 20 sec	52°C 30 sec	72°C 45 sec	40	80°C 15sec end	Powell, 2006	Rhodococcus fascians ATCC 12974

**Taula 3.10.** Condicions de la PCR quantitativa amb sonda

Programa tèrmic										
Gen	Primers	Sonda	Desnaturalització inicial	Desnaturalització	Hibridació	Extensió	Cicles	Lectura	Font primers	Estàndard
bssA	bssA-F bssA-R	bssA probe 200mM	95° 10 min	95°C 15 sec	58°C 60 sec	-	42	58°C end	(Beller, Kane et al. 2002)	Thauera aromatica DSMZ 14805

### 3.2.10. Anàlisi de comunitats microbianes per piroseqüenciació de llibreries massives (Bar-coded pyrosequencing analyses)

Els extractes de DNA diluïts (1:10) en aigua ultra pura s'han usat com a motlle per reaccions de PCR en triplicat, amplificant amb els *fusion* primers descrits a la taula 3.11.

Cada mostra s'ha amplificat per separat en presència d'etiquetes (MIDs o *unique multiple identifier*). S'han usat els MIDs X, Y, Z, A, C, G (un diferent cada tipus de mostra) del set recomanat (Roche Diagnostics, 2009). Cada encebador F341 comença a 5' amb l'adaptador de primer A, seguit de la *seqüència key* (*starter de la polimerasa*), el MID seleccionat, i finalment la seqüència pròpiament del primer *forward*. Cada encebador *reverse* comença contenint a 5', l'adaptador B que s'uneix als beads, i no conté seqüència starter ni MID. A continuació té la seqüència pròpia del primer *reverse*.

**Taula 3.11.** Descripció dels *fusion primers* utilitzats per a realitzar la piroseqüenciació de llibreries massives de gens 16SrRNA

Encebador o seqüència	Seqüència (5'-3')	Font
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Kolton, Meller Harel et al. 2011)
802R	TACCAGGGTATCTAATCC	(dos Santos, Cury et al. 2011)
Adaptador A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	
Adaptador B	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC	
Seqüència clau de llibreria	TCAG	

Les reaccions de PCR s'han dut a terme amb el mateix programa i reactius de PCR descrit per amplificació prèvia per a gels de DGGE (veure punt 3.2.7.), amb els primers sense la cua de GC. Les reaccions per triplicat s'han agrupat entre elles i purificat amb el sistema de purificació PCR clean-up system (Promega, WI, USA), i eluït en 50 µl d'aigua ultra pura. La concentració de les mostres s'ha mesurat usant Quant-iT Picogreen dsDNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) abans de combinar-los en una sola mostra en concentracions equimolars de les diferents mostres i adequada per al protocol de seqüenciació.

La mostra s'ha seqüenciat al Departament de Genòmica del Parc Científic de Barcelona (Universitat of Barcelona) usant el 454 Life Sciences Titanium Platform (Roche).

#### Anàlisi bioinformàtica dels resultats de piroseqüenciació

L'escurçament, eliminació de seqüències errònies i tria de seqüències d'elevada qualitat (Q20) (*trimming*) de les seqüències de gens 16SrRNA en llibreries s'ha realitzat usant el Ribosomal Data Project-II (RDP-II) pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>), creant sis conjunts de dades. L'alineació de seqüències i el clustering posterior han usat el mateix *pipeline* (Cole, Wang et al. 2009). Cada conjunt ha estat classificat individualment usant l'eina RDP Classifier, amb un *bootstrap cutoff* del 80%.

La comprovació i eliminació de quimeres i les anàlisis d'alfa i beta diversitat s'han dut a terme usant el software MOTHUR versió 1.24.0 (Schloss, Westcott et al. 2009).

Les dades generades a partir de la piroseqüenciació han estat sotmeses al Sequence Read Archive del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### 3.3. Estratègia experimental

#### 3.3.1. Caracterització preliminar de l'emplaçament contaminat

Les dades de caracterització física i química de l'emplaçament contaminat han estat cedides pel gestor de la descontaminació de l'emplaçament.

Per a caracteritzar les aigües subterrànies, químicament i microbiològica, s'ha mostrejat l'aigua contaminada dels diversos pous, com indica la taula 3.12.

**Taula 3.12.** Mostrejos duts a terme en l'emplaçament contaminat

Data	Pous mostrejats	Anàlisis químiques	Anàlisis microbiològiques
Novembre 2005*	P0, P2, P4 i P6	✓	
Maig 2006*	P0, P2, P4 i P6	✓	
Juny 2009	P6, P7, P9, P10, P11, P12, P13, P14	✓(Determinació concentració LABs)	✓ (NMP, DGGE)
Març 2010	P6		✓ (NMP)

\*: mostrejos duts a terme pel gestor de la contaminació.

#### 3.3.2. Assaig de degradació d'alquilbenzens lineals en condicions aeròbies a escala de laboratori

##### *Assaigs de degradació usant un consorci microbià al·lòcton*

L' experiment s'ha dut a terme per duplicat en erlenmeyers de 250 ml de capacitat nominal amb 50 ml de BMTM, contenint 50 mg de LNAPL autoclavat procedent de la fase lliure del piezòmetre P6 de l'emplaçament introduïts mitjançant un cobreobjectes.

L'inòcul emprat correspon al cultiu de manteniment del consorci microbià TD, del mateix grup de recerca, que ha estat caracteritzats taxonòmicament i catabòlica (Viñas 2002). El consorci es va obtenir a partir d'una mostra de sòl exposada al degoteig intermitent de gasoil procedent d'un tanc de combustible (gasoil), la qual es va sotmetre a un procés d'enriquiment en medi mineral (BHB) i gasoil (0'1% v/v de gasoil tipus BP). Aquest consorci microbià s'ha anat subcultivant en brou BHB cada 20 dies des de la seva obtenció fa més de 10 anys. Els inòculs corresponen als cultius de manteniment, incubats durant 6 dies a 200 rpm i 25°C.

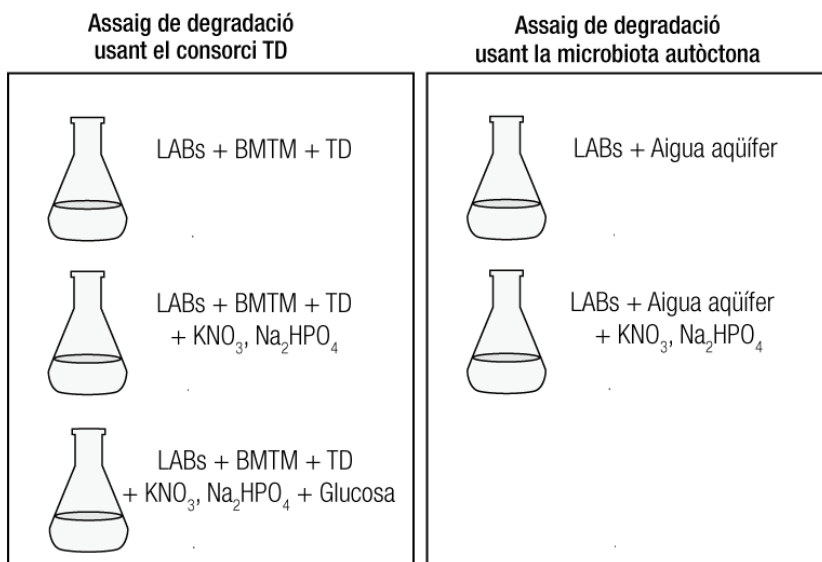
El consorci compta amb una elevada població degradadora d'hidrocarburs ( $1'8 \cdot 10^9$  i  $5'1 \cdot 10^7$  NMP/ml de degradadors d'alifàtics i aromàtics per mil·lilitre, respectivament). En cada erlenmeyer s'ha afegit un inòcul de 500 µL.

S'han testat tres condicions experimentals, totes amb inòcul (0'5 ml) i font de carboni: (1) El medi mineral (M), (2) el medi mineral suplementat amb nutrients hidrofílics (0.5 mM  $KNO_3$  i 0.35 mM  $Na_2HPO_4$  (MN), i (3) el medi mineral suplementat amb nutrients i un 1% de glucosa (MNG) (figura 3.2.).

### ***Assaig de degradació usant la microbiota autòctona de l'aigua subterrània***

L' experiment s'ha dut a terme també per duplicat en erlenmeyers de 250 ml amb 50 ml d'aigua de l'aqüífer (P6), amb 50 mg de LNAPL (P6), sense autoclavar, introduïts mitjançant un cobreobjectes. En aquest cas, l'inòcul és la mateixa aigua de l'aqüífer i el LNAPL. S'han testat dues condicions experimentals, totes amb aigua de l'aqüífer com a inòcul i medi, i font de carboni. L'aigua contaminada (G), i l'aigua suplementada amb nutrients hidrofílics (0.5 mM  $\text{KNO}_3$  i 0.35 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (GN) (figura 3.2.).

Els assaigs de biodegradació s'han incubat a 250 rpm a 25°C durant 40 dies, protegits de la llum.

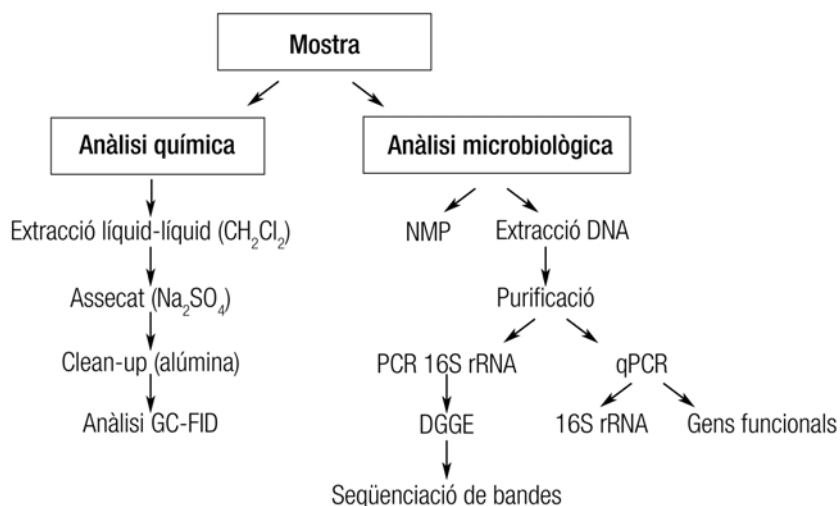


**Figura 3.2.** Diagrama dels assaigs de biodegradació realitzats

### ***Extracció i processament de les mostres***

Els assaigs de biodegradació s'han incubat a 250 rpm a 25°C durant 40 dies, protegits de la llum. S'ha realitzat una caracterització química (GC-FID dels TPH) i microbiològica de tots els assaigs de degradació als 0, 7, 14, 20 i 40 dies d'incubació (figura 3.3.).

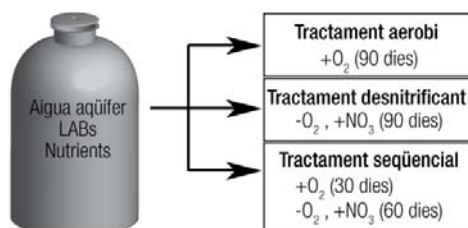
Pel que fa a la caracterització microbiològica del procés s'ha fet un seguiment (comptatges) de les poblacions heteròtrofes i degradadores de LABs mitjançant el NMP (veure 3.2.2) i s'ha estudiat la comunitat microbiana a partir del DNA total extret (veure 3.2.5) mitjançant DGGE d'amplicons de PCR de la regió hipervariable V3-V5 del gen 16S rRNA de la comunitat (veure 3.2.7).



**Figura 3.3.** Esquema del processament de les mostres

### 3.3.3. Avaluació de la biodegradabilitat d'alquilbenzens lineals en diferents condicions redox

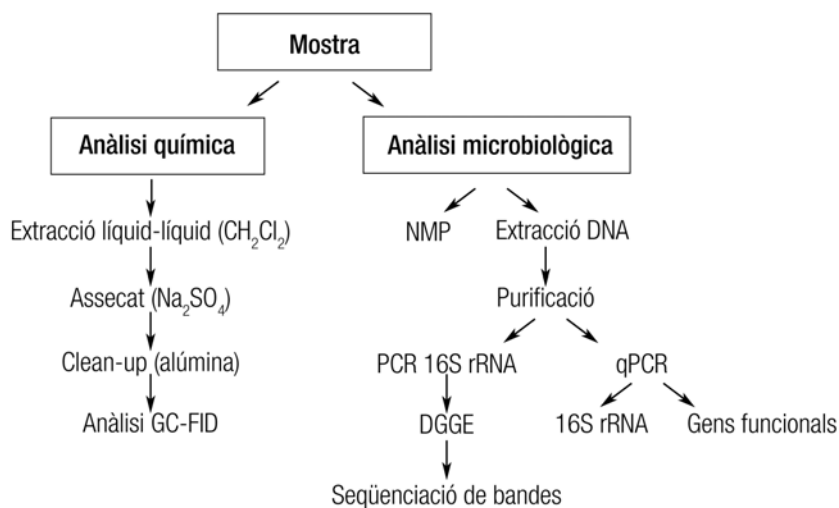
En aquest experiment s'ha avaluat un set de tres condicions experimentals: condicions aeròbies (90 dies), condicions desnitrificants (90 dies) i condicions seqüencials (aeròbies durant el període 0-30 dies i desnitrificants durant el període 31-90 dies) (figura 3.4.).



**Figura 3.4.** Estratègia experimental

Tots els assajos s'han dut a terme per triplicat en ampolles de vidre (tipus serum flask) de 120 ml de capacitat, amb 45 mL d'aigua subterrània provinent del pou P6, 5 mL de solució de nutrients i vitamines i 25 µg de fase lliure com a font de carboni adsorbits sobre un cobreobjectes. Totes les ampolles s'han incubat protegides de la llum a 250 rpm i 25°C. Les mostres s'han analitzat destructivament químicament i microbiològica als dies 0, 30, 60 i 90.





**Figura 3.5.** Diagrama de la caracterització química i microbiològica realitzada

#### Condicions aeròbies

Les ampolles contienien 45 ml d'aigua de l'aquífer (P6) i 5 ml d'una solució de nutrients ( $\text{KNO}_3$  5mM i  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$  3.5mM).

#### Condicions desnitrificants

Les ampolles contienien 45 ml d'aigua de l'aquífer (P6), 5 ml d'una solució de nutrients concentrada (veure apartat 3.2.1.). Per determinar les condicions redox s'ha afegit 0.5 ml de resazurina a cada ampolla.

Les ampolles s'han bombollejat amb nitrogen en una cambra anaeròbia durant 15 minuts i s'han segellat amb taps hermètics per assegurar condicions anòxiques tant del aigua com de l'espai de cap.

#### Condicions seqüencials

Els *batch* utilitzats durant el tractament seqüencial s'han tractat com a aerobis durant els primers 30 dies. A partir del dia 30, les condicions s'han canviat a condicions desnitrificants, bombollejant les ampolles amb nitrogen i aplicant les mateixes condicions que s'han emprat pels assaigs desnitrificants. .

### **3.3.4. Avaluació d'un sistema d'oxidació química acoblat a la bioremediació en reactors de tipus *batch***

Els experiments s'han realitzat en *batch*, emprant ampolles de vidre de 120 mL de capacitat nominal (*serum flask*) grimpades amb sèptums de goma viton.

El sòl, procedent dels testimonis dels piezòmetres P11, P12, P13 i P14, s'ha triturat amb una trituradora de mandíbules (Servei de Làmina Prima, Facultat de Geologia, UB), s'ha quartejat per obtenir-ne alíquotes representatives i s'ha tamisat amb un tamís de 2 mm de llum.

El sòl procedent d'un testimoni es pot veure a la figura 3.6.

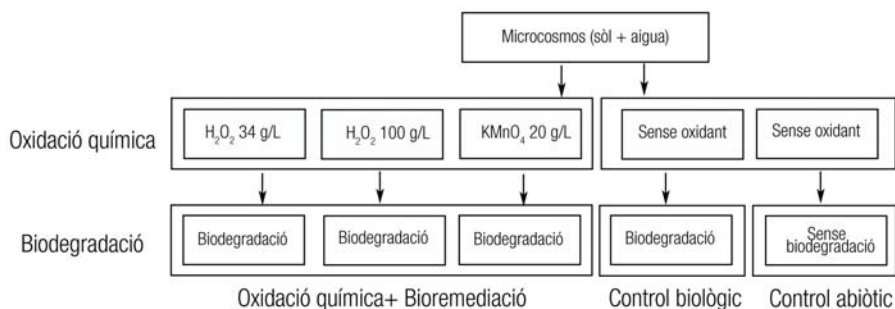


**Figura 3.6.** Testimoni de piezòmetre (pou 11).

Els LABs s'han afegit a la mostra de sòl afegint una mescla 1:1 acetona: hexà amb fase lliure dissolta, barrejant-la amb el sòl. La mescla s'ha deixat evaporar i el sòl s'ha homogeneïtzat en un rodabarrils durant 24 hores i s'ha tamisat a 2 mm de llum. La concentració de LABs al sòl s'ha quantificat en 2563 mg/kg  $\pm$  216 mg/kg (n=3).

L'avaluació s'ha fet en microcosmos (ampolles de 120 ml) contenint 4 grams de sòl sec incubats durant 48 hores en agitació amb 2 ml d'aigua de l'aqüífer (P6), i 8 ml d'aigua desionitzada.

S'han avaluat dos oxidants químics,  $\text{KMnO}_4$  i reacció de Fenton Modificada (MFR), a més de controls biòtic (sense oxidació química) i abiòtic (sense oxidació química ni biodegradació).



**Figura 3.7.** Esquema de l'experiment

### *Oxidació química*

L'oxidació química s'ha dut a terme per triplicat.

Per al  $\text{KMnO}_4$  s'ha testat la demanda estequiomètrica (quantitat necessària per oxidar el total de LABs presents a la mostra, corresponent a 20 g/L).

Per a la reacció de Fenton modificada (MFR, Modified Fenton Reaction) s'ha testat la demanda estequiomètrica (34 g/L) i una concentració més elevada (100 g/L). A les ampolles s'ha afegit una solució catalitzadora formada per 17.4 g/L d'àcid cítric i 9.7 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en una solució 0.01 M de  $\text{CaCl}_2$ . El peròxid d'hidrogen s'ha afegit en tres tercers parts repartides en tres tandes, sistema prèviament descrit com el tractament més eficient (Xu, Pancras et al. 2011). S'ha afegit cada tanta d' $\text{H}_2\text{O}_2$

passades 24 hores de l'anterior, sempre i quan no s'hagi detectat peròxid d'hidrogen romanent.

Per prevenir possibles explosions degudes a l'acumulació de gas a les ampolles, els taps no estaven completament segellats durant el temps de reacció, per a permetre l'evacuació del gas generat.

L'oxidació química s'ha donat per acabada quan tot l'oxidant ha reaccionat. En el cas del peròxid d'hidrogen, ha estat sis i deu dies (per a les concentracions baixa i alta, respectivament); i en el cas del permanganat, quaranta dies.

El peròxid d'hidrogen s'ha quantificat mitjançant tiretes reactives (Merck), i el  $\text{KMnO}_4$  mitjançant determinació espectroscòpica a 525 nm (Liang, Huang, 2008).

Al final de la fase d'oxidació química, les ampolles s'han analitzat tant química com microbiològicament.

### *Biodegradació*

En la segona fase (biodegradació dels LABs romanents), s'han afegit nutrients a les ampolles usant 1 ml de solució concentrada de nutrients (veure apartat 3.2.1.)

Per al control biòtic, s'ha analitzat la biodegradació del sòl sense tractar amb oxidants químics. El control abiòtic s'ha esterilitzat afegint 0,2 ml de  $\text{NaN}_3$  0.2M a cada ampolla. Les ampolles s'han tancat amb taps hermètics i incubat a 250 rpm a 20°C durant 28 dies.

### **Caracterització química i microbiològica**

A l'inici i el final de l'oxidació química, s'ha procedit a la caracterització química de les mostres. S'ha quantificat els LABs residuals mitjançant extracció per microones (apartat 3.1.1.2.1.) i posterior anàlisi per GC-FID (apartat 3.1.2.2.), a més d'avaluar la biodisponibilitat dels LABs (apartat 3.1.4.).

Durant la posterior biodegradació (als 0, 7, 14, 21 i 28 dies), s'ha caracteritzat químicament les mostres seguint el procediment descrit. A més, s'ha analitzat per triplicat la producció de biogàs (apartat 3.1.6.); s'ha realitzat un seguiment de la diversitat i estructura de la comunitat microbiana mitjançant PCR-DGGE (apartat 3.2.7.), i s'ha quantificat la població total i gens funcionals relacionats amb la degradació dels hidrocarburs per qPCR (apartat 3.2.9.).

### **3.3.5. Avaluació de l'efecte de l'aplicació de MFR en columnes de sòl: afectació de les poblacions microbianes**

L'objectiu principal de l'experiment és veure la degradació causada per la reacció de Fenton modificada (MFR) en columnes de sòl i l'efecte d'aquesta sobre les poblacions al llarg de la columna, comparant-ho amb la biodegradació i avaluant les diferències observades amb l'experiment en *batch* (capítol 7). A més, s'ha volgut fer un seguiment de les poblacions microbianes que potencialment actuen en cada cas i la seva evolució, comparant les poblacions majoritàries en cadascun dels tractaments i respecte als tractaments en *batch*. L'afectació de les poblacions microbianes per part del tractament d'oxidació química s'ha avaluat mitjançant els següents paràmetres: capacitat biodegradadora, respirometria, quantificació de poblacions i gens funcionals

i canvis en l'estructura de les poblacions microbianes. S'han avaluat els resultats comparant-los amb tractaments control biòtics en condicions aeròbies i desnitrificants.

En primer lloc s'ha dissenyat i caracteritzat hidrodinàmicament un set de tres columnes, usant càlculs teòrics i duent a terme un assaig de traçadors. Seguidament s'ha dut a terme la colonització de les columnes a partir de la circulació d'aigua de l'aqüífer a un flux reduït ( $3 \text{ mm}^3/\text{min}$ ) durant dues setmanes, amb l'objectiu d'afavorir la colonització de la matriu mineral del sòl per part de les poblacions presents a l'aigua subterrània. S'ha pres mostres de diverses alçades de la columna els dies 8 i 14 per tal de fer un seguiment d'aquest procés de colonització/enriquiment de poblacions microbianes.

Un cop finalitzada aquesta primera fase, s'han iniciat els tractaments, d'una setmana de durada.

#### Biodegradació en condicions aeròbies (BA):

S'ha fet circular per la columna l'aigua subterrània suplementada amb nutrients.

#### Biodegradació en condicions desnitrificants (BD):

S'ha fet circular per la columna l'aigua subterrània suplementada amb nutrients i  $2 \text{ g/l}$  de nitrat, bombollejada amb  $\text{N}_2$  durant una hora per eliminar l'oxigen. Per evitar fer el buit dins l'ampolla de subministrament d'aigua anòxica, s'ha col·locat una bossa plena de  $\text{N}_2$ .

#### Oxidació química (OQ)

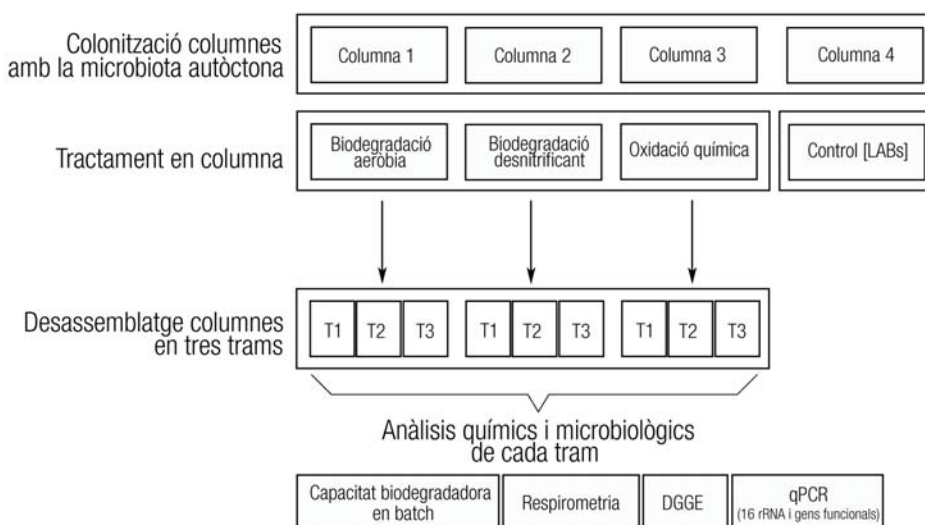
S'ha fet circular per la columna 3 cicles de  $23 \text{ ml}$  de catalitzador (veure apartat 3.2.1) (3 hores) seguit de  $204 \text{ ml}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 5% (28 hores), i finalment aigua subterrània suplementada amb nutrients fins a les 48 hores. Posteriorment a aquests tres cicles, s'ha fet circular aigua amb nutrients durant 24 hores més. S'ha controlat el flux de sortida de la columna puntualment per descartar la sortida de l'oxidant sense reaccionar.

Un cop transcorreguda la setmana, les columnes s'han desarmat per avaluar l'efecte de la MFR. Les columnes s'han dividit en tres trams (baix, corresponent al tram d'entrada dels reactius; mig i alt, corresponent al tram de sortida), i s'ha agafat mostra de cadascun per anàlisis químiques i microbiològiques.

Per tal d'avaluar l'afectació de les poblacions microbianes en aquest punt (just després de l'oxidació química), s'han muntat microcosmos per triplicat, contenint  $4 \text{ g}$  de sòl sec més  $10 \text{ ml}$  d'aigua milliQ amb nutrients (veure punt 3.2.1.), els quals s'han incubat durant 28 dies a  $20^\circ\text{C}$  i  $150 \text{ rpm}$  (Fig. 8.1). L'espai de cap s'ha omplert amb aire en el cas del sòl procedent dels tractaments BA i OQ, i amb  $\text{N}_2$  en el cas de BD.

S'ha avaluat el potencial biodegradador de LABs de les poblacions microbianes existents, l'activitat (mitjançant una respirometria), la variació de les poblacions microbianes (mitjançant DGGE) i la quantificació de 16S i gens funcionals (*nosZ*, *alkB*, *bssA* i *tod*). Aquests paràmetres s'han avaluat els dies 0, 14 i 28.

## Material i mètodes



**Figura 3.8.** Estratègia experimental.

### 3.3.6. Caracterització microbiològica de les aigües subterrànies i diferents estratègies de bioremediació mitjançant la combinació de tècniques de cultiu, DGGE i piroseqüenciació *bar-coded*.

En aquest capítol, s'ha analitzat la diversitat microbiana i les funcionalitats ecològiques identificant les poblacions presents *in situ* en diversos punts i al final d'una biodegradació *in vitro*.

Els anàlisis s'han dut a terme amb diversos mètodes, per tal d'avaluar l'ús de diferents tècniques clàssiques i moleculars i obtenir resultats complementaris.

Les tècniques emprades per a l'anàlisi de cada mostra es troben detallades a la taula 3.13.

**Taula 3.13.** Tècniques de caracterització microbiana emprades en aquest capítol

	Aïllament	DGGE	BioSeps + DGGE	Piroseqüenciació
Aigua neta		✓	✓	✓
Aigua contaminada	✓	✓	✓	✓
Fase lliure (LNAPL)		✓		
Bioestimulació aeròbia (90 dies)		✓		✓
Bioestimulació desnitricant (90 dies)		✓		✓

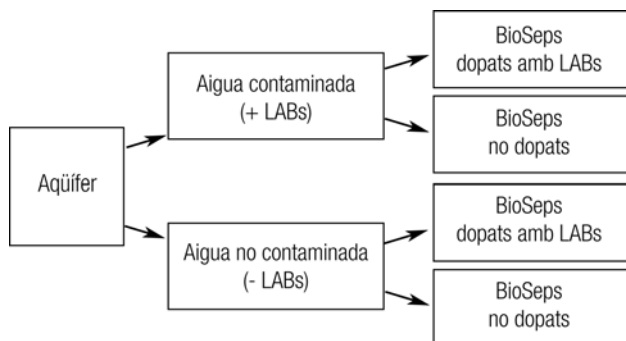
#### Aïllament

En l'aïllament s'ha emprat aigua contaminada i fase lliure procedent del pou P6. Per aïllar els microorganismes s'ha emprat plaques de medi mineral suplementades amb LABs com a font de carboni. Les colònies crescudes s'han aïllat ressemblant-les en els medis TSA, TSA 1:10 i GAE.

## BioSeps

Per tal de caracteritzar la població microbiana metabòlicament activa, s'ha procedit a mostrejar l'aigua subterrània emprant els BioSep.

S'han usat per a la caracterització BioTraps reblerts de BioSep directament i BioTraps reblerts de BioSep dopats amb LABs. Els BioSep s'han col·locat en aigua neta i aigua bruta, en cada pou amb i sense enriquiment de LABs. L'estratègia experimental es pot veure a la figura 3.9.



**Figura 3.9.** Estratègia experimental per a la colonització i anàlisi de BioSeps.

Els BioSeps s'han col·locat dins de piezòmetres de l'aquífer, en la part superficial de la zona freàtica; i s'han deixat colonitzar durant 30 dies. Un cop transcorreguts, s'han retirat de l'aquífer, i s'ha extret el DNA total de les comunitats microbianes que han pogut créixer sobre el BioSep.

S'han plantejat i testat tres metodologies per extreure el DNA a partir dels BioSeps (taula 3.14.). Per tal de testar la seva efectivitat s'ha analitzat la biomassa dels BioSeps en un conjunt de submostres, en les dilucions directa, [1:10] i [1:100], i s'han comparat els resultats obtinguts pels diferents mètodes, tant en població total de bacteris (16S rRNA) com en poblacions específiques lligades a processos de desnitrificació (gen *nosZ*)

Les diferències en la biomassa obtinguda amb els tres procediments s'han comparat de forma qualitativa i quantitativa.

**Taula 3.14.** Mètodes d'extracció dels BioSep

Mètode	Sistema
M1	Resuspensió de la biomassa dels BioSep en Ringer ¼ + Kit PowerSoil (MoBio)
M2	Kit PowerSoil (MoBio)
M3	Trituració física dels BioSep + Kit PowerSoil (MoBio)

## Piroseqüenciació

En l'anàlisi per piroseqüenciació, els punts *in situ* considerats són dos punts situats dins la ploma de contaminants (P15 i P16) i un punt situat fora de la ploma (P12). Pel que fa a la degradació *in vitro*, s'han emprat les mostres corresponents al dia 90 de la degradació aeròbia i la degradació desnitrificant (veure capítol 6).

# Capítol 4

Caracterització preliminar de  
l'emplaçament contaminat





### **AVÍS IMPORTANT**

Les pàgines 69 a 72 han estat retirades seguint instruccions de l'autora de la tesi, en existir participació d'empreses, existir conveni de confidencialitat o existeix la possibilitat de generar patents

### ***AVISO IMPORTANTE***

*Las páginas 69 a 72 han sido retiradas siguiendo instrucciones de la autora, al existir participación de empresas, convenio de confidencialidad o la posibilidad de generar patentes.*

### **IMPORTANT NOTICE**

Pages from 69 to 72 have been withdrawn on the instructions of the author, as there is participation of undertakings, confidentiality agreement or the ability to generate patent

#### 4.4. Caracterització de la contaminació

A l'inici de l'estudi, el plomall de contaminació tenia aproximadament 70 m de llargada per 20 m d'amplada. Els LABs es troben formant un plomall de LNAPL per damunt de la superfície freàtica i un plomall dissolt, format a partir d'aquest. Per tal de caracteritzar el plomall de contaminació l'any 2009, s'ha quantificat la presència de LABs a partir de l'aigua procedent dels punts de mostreig que es troben inclosos dins el plomall. Els pous P2 i P6 presenten una capa de fase lliure de més d'un centímetre de gruix, demostrant l'expansió del plomall de fase lliure.

No s'ha quantificat la concentració de LABs en l'aigua del pou P2 per la impossibilitat d'agafar mostres d'aigua a causa de la gran concentració de fase lliure (taula 3.3.).

La concentració d'alquilbenzens en l'aigua subterrània és irregular i forma un plomall de contaminació dissolta que arriba fins als pous 11 i 13. El pou on es detecta més concentració de LABs és el pou P6, amb 165 mg LABs/l, mentre que als pous més allunyats de la font de contaminació es detecten concentracions inferiors de LABs.

El límit de solubilitat dels LABs és d'aproximadament 0'41 mg/L. El valor detectat es troba per damunt d'aquesta concentració. L'aigua subterrània que es va analitzar no presentava fase lliure o iridiscències, que podessin augmentar la concentració de LABs a la mostra per damunt del límit de solubilitat. Tanmateix, és possible que a la mostra hi haguessin microemulsions o bé partícules de sòlids en suspensió que continguessin LABs adsorbits.

No obstant, cal tenir en compte que tot i les concentracions relativament baixes detectades en els diversos punts del plomall de contaminació, la fase lliure present a la subsuperfície actua com a font de contaminants dissolts i és per tant la problemàtica principal de l'episodi de contaminació.

**Taula 4.3.** Descripció de la contaminació en fase lliure i la contaminació dissolta de l'aqüífer.

Paràmetre	Valor P0 (Nov 2005/ Maig 2006)	Valor P2 (Nov 2005/ Maig 2006)	Valor P4 (Nov 2005/ Maig 2006)	Valor P6 (Nov 2005/ Maig 2006)
LNAPL (cm)	n.p./n.p.	n.p./<0.1 <sup>a</sup>	n.p./n.p.	n.p./<0.1 <sup>a</sup>
Contaminants a la fase aquosa (µg/L)	190	230/2300	20/<10	n.d./12000

n.d. no determinat, n.p. no present

<sup>a</sup> Primera observació de LNAPL al pou de monitoreig. El gruix del LANPL incrementà fins a > 1 cm a l'octubre 2006.

**Taula 4.4.** Concentració dels diferents isòmers de LABs en els diversos punts de mostreig d'aigua subterrània l'any 2009.

Concentració d'alquilbenzens (ppm)							
	C10		C11			C12	
Pou 6	32,38	± 8,29	59,63	± 14,54	43,17	± 11,20	
Pou 7	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 9	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 10	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 11	7,35	± 2,87	14,74	± 11,27	13,09	± 9,23	
Pou 12	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 13	9,72	± 8,83	5,13	± 0,36	4,28	± 0,29	
Pou 14	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	

Concentració d'alquilbenzens (ppm)							
	C13		C14		Total		
Pou 6	27,17	± 6,39	2,49	± 0,34	164,82	± 39,54	
Pou 7	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 9	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 10	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 11	9,87	± 6,18	1,81	± 0,43	46,85	± 29,87	
Pou 12	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Pou 13	3,67	± 0,18	1,33	± 0,02	24,12	± 8,43	
Pou 14	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	

#### 4.5. Caracterització microbiològica

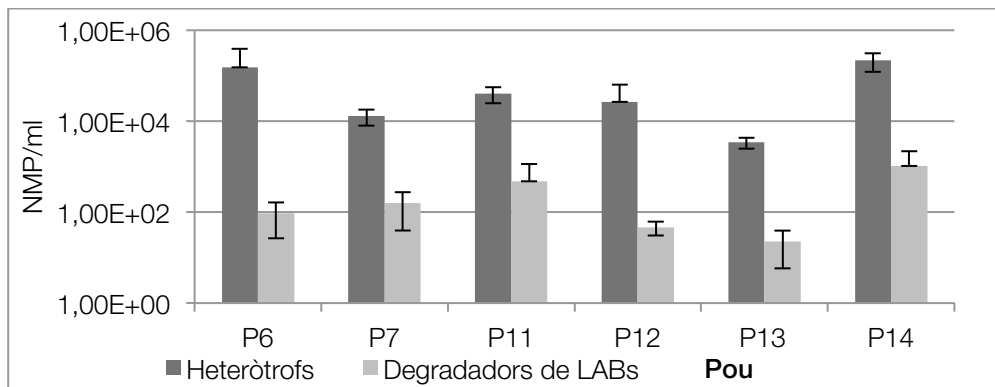
La caracterització microbiològica preliminar s'ha dut a terme també amb mostres d'aigua procedent dels mateixos pous. Les poblacions microbianes heteròtrofa i degradadora de LABs s'han quantificat emprant la tècnica del nombre més probable (NMP) (veure apartat 3.2.2.).

Per a quantificar la població degradadora s'ha usat medi TSB i TSB 1:10, obtenint resultats similars en els dos medis de cultiu (figura 3.2). Per quantificar la població degradadora de LABs s'ha usat medi mineral BMTM més alquilbenzens comercials o BMTM més un extracte del LNAPL. En aquest cas, els alquilbenzens comercials i el TSB sense diluir han mostrat poblacions lleugerament més altes, per tant seran els medis usats per als recomptes. En tots els pous, les poblacions degradadores d'hidrocarburs es troben en valors relativament baixos, entre 10 NMP/ml i 10<sup>3</sup> NMP/ml, corresponent a un 0'1% i un 1% de la població total.

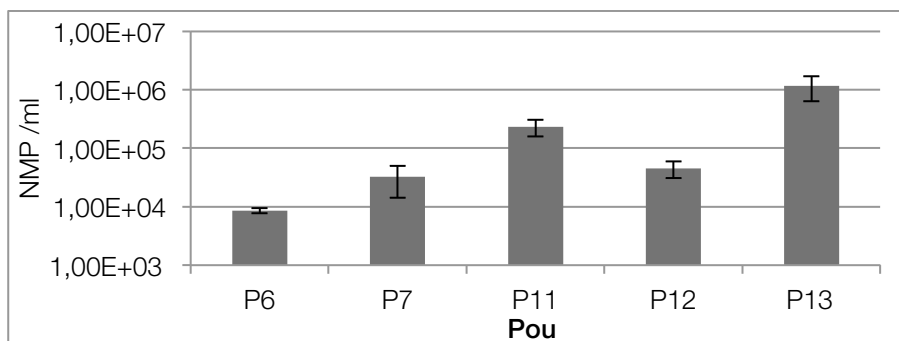
D'altra banda, tenint en compte les oscil·lacions de condicions redox observades en la caracterització fisicoquímica de l'aquífer, s'ha enumerat també la població desnitrificant en els diversos punts de mostreig (figura 3.3.). Les dades indiquen que existeix una població important amb capacitats desnitrificants.

Per tal de fer un seguiment de l'evolució de les poblacions al pou P6, del qual s'ha obtingut posteriorment l'aigua contaminada usada en els experiments in vitro, es va enumerar les poblacions microbianes un any després, al març de 2010. Durant aquest període, la fase lliure present al pou P6 ha incrementat el gruix mantenint però les concentracions de LABs dissolts en el mateix ordre de magnitud.

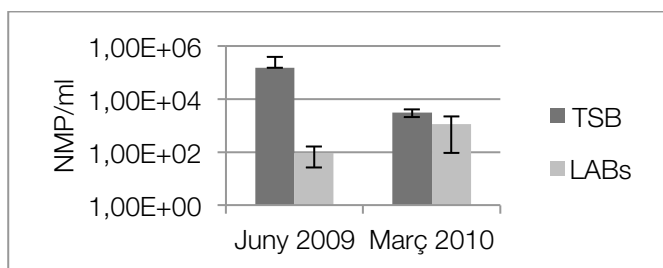
Caracterització preliminar



**Figura 4.2.** Enumeració de les poblacions heteròtrofa i degradadora de LABs per NMP en les mostres d'aigua subterrània provinents de diversos pous de mostreig (mostreig: juny 2009).

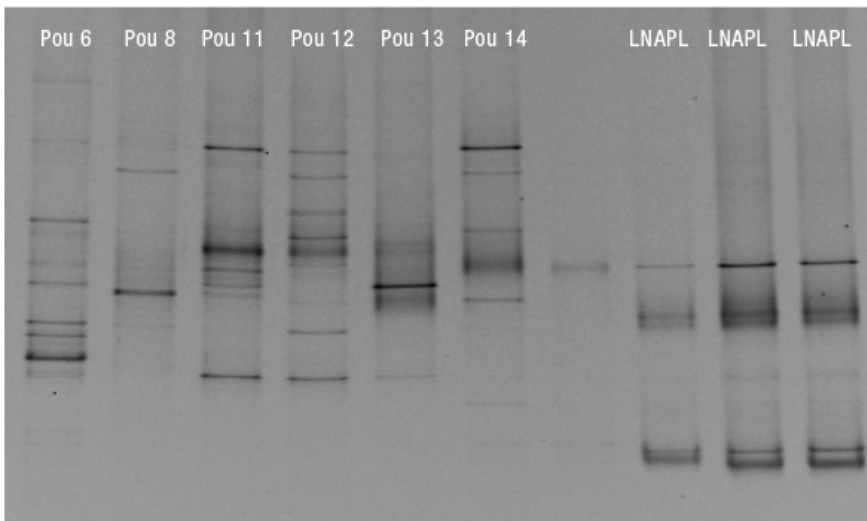


**Figura 4.3.** Enumeració de la població heteròtrofa desnitrificant per NMP en les mostres d'aigua subterrània provinents de diversos pous de mostreig. El pou 14 no va ser analitzat.



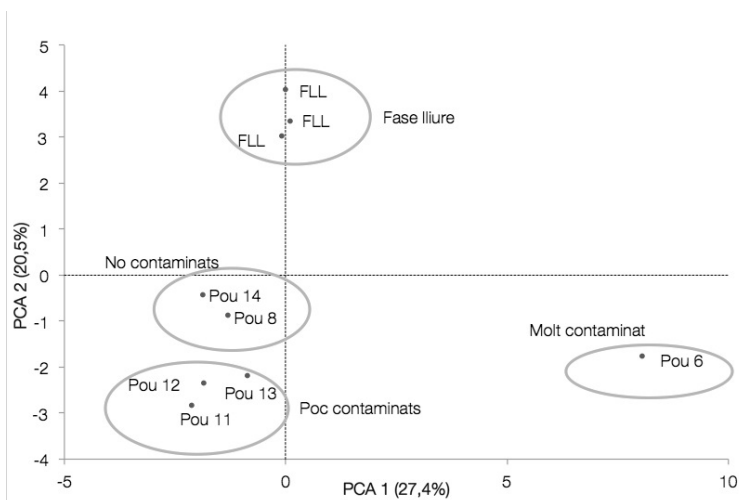
**Figura 4.4.** Enumeració de les poblacions heteròtrofa i degradadora de LABs per NMP en les mostres d'aigua subterrània del pou 6 al juny de 2009 i al març de 2010.

A més de quantificar les poblacions microbianes heteròtrofes i degradadores d'hidrocarburs s'ha volgut fer una comparació de la comunitat microbiana present al medi, per tal d'establir similituds i diferències entre les poblacions microbianes dels diversos punts de mostreig i relacionar-les amb la presència de LABs. La caracterització s'ha dut a terme per DGGE de la població de gens 16S rRNA en els diferents pous.



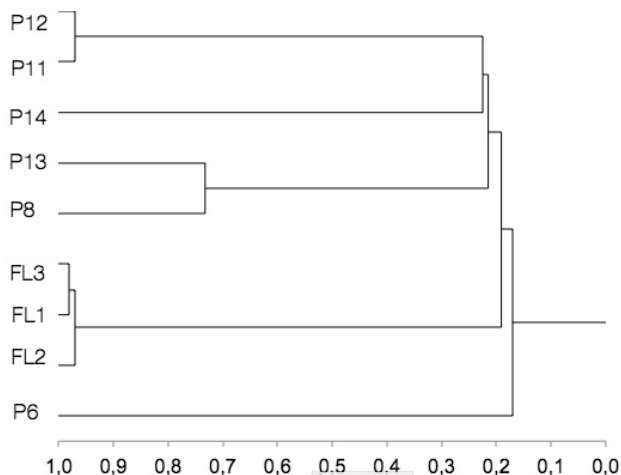
**Figura 4.5.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rDNA de les mostres preses als diversos pous (P6, P8, P11, P12, P13, P14) i de tres mostres diferents de LNAPL (juny 2009).

Donat que l'aigua extreta de cadascun dels pous presenta un perfil de bandeig molt divers, és difícil valorar les diferències de la comunitat microbiana basant-se en la intensitat de bandes. Per consegüent, les variacions en l'estructura de la comunitat microbiana s'han examinat usant l'anàlisi de components principals (ACP) (figura 3.6) i l'anàlisi clúster a partir del coeficient de similitud de Pearson (figura 3.7).



**Figura 4.6.** Anàlisi de components principals. El percentatge de variabilitat explicada per cada component és mostrada en parèntesi a cada eix.

### Caracterització preliminar



**Figura 4.7.** Anàlisi clúster a partir dels coeficients de similitud de Pearson.

L'índex de diversitat de Shannon-Wiener oscil·la entre 2'18 (al pou 6, on es troba el major gruix de LNAPL) i 1'38 (al pou 14, on no es troba LNAPL). Les mostres preses en punts de mostreig on no s'observa LNAPL o només iridescències oscil·len entre 1'38 i 1'89. Cal tenir en compte que el DGGE és una tècnica de resolució limitada, que representa només les poblacions que es troben en concentracions majors al 0'1%. Això limita la capacitat de l'índex de Shannon de donar dades precises. No obstant, si que serveix com a indicador de la pèrdua o augment de la diversitat.

**Taula 4.4.** Índex de Shannon-Wiener ( $H'$ ) de la diversitat bacteriana estimada a cadascun dels punts de mostreig, basat en els perfils de DGGE obtinguts amb les mostres preses durant la caracterització de l'emplaçament (juny de 2009).

Pou 6	Pou 8	Pou 11	Pou 12	Pou 13	Pou 14	LNAPL
2,18	1,65	1,82	1,90	1,63	1,38	1,57

Per analitzar els patrons de bandeig de l'aigua de l'aquífer s'ha de considerar l'exposició de cadascun dels punts de mostreig a LNAPL. L'anàlisi d'aigua provinent dels diversos punts de mostreig només mostra presència de LABs en els pous 6, 11 i 13 (taula 4.4.). El pou 6, en el moment del mostreig, presentava un LNAPL >1 cm. Els pous 11 i 13 presentaven iridescències, degudes a la presència de LABs. En els anàlisis de PCA i clústering, la similitud entre patrons de bandeig depèn de l'exposició de l'aigua subterrània al contaminant. Es pot afirmar doncs que existeix una especialització de les poblacions microbianes en les àrees contaminades que podria anar en funció també de la concentració de LABs. Tanmateix, cal considerar que segons els comptatges de NMP, el percentatge de degradadors de LABs és menor del 10%. Per tant, les poblacions que s'observen al DGGE són bàsicament heteròtrofes, podent ser també poblacions degradadores de metabòlits.

Es esperable doncs el resultat diferent dels patrons de bandeig del pou 6, ja que és el pou en que l'aigua subterrània es troba en contacte amb el LNAPL i on es donen les concentracions més elevades de LABs. Els pous poc contaminats o gens

contaminats (com serien el P14, on al moment del mostreig no havia arribat la fase dissolta, o el P8, situat per damunt de la font contaminant) tenen patrons de bandeig més similar entre ells.

És interessant destacar que, tot i que els perfils de bandeig presentats per l'aigua subterrània són extremadament variats i amb poques coincidències, els perfils de bandeig de les mostres de fase lliure (LNAPL) són molt similars, i molt diferents dels perfils obtinguts a les mostres d'aigua subterrània. Aquest fenomen s'observa tant en l'anàlisi de components principals com en l'anàlisi clustering. Aquest últim situa en un 98% la similitud entre les tres mostres.

Al capítol 5 s'ha analitzat amb més profunditat i identificat algunes bandes principals dels patrons de bandeig per DGGE de l'aigua subterrània (sense LABs i contaminada per LABs) i de la fase lliure. Al capítol 9 s'ha analitzat emprant diversos mètodes l'aigua subterrània, tant neta com contaminada.

### **Resultats destacats del capítol**

L'anàlisi cromatogràfic de les mostres preses en els diferents piezòmetres permeten concloure que l'emplaçament està contaminat per alquilbenczns (LABs) i no per fuel tal com es creia a l'inici de la gestió de la contaminació.

L'estructura poblacional microbiana presenta clares diferències entre l'aigua dels diversos pous i el LNAPL, agrupant-se segons el contingut en LABs de la mostra.

L'aqüífer presenta nivells variables d'oxigen i nitrats al llarg del temps. S'ha detectat poblacions microbianes amb potencial degradador de LABs, conformant aproximadament l'1% de la població total. La presència de poblacions microbianes amb potencial degradador i desnitrificant condueix a avaluar estratègies de bioestimulació tant en condicions aeròbies com anaeròbies.





# Capítol 5

Assaig de degradació in vitro  
d'alquilbenzens lineals en  
condicions aeròbies



Els assajos de biodegradació a escala de laboratori (*in vitro*), tot i que poden diferir dels resultats obtinguts en camp, són útils per determinar les condicions òptimes per obtenir la màxima estimulació de la microbiota (Venosa 1998) i per tant, la biodegradabilitat màxima del compost, en condicions ideals.

Aquests assajos permeten predir l'efectivitat de diversos tractaments (addició de nutrients, co-substrats, bioreforç, etc.) sobre la biodegradabilitat del producte.

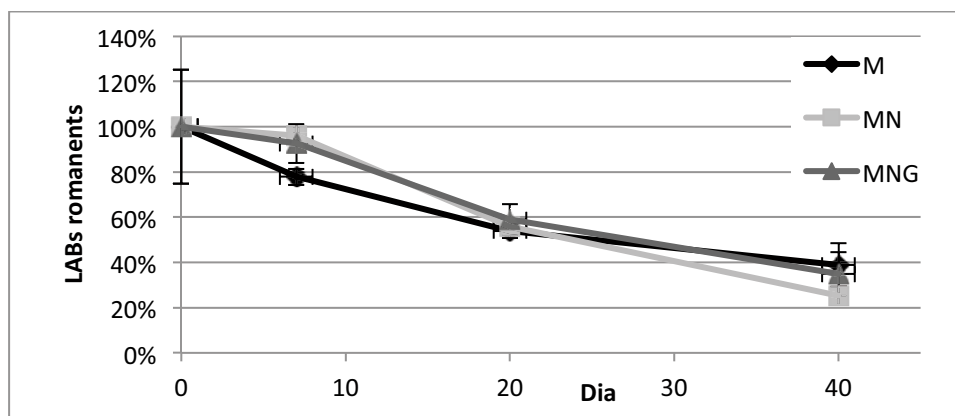
En aquesta primera fase s'ha comparat l'activitat degradadora de la microbiota autòctona amb la de consorcis microbians amb activitat degradadora d'hidrocarburs prèviament obtinguts al grup de recerca. Així mateix, s'ha assajat l'efecte de l'addició de nutrients sobre la degradació del compost.

## Objectius

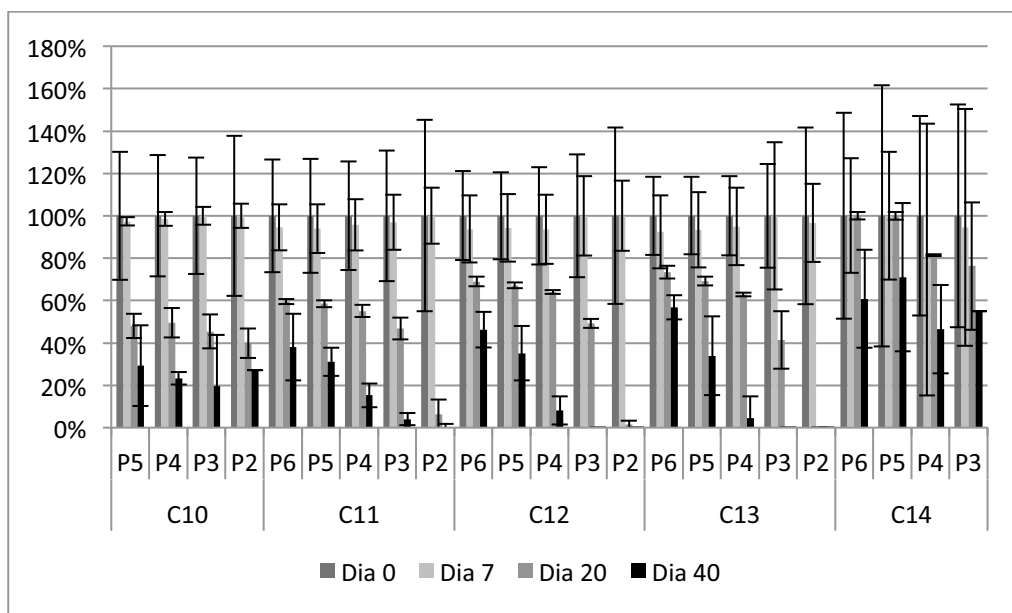
L'objectiu d'aquest capítol és conèixer les condicions ambientals que incentiven la biodegradabilitat dels compostos, així com l'evolució de les poblacions microbianes al llarg de l'assaig de degradació en els diferents tractaments. Aquest coneixement s'emprarà, per intentar identificar aquells grups microbians que podrien ser importants durant els processos de biodegradació de LABs a l'emplaçament. Coneixent les poblacions microbianes actives en els processos de biodegradació permet dissenyar estratègies futures de bioestimulació encara més específiques, i optimitzar potencialment el procés de biodegradació *in-situ*.

### 5.1. Biodegradació dels LABs per part del consorci TD

El consorci TD s'ha testat sol, amb l'addició de nutrients hidrofílics (nitrogen i fòsfor) i amb nutrients i un co-substrat (glucosa). Els resultats es poden veure a la figura 5.1. Els diferents tractaments no han mostrat diferències significatives entre ells, presentant una degradació entre el 65-75% dels LABs. Tot i això, el més efectiu ha estat l'addició de nutrients, arribant a una degradació global del 75% (figura 5.1), aconseguint nivells de degradació d'entre el 42% i el 80% en 40 dies per als diferents isòmers (figura 5.2).



**Figura 5.1.** Concentració de LABs als microcosmos per part del consorci TD en els diferents tractaments: medi mineral (M), medi mineral i nutrients (MN) i medi mineral, nutrients i glucosa (MNG). La concentració inicial era de  $628 \pm 158$  mg/kg.



**Figura 5.2.** Percentatges de degradació segons isòmers de LABs als assaigs amb inòcul TD en el tractament amb nutrients (MN) al llarg del temps. P2-P6 indica la posició de l'anell benzènic a la cadena. C10-C14 indica el nombre de carbonis present a la cadena alquílica.

El consorci TD es va seleccionar per la seva gran capacitat de degradació de TPHs (fracció alifàtica i aromàtica d'un cru de petroli lleuger) (Vinas, Grifoll et al. 2002).

A més, el consorci TD és probable que presenti una població productora de biotensioactius. Aquesta capacitat ha estat testada tant en la disminució de tensió superficial en cultius del consorci (Jiménez 2009) com per l'aspecte dels microcosmos. La presència de tensioactius afavoreix la solubilització dels LABs, i per tant la seva biodisponibilitat i degradabilitat. A més, la relació entre degradació d'alcans i producció de biotensioactius ha estat àmpliament provada (Ron, Rosenberg 2002, Johnsen, Wick et al. 2005, Rahman, Gakpe 2008) i els hidrocarburs es consideren bones fonts de carboni per a la seva producció (Johnsen, Wick et al. 2005, Gogotov, Khodakov 2008).

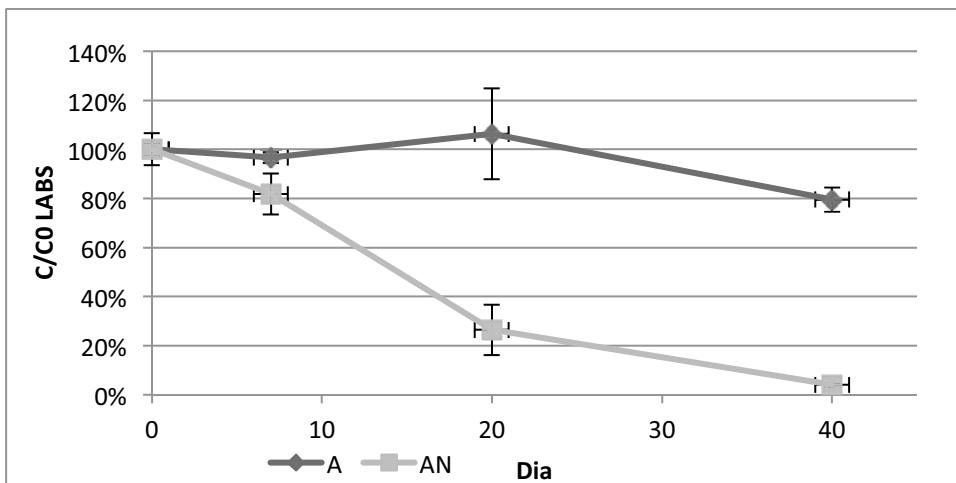
Finalment, cal destacar que la biodegradació segueix el patró esmentat anteriorment, seguint una biodegradació preferencial, eliminant primer els LABs amb cadenes alquíliques més curtes, i dins cada sèrie eliminant preferentment els isòmers externs (figura 5.4.)

## 5.2. Biodegradació dels LABs en els assaigs de bioestimulació de la microbiota autòctona

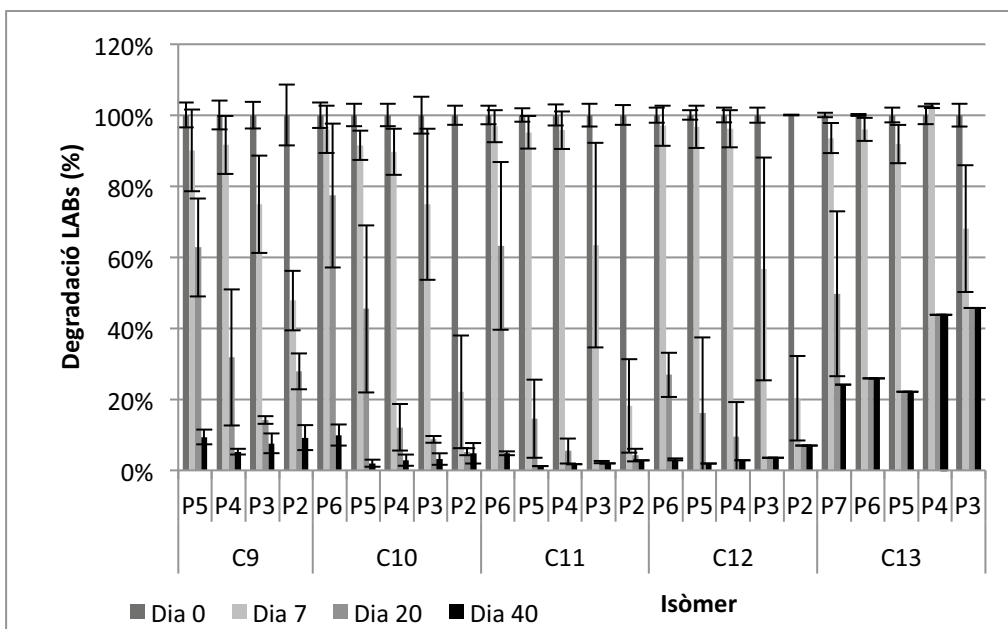
La bioestimulació de la microbiota autòctona de l'aigua subterrània (pou 6) ha mostrat millors resultats que amb la inoculació d'un inòcul exogen amb capacitat degradadora (el consorci TD). Cal destacar el gran efecte bioestimulant de l'addició de nutrients: mentre la degradació no és detectada fins al dia 40 en els microcosmos sense nutrients (G), les mostres amb addició de nutrients (GN) presenten degradació a

partir del dia 7, arribant a una degradació gairebé completa als 40 dies (el límit de detecció de l'aparell amb la tècnica usada és de 0'5 mg/L).

En aquest cas (GN), la biodegradació assoleix el seu màxim en un 96% global de tot el contingut de LABs, aconseguint nivells de degradació d'entre 92 i 97% per als isòmers C10 a C13, i un 69% de degradació en el cas del C14 (figura 5.3.)



**Figura 5.3.** Concentració total de LABs als microcosmos en els diferents tractaments: aigua (A) i aigua i nutrients (AN).



**Figura 5.4.** Percentatges de degradació segons isòmers de LABs als microcosmos d'aigua subterrània bioestimulats amb nutrients (GN) en els diversos punts de mostreig.

D'altra banda, la producció de biotensioactius també és podria ser probable en les incubacions amb microbiota autòctona. Els erlenmeyers inoculats amb aigua de l'aquífer presentaven un aspecte completament diferent als erlenmeyers control, autoclavats (figura 5.5). La presència de substàncies que faciliten un major contacte entre els LABs i l'aigua facilita, com en el cas del consorci TD, la biodisponibilitat del contaminant.

**Figura 5.5.** Aspecte dels microcosmos al cap de 40 dies d'experiment. Esquerra: GN, dreta: control abiòtic.



La biodegradació aconseguida bioestimulant la microbiota autòctona de l'aigua subterrània del pou 6 és més alta que la obtinguda usant el consorci TD. L'efectivitat reduïda de la bioaugmentació mitjançant inòculs al·lòctons degradadors d'hidrocarburs ha estat descrita amb anterioritat (Vinas, Sabate et al. 2005), tot i que el resultat contrari també ha estat descrit: en nombroses ocasions, el bioaugment és l'opció que proporciona majors taxes de degradació (Bento, Camargo et al. 2005). Tanmateix, una de les aproximacions de bioaugment més eficaces, que proporciona millors resultats, és l'ús de la microbiota autòctona preseleccionada com a inòcul (Capelli, Busalmen et al. 2001), essent una opció més propera a la bioestimulació.

En aquest cas, l'habilitat de les comunitats microbianes autòctones per adaptar-se a la presència de contaminants en les condicions ambientals de l'emplaçament contaminat (Kabelitz, Machackova et al. 2009) ha estat un factor clau.

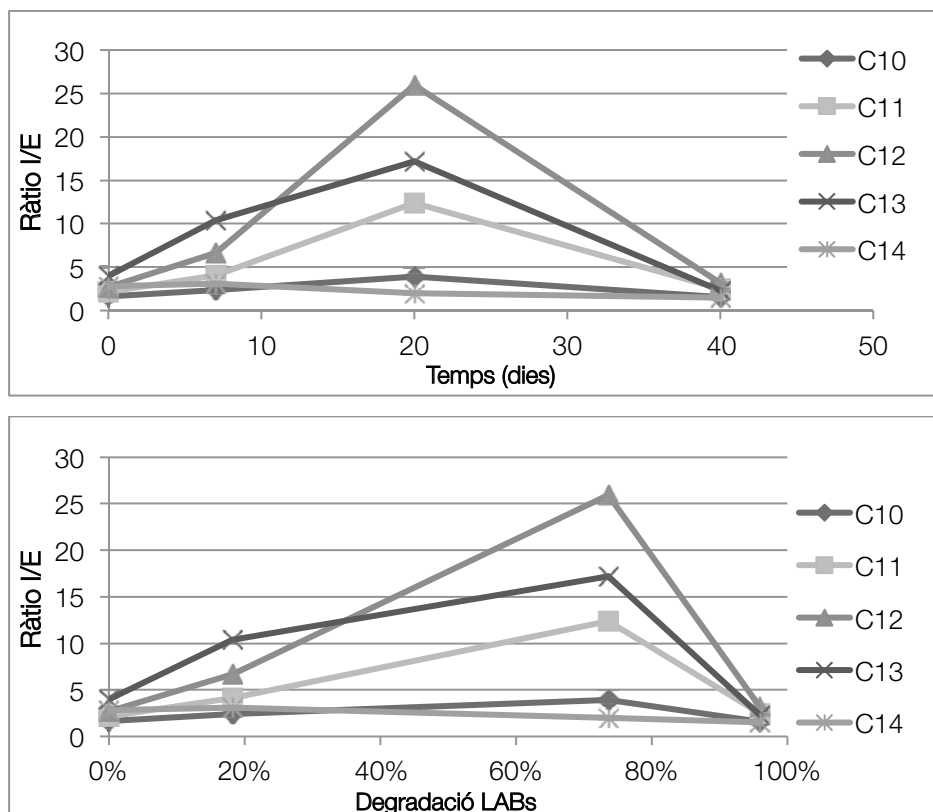
És també destacable que l'addició de nutrients (font de nitrogen i fòsfor) ha millorat significativament la biodegradació, resultat consistent amb els baixos nivells de nutrients detectats a l'aquífer.

### 5.3. Evolució de la ràtio isomèrica

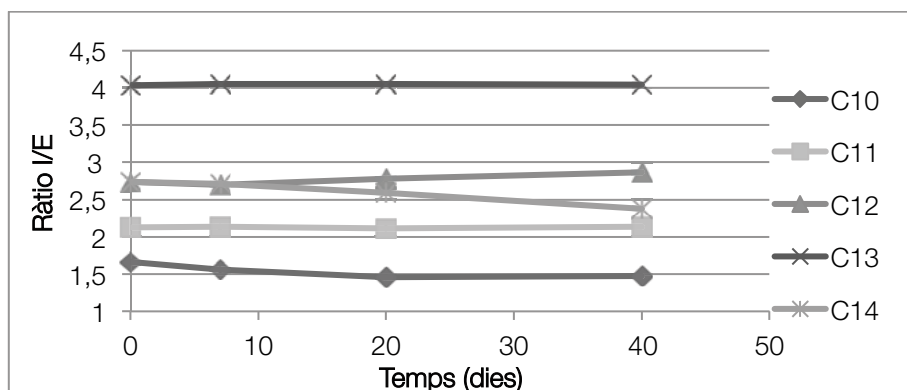
En els assajos de biodegradabilitat dels LABs, els resultats de degradació han seguit un patró de degradació coincident amb d'altres prèviament descrits tant en LABs en incubacions amb *Pseudomonas sp* (Bayona, Albaigés et al. 1986) i *Nocardia amarae* (Bhatia, Singh 1996), com en alquilbenzens sulfonats (LASs) (Huddleston, Allred 1963). Ha estat suggerit que la degradació dels LABs comença amb una  $\omega$ -oxidació de la cadena alquíllica (Painter 1992), i que segueix amb l'escurçament de la cadena mitjançant  $\beta$ -oxidació. Aquesta biodegradació és destorbada quan s'apropa al anell benzènic. Per aquest motiu la biodegradació dels diferents isòmers és selectiva, a favor d'aquells isòmers on l'anell benzènic està situat més a l'extrem de la cadena alquíllica (isòmers externs) i en detriment d'aquells que el presenten cap el centre (isòmers interns). Aquest fenomen, conegut com el principi de distància, ha estat àmpliament descrit (Huddleston, Allred 1963, Douros, Frankenfeld 1968, White GF 1994).

El patró de biodegradació ha mostrat una correlació entre el grau de degradació dels alquilbenzens i la seva composició isomèrica i d'homòlegs. Es pot aplicar doncs el ràtio entre isòmers interns (on el benzè es troba unit en les posicions 4 a 6) i externs (amb l'anell benzènic en les posicions 2 o 3) i interns proposat anteriorment per (Takada, Ishiwatari 1990). En aplicar la ràtio als resultats obtinguts en la degradació dels LABs per part de la microbiota autòctona suplementada amb nutrients es pot observar clarament que al llarg de la biodegradació es produeix un enriquiment en els isòmers interns, és a dir, que es degraden en preferència els isòmers externs, indicant la ocurrència d'una degradació selectiva dels LABs. No obstant, aquest fenomen s'ha presenciat només en les primeres fases de degradació del LNAPL, ja que, tal i com s'aprecia en la figura 5.6., la ràtio retorna a nivells similars als inicials en assolir taxes de degradació més altes.

Tanmateix, aquest fenomen no s'ha observat amb la mateixa claredat en altres mostres. En la bioestimulació sense nutrients de la microbiota autòctona no s'observa encara el patró de degradació, ja que la degradació obtinguda és molt baixa (figura 5.7.).



**Figura 5.6.** Evolució de la ràtio isomèrica normalitzada de l'experiment de biodegradació per part de la microbiota autòctona suplementada amb nutrients respecte el temps (A) i en relació a la degradació dels LABs (B).



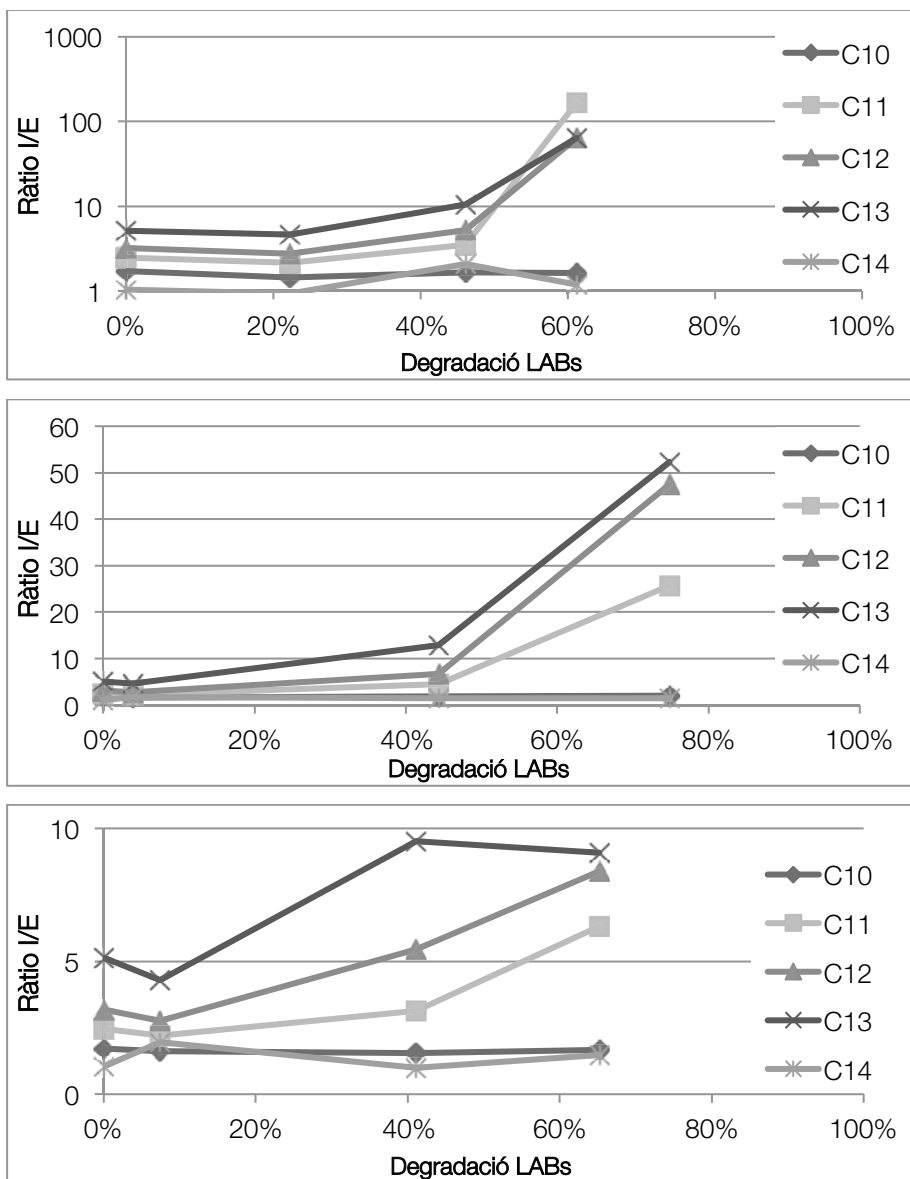
**Figura 5.7.** Evolució de la ràtio isomèrica normalitzada de l'experiment de biodegradació per part de la microbiota autòctona sense suplementar amb nutrients respecte el temps.

En el cas de la degradació duta a terme pel consorci TD, es detecta també indicis de la degradació selectiva dels LABs (figura 5.8.). És especialment interessant el comportament mostrat per C11 en la degradació sense nutrients, on s'arriba a ràtios de degradació molt més elevades. Aquest fet pot indicar que les corbes creades amb anterioritat (per exemple, en la figura 5.6.) poden presentar les ràtios més elevades en valors d'aproximadament el 60% de degradació. Així doncs, el punt corresponent als 20 dies (o 70%) de degradació estaria ja situat en la fase de baixada de l'índex, quan es comencen a degradar en més proporció els isòmers interns.

El comportament de la ràtio isomèrica en els diversos tractaments de degradació indica que el procés de degradació és selectiu i seqüencial. El comportament diferencial de la ràtio isomèrica podria permetre aplicar aquest índex en diferents pous de monitoratge de la contaminació en l'emplaçament, obtenint informació sobre la biodegradació intrínseca que es pugui estar produint al camp. Aquesta ràtio doncs podria ser una eina útil per al monitoratge de l'atenuació natural (MNA) en l'emplaçament contaminat.

No obstant, caldria realitzar més estudis correlacionant la biodegradació de LABs observada i la variació de la ràtio isomèrica per validar i poder utilitzar aquest índex com a indicador de biodegradació en el camp.





**Figura 5.8.** Evolució de la ràtio isomèrica normalitzada de l'experiment de biodegradació per part del consorci TD (A), suplementat amb nutrients (B) i amb la presència de nutrients i glucosa (C) en relació a la degradació dels LABs.

#### 5.4. Determinació de l'evolució de l'aromaticitat durant el procés de biodegradació.

S'ha determinat en apartats anteriors la biodegradació dels LABs per part de la microbiota autòctona mitjançant la desaparició dels productes parentals emprant la cromatografia de gasos. Ara bé, donat que els LABs són una molècula mixta que presenta estructures alifàtiques i aromàtiques, és interessant plantejar si la biodegradació ha suposat la destrucció de l'anell aromàtic o s'ha degradat tan sols la

cadena alifàtica. Tractant-se d'una barreja complexa, no s'ha pogut determinar els metabòlits creats en el procés de degradació, així que s'ha verificat l'aromaticitat de la mostra en conjunt (taula 5.1).

L'índex d'aromaticitat és un valor que indica la proporció de carbonis aromàtics (aquells que formen part de l'estructura del benzè) en relació al nombre total de carbonis de la mostra. Un increment de l'aromaticitat al llarg del procés de biodegradació indicaria que s'han degradat majoritàriament les cadenes alquílques, mentre que una disminució de l'aromaticitat indicaria que els anells aromàtics s'han obert en el procés de biodegradació i no s'han degradat només les cadenes alquílques (Sugiura, Ishihara et al. 1997).

L'aromaticitat de la mostra s'ha determinat tant per carbonis ( $^{13}\text{C}$ -NMR) com per protons ( $^1\text{H}$ -NMR) en la biodegradació per part de la microbiota autòctona suplementada per nutrients (veure 3.1.3).

**Taula 5.1.** Índex d'aromaticitat de les mostres al llarg de la biodegradació.

	Índex aromaticitat ( $^{13}\text{C}$ -NMR)	Índex aromaticitat ( $^1\text{H}$ -NMR)	LABs romanents
Dia 0	0,468	0,969	100%
Dia 7	0,335	0,902	82%
Dia 20	0,349	0'894	26%
Dia 40	0,349	n.d.	4%
Control abiòtic	0,418	n.d.	

n.d. No determinat

La fracció aromàtica disminueix al llarg de la biodegradació, passant de 0'468 a 0'349. Així doncs, seria possible afirmar que la microbiota autòctona no només degrada les cadenes alquílques dels LABs sinó que també posseeix la capacitat de provocar l'obertura dels anells benzènics.

En la literatura s'ha descrit la via de degradació per als LABs de cadena llarga amb l'anell benzènic en posició terminal (figura 1.15). Aquesta degradació s'inicia amb una beta o  $\omega$ -oxidació de l'últim metil de la cadena. En LABs no terminals ambdós metils terminals poden ser atacats en cas d'isòmers no terminals. Un cop degradada la cadena alquílca, es produeix un trencament de l'anell aromàtic.

En aquest cas, la disminució de l'índex d'aromaticitat es produeix entre l'inici i els set dies, mantenint-se aproximadament constant durant la bioremediació. Aquest fet suggereix la proporció entre anells aromàtics i cadenes alifàtiques no augmenta, és a dir, els anells aromàtics es degraden. Per tal d'assegurar-ho, però, s'hauria d'identificar els metabòlits intermedis de la degradació de LABs.

## 5.5. Estudi de la comunitat microbiana

En aquest bloc experimental, a banda de fer un assaig de biodegradació, s'ha volgut fer un seguiment de la comunitat microbiana present als microcosmos, per tal de detectar els canvis al llarg del temps i conèixer els microorganismes que poden estar relacionats amb aquesta degradació.

Per una banda, s'ha quantificat els microorganismes heteròtrofs i degradadors de LABs mitjançant NMP, i per l'altra s'ha fet una caracterització de les mostres per DGGE.

### 5.5.1. Enumeració de poblacions heteròtrofa i degradadora d'hidrocarburs

S'ha determinat el nombre més probable de l'aigua del pou 6, obtenint valors de  $1,52 \cdot 10^5 \pm 2,33 \cdot 10^5$  NMP/ml de microorganismes heteròtrofs i  $9,53 \cdot 10^1 \pm 6,89 \cdot 10^1$  NMP/ml de microorganismes degradadors de LABs.

### 5.5.2. Anàlisi de l'estructura poblacional

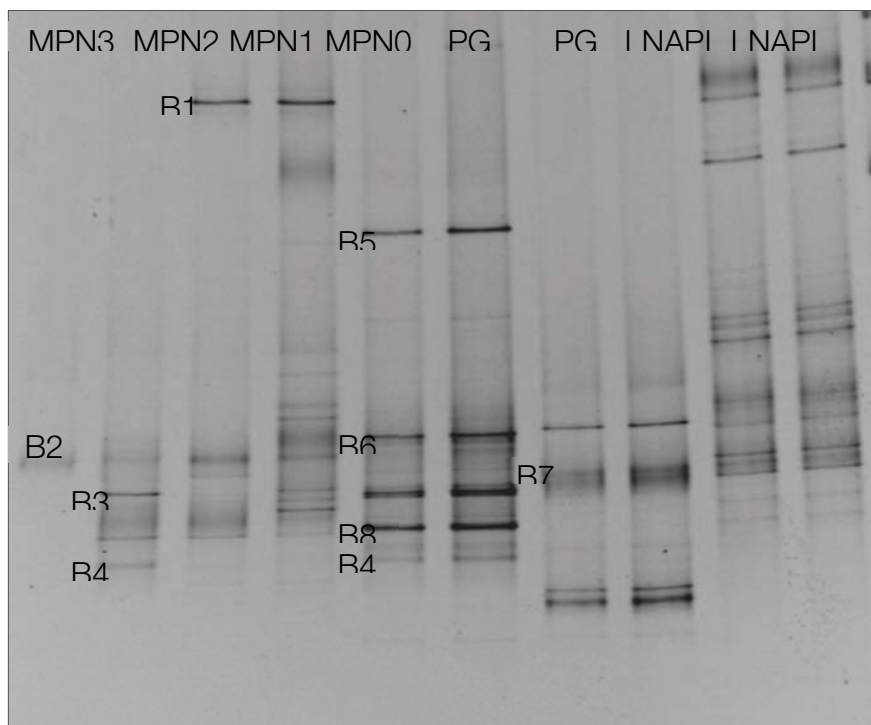
Per analitzar les poblacions microbianes predominants presents en l'aigua de l'aquífer, s'ha analitzat el 16S rRNA procedent d'extractes de la fase lliure (FP), l'aigua contaminada (PG, corresponent al pou 6) i aigua neta (CG, corresponent al pou 13) de l'aquífer.

Per tal de diferenciar poblacions amb un paper actiu en la degradació de LABs de la resta de la comunitat microbiana s'ha analitzat també per PCR-DGGE les poblacions que han crescut utilitzant LABs com a única font de carboni i energia, provinents dels pouets sembrats amb les dilució més elevades amb creixement positiu sobre LABs en plaques de NMP.

Els perfils de bandeig de les diferents mostres al DGGE del gen 16S rRNA es mostren a la figura 5.9.

Per avaluar la reproductibilitat de la tècnica la similitud dels amplicons s'ha avaluat calculant el coeficient de correlació de Pearson  $r$  entre rèpliques (superior al 0'90). Les PCR doncs han estat repetitives i les mostres han presentat una gran homogeneïtat.

Un cop analitzats els perfils de 16S rDNA-DGGE, s'han escindit del gel les bandes aquelles bandes relacionades amb la presència i degradació de LABs. S'ha procedit a la seqüenciació de vuit bandes de DGGE (figura 5.8 i taula 5.2.). Un cop seqüenciades les bandes, s'han identificat microorganismes que pertanyen a les famílies *Phyllobacteriaceae* i *Rhizobiaceae* (pertanyents al grup  $\alpha$ -Proteobacteria), *Rhodocyclae* i *Comamonaceae* ( $\beta$ -proteobacteria), *Pseudomonaceae* i *Legionellaceae* ( $\gamma$ -Proteobacteria) i de *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidetes*).



**Figura 5.9.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les mostres obtingudes de l'aigua subterrània i enriquiments en LABs. L: ladder, CG: aigua subterrània control (corresponent al pou 13), LNAPL: fase lliure, PG: aigua subterrània contaminada (corresponent al pou 6), NMP -n: cultiu en medi mineral amb LABs de diferents dilucions (n) de l'aigua contaminada.

**Taula 5.2.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades.

Banda	Mostra	Longitud (pb)	% similitud <sup>a</sup>	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>
B1	MPN	499	99%	<i>Chryseobacterium</i> sp. T6 (FJ765353)	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae
B2	MPN	516	99%	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ279756)	γ -proteobacteria	Pseudomonadaceae
B3	MPN	478	100%	<i>Rhizobium</i> sp (EF659423)	α-proteobacteria	Rhizobiaceae
B4	MPN, PG	450	96%	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (CP000774)	α-proteobacteria	Phyllobacteriaceae
B5	PG	485	97%	<i>Legionella</i> sp. (AY924137)	γ -proteobacteria	Legionellaceae
B6	PG	512	100%	<i>Acidovorax defluvii</i> (EU434521)	β -proteobacteria	Comamonadaceae
B7	LNAPL	479	99%	Uncultured β-proteobacterium (AM935341, EF157170)	β -proteobacteria	Rhodocyclaceae
B8	PG	515	97%	Uncultured Environmental sequence (AB369022)	Proteobacteria	Proteobacteria

<sup>a</sup>Organisme més proper a la base de dades GenBank

<sup>b</sup>Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak et al. 2000, Cole et al 2005). α, β i γ representen alfa, beta i gamma Proteobacteria, respectivament.

Les seqüències determinades en aquest estudi s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* GU734019 a GU734026.

Entre els gèneres identificats, és destacable la presència d'un microorganisme amb una similitud del 96% amb *Parvibaculum lavamentivorans* (B4), descrit com a iniciador del metabolisme dels LASs (Schleheck, Knepper et al. 2004). Aquest microorganisme ha estat detectat tant en la població microbiana de l'aquífer com a partir de les plaques NMP de microtitulació de degradació de LABs.

La degradació es produeix mitjançant  $\omega$ -oxidació de la cadena alifàtica, i escurçant la cadena lateral per  $\beta$ -oxidació. Considerant que aquesta part de la molècula és igual en els LABs, *P. Lavamentivorans* podria tenir un rol important en la transformació inicial d'alquilbenzens. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, s'ha dut a terme un assaig de degradació de LABs amb la soca tipus de col·lecció *P. lavamentivorans* DSMZ13023.

*Chryseobacterium* ha estat també detectat per DGGE a partir de les plaques de NMP de poblacions microbianes relacionades amb la utilització de LABs. Tot i ser un microorganisme ubic, diverses espècies de *Chryseobacterium* han estat isolades a partir de mostres contaminades per hidrocarburs (Szoboszlay, Atzel et al. 2008, Owsianiak, Chrzanowski et al. 2009).

Finalment, s'ha detectat també *Pseudomonas alcaligenes*, un microorganisme degradador d'hidrocarburs àmpliament descrit (Gordon, Dobson 2001, Zhao, Yeo et al. 2005), que compta amb enzims amb àmplia especificitat de substrat (Feng, Khoo et al. 1999).

El DGGE és una tècnica adequada per observar canvis en l'estructura poblacional entre diverses mostres. Tanmateix, la seva baixa resolució (d'aproximadament el 0'1%) i el fet que no sempre es poden seqüenciar amb èxit les bandes seleccionades, per a fer un estudi complet de comunitats microbianes complexes, cal complementar-lo amb altres mètodes, com per exemple la piroseqüenciació. Al capítol 9 de la present tesi es comparen diverses tècniques d'anàlisi de les comunitats microbianes.

### **Diversitat microbiana**

L'índex de Shannon-Wiener ( $H'$ ) (taula 5.3.) ha permès observar canvis significatius en la diversitat microbiana entre l'inici i el final de l'experiment, i entre els diversos tractaments.

La població microbiana present en l'aquífer mostra clarament una davallada de diversitat en presència dels alquilbenzens. Com a resultat els valors de l'Índex de diversitat de Shannon decreixen de 2.22 (aigua neta, pou P13) fins a 1.49 (aigua contaminada per LABs, pou 6). Així mateix, el LNAPL no presenta gran diversitat de microorganismes, amb un valor de 1'79. Finalment també s'observa una pèrdua de la biodiversitat al final del procés de bioestimulació amb nutrients (AN) (40 dies), amb un valor de  $H'$  de 1'28.

**Taula 5.3.** Índex de Shannon-Wiener ( $H'$ ) de la diversitat bacteriana estimada, basat en els perfils de DGGE.

Mostra	$H'$
NMP D0	2,30
NMP D-1	1,66
NMP D-2	1,59
NMP D-3	0,16
LNAPL	1,79
Aigua P6 (presència de LABs)	1,49
Aigua P13 (sense presència de LABs)	2,22
Biodegradació A	2,37
Biodegradació AN	1,28

Els resultats mostren una comunitat microbiana complexa. Considerant que la molècula dels LABs integra estructures alifàtiques i aromàtiques, i tenint en compte la diversitat d'isòmers que la componen, és lògic pensar que existeixen en la mescla diversos microorganismes involucrats en la seva degradació.

L'índex de Shannon aplicat sobre dades obtingudes mitjançant DGGE té utilitat per a comparar mostres. No es pot emprar però com a indicador directe de la biodiversitat, a causa de la resolució de la tècnica, que representa molt bé les estructures poblacionals, però no és capaç de detectar les poblacions que es troben per sota del 0'1%. Aquest fet es pot confirmar observant els valors obtinguts per piroseqüenciament amb els obtinguts per DGGE en la mateixa mostra (capítol 6 i capítol 9).

### 5.6. Assaig de degradació de LABs amb *P. lavamentivorans* DSMZ13023

La soca *P. lavamentivorans* DSMZ13023 ha confirmat una gran capacitat degradadora de LABs arribant a degradar un 64,7% dels alquilbenzens. La degradació als 20 dies d'incubació es mostra a la taula 5.4. Cal destacar aquests resultats, ja que es tracta de la primera vegada que es demostra que aquest microorganisme pot degradar LABs.

**Taula 5.4.** Biodegradació dels diferents isòmers de LABs per part de *P. lavamentivorans* DSMZ13023 als 20 dies d'incubació.

Degradació			
C10	66,88%	±	10,07%
C11	62,81%	±	6,76%
C12	63,44%	±	6,53%
C13	63,10%	±	2,28%
C14	81,86%	±	0,96%

*Parvibaculum* ha estat descrit com un microorganisme degradador de LASs que catalitza el primer pas de la degradació d'aquests (Schleheck, Knepper et al. 2004).

La ruta de degradació dels C<sub>12</sub>-LASs per *Parvibaculum lavamentivorans* ha estat descrita (Dong, Eichhorn et al. 2004, Schleheck, Knepper et al. 2007). *P. lavamentivorans* degrada els LASs presents a les barreges comercials (C10 a C13) fins a sulfonil carboxilats i sulfonil dicarboxilat. El procés comença amb una  $\omega$ -oxidació de la cadena alquílica, seguida per una  $\beta$ -oxidació. *Parvibaculum* és capaç tan sols de dur a terme aquesta primera part de la degradació. Diversos autors (Dong, Eichhorn et al. 2004, Schleheck, Knepper et al. 2007), afirmen que la soca *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1 no té la capacitat de degradar l'anell aromàtic sulfonat, i per a degradar completament els LABs es complementa amb altres soques (per exemple, Delftia (Dong, Eichhorn et al. 2004)).

Aquest organisme s'ha destacat per seva capacitat degradadora de tensioactius, no només LASs, sinó també altres surfactants aniònics (com dodecà sulfat o metilester sulfat) i no iònics (com Tween 20 i 80), quan disposa d'un suport sòlid. Així doncs, *P. lavamentivorans* s'ha relacionat principalment amb la degradació de surfactants.

No obstant, aquest gènere no ha estat descrit com a degradador de LABs amb anterioritat. El fet que aquesta soca empri també cadenes alquíliques com hexadecà o dodecà (Schleheck, Knepper et al. 2007), a més de la presència de cadenes alquíliques en els compostos que degrada (com el Tween) i la incapacitat de degradar certs surfactants sense aquestes cadenes (com l'etilbenzè sulfonat) fa pensar que aquest microorganisme podria estar relacionat amb la degradació de cadenes alquíliques.

## Resultats destacats del capítol

Tant el consorci TD com la microbiota autòctona són capaços de degradar els alquilbenzens en condicions aeròbies i en presència de font suplementària de nitrogen i fòsfor, si bé la microbiota autòctona aconseguix millors resultats. Ambdós tractaments són productors d'emulsionants, facilitant la biodisponibilitat del contaminant.

S'ha detectat l'existència de patrons de degradació d'isòmers de LABs, seguint el principi de la distància en concordància amb estudis anteriors.

La diversitat microbiana de l'aigua subterrània de l'emplaçament disminueix en aquells pous amb presència d'alquilbenzens enriquint-se amb microorganismes capaços de degradar els LABs o els seus metabòlits

S'ha demostrat per primera vegada que *Parvibaculum lavamentivorans*, gènere descrit com a degradador d'alquilbenzens sulfonats (LASs), és capaç de degradar LABs en cultiu pur i condicions aeròbies. La seva detecció tant en pous afectats per LABs com en creixement actiu en plaques de NMP amb LABs com a font de carboni indicaria que pot tenir un paper important en la degradació de LABs a l'emplaçament.



# Capítol 6

Avaluació de la biodegradabilitat  
d'alquilbenzens lineals en diferents  
condicions redox



En el capítol 5 s'ha demostrat la capacitat degradadora de la microbiota autòctona de l'aqüífer per a la biodegradació dels LABs presents, sempre que hi hagi una aportació suplementària de nitrogen i fòsfor. Diversos estudis han mostrat la biodegradabilitat dels LABs en aigües i sediments (Johnson, Barry et al. 2001, Martinez-Pascual, Jimenez et al. 2010) i per tant la possibilitat d'aplicar la tecnologia de la bioremediació.

Un fet destacable de l'emplaçament objecte d'estudi és que les concentracions de nitrat i oxigen són diferents en els diferents punts de mostreig de l'aigua subterrània. Aquestes diferències poden ser indicatives de la degradació de matèria orgànica usant nitrat com a acceptor final d'electrons, i per tant, de l'existència de processos de biodegradació en condicions desnitrificants. A l'hora de dissenyar estratègies de bioremediació *in situ* és molt important conèixer si la microbiota autòctona de l'aqüífer és capaç de degradar LABs en aquestes condicions.

En l'etapa de disseny d'estratègies de la bioremediació *in situ*, si existís aquest potencial de degradació de LABs en condicions anaeròbies es podria implementar un sistema de bioremediació sense necessitat d'oxigenació, molt més econòmic i senzill de dur a terme.

## Objectius

L'objectiu principal d'aquest capítol és avaluar comparativament la biodegradació de LABs en mostres d'aigua subterrània sota condicions aeròbies, desnitrificants o seqüencials (aeròbies a l'inici seguides, desnitrificants a continuació), amb un període d'incubació de 90 dies a escala de laboratori (experiments en *batch*). Al mateix temps s'ha estudiat l'evolució de les comunitats microbianes autòctones al llarg de l'experiment en les diferents condicions redox.

Per tal de valorar els canvis en la població microbiana i avaluar l'efecte dels diferents acceptors d'electrons en l'estructura de la comunitat, s'han dut a terme anàlisis de DGGE i piroseqüenciament. Així mateix, s'ha quantificat mitjançant qPCR la població de gens 16S rRNA i gens relacionats amb la desnitrificació (*nosZ*) i processos de degradació d'hidrocarburs (*alkB*, *bssA* i *tod*).

### 6.1. Degradació en condicions aeròbies, desnitrificants i seqüencials aeròbies-desnitrificants

Com es pot observar a la taula 6.1., la biodegradació final més elevada s'assoleix en condicions aeròbies (99% als 90 dies), però sorprenentment el tractament seqüencial assoleix uns resultats similars tant als 60 com als 90 dies.

L'eliminació més gran de LABs ha estat assolida en els tractaments aeròbic i seqüencial, amb un 99% i un 95% de degradació respectivament. La major part de la degradació en els dos tractaments es troba en els primers 30 dies. Després d'aquest període, el tractament aeròbic continua amb altes taxes de degradació, mentre que el seqüencial s'alenteix molt lleument entre els dies 60 i 90, probablement degut al canvi de les condicions redox i la necessitat d'adaptació de la microbiota.

El tractament desnitrificant és més lent, i compta amb una fase d'aclimatació que arriba fins als 60 dies. Després degrada un 63% dels LABs (taula 6.1).

**Taula 6.1.** Percentatges de degradació de LABs en els tractaments aerobi (AER), desnitrificant (DN) i seqüencial (SEQ)

	AER	CI <sup>a</sup>	DN	CI <sup>a</sup>	SEQ	CI <sup>a</sup>
Inici	0%	A <sup>a</sup> /A <sup>a</sup>	0%	A/A	0%	A/A
Dia 30	80%	C/CD	0%	A/A	80%	C/CD
Dia 60	87%	C/CD	0%	A/AB	89%	C/CD
Dia 90	98%	C/D	63%	B/BC	95%	C/CD

<sup>a</sup> Significació estadística mitjançant el mètode de Fisher usant el 99/95% (p<0.01 o 0.05) d'interval de confiança: la mateixa lletra indica manca de significació estadística.

Experiments en microcosmos amb fangs contaminats per LABs en absència d'oxigen han mostrat baixes o inexistent degradacions d'alquilbenzens (Steber, Herold et al. 1995, Bhatia, Singh 1996). Recentment, s'ha demostrat la possibilitat de degradació de LABs procedents de *cable oil* a baixes concentracions en condicions desnitrificants (Johnson, Barry et al. 2007), en contrast amb els resultats observats amb altres acceptors terminals d'electrons com Fe(III) o sulfat. L'avaluació de la biodegradació es va fer emprant 5 µl LABs/ml de medi mineral i un inòcul procedent d'un sòl contaminat per LABs. Es va obtenir una degradació del 60% en 100 dies. Aquests resultats són coincidents els obtinguts en aquest capítol. Tanmateix, no es va dur a terme cap anàlisi poblacional, així que no es coneixen els microorganismes implicats en la degradació.

Recentment Johnson (Johnson, Barry et al. 2007) ha demostrat que els LABs són biodegradables en enriquiments líquids en condicions aeròbies i desnitrificants; i no biodegradables en altres condicions redox (reducció de Fe<sup>3+</sup> o SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). En aquell estudi es va assolir un percentatge de degradació d'aproximadament el 50% en un interval llarg de temps (386 dies), partint d'un contingut d'alquilbenzens de 5 µl/ml. En el mateix treball es descriu una ràpida degradació aeròbia emprant inòculs anaerobis, suggerint que els microorganismes anaerobis facultatius, com ho són moltes poblacions desnitrificants, juguen un rol important en la degradació de LABs al medi ambient.

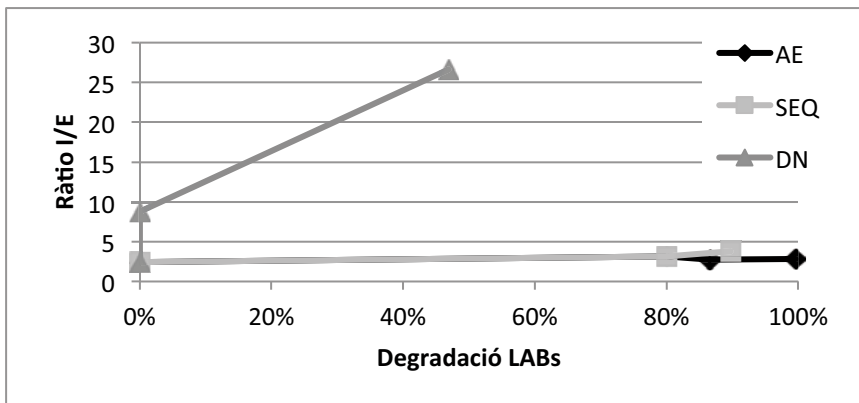
En el present experiment s'assoleixen degradacions més elevades que en l'estudi mencionat i durant un període de temps molt més breu (90 dies), amb tendència a assolir degradacions més elevades segons l'evolució de la ràtio isomèrica.

## 6.2. Evolució de la ràtio isomèrica

La ràtio isomèrica (figura 6.1.) no permet observar tendències o degradació preferencial de cap isòmer en els tractaments aerobi i seqüencial. No obstant, això no significa que no ocorrin aquestes degradacions preferencials. Els anàlisis de concentració de LABs s'han dut a terme cada 30 dies, un període massa ampli per a poder detectar-ho. En el capítol anterior, aquest fenomen es podia observar els dies 7 i 20. Per tant, es pot estimar que en els tractaments aerobi i seqüencial, probablement el patró s'ha manifestat entre els punts de mostreig inicial i 30 dies, mentre que en la degradació sota condicions desnitrificants es pot observar un increment de la ràtio entre els dies 60 i 90, quan les mostres de LABs es comencen a degradar després del període d'aclimatació.

En el cas del tractament desnitrificant, es pot observar un increment dels isòmers interns respecte als externs en el punt del 63% de degradació.

Els resultats són coherents amb els obtinguts en l'anterior capítol, amb un pic al C12 amb un valor de la ràtio de 25 II/IE. Si es té en compte l'evolució de la ràtio entre II/IE pel conjunt d'isòmers, els valors obtinguts al capítol 5 són més discrets, amb una ràtio màxim de 4. No obstant, cal considerar dos factors per explicar la variabilitat entre la variació de la ràtio total: en primer lloc, els valors no són calculats en continu, sino en moments puntuals, i les ràtios observades no tenen per què ser les màximes. En segon lloc, la degradació en condicions aeròbies i desnitrificants es du a terme per l'acció de mecanismes enzimàtics diferents, implicant ràtios isomèriques diferents.



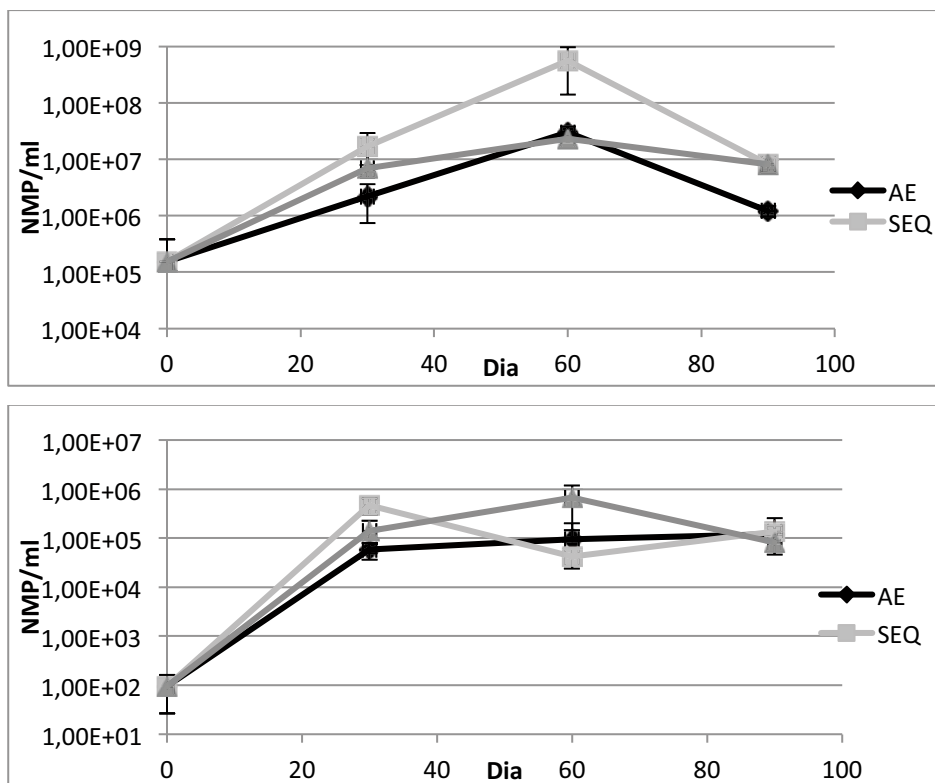
**Figura 6.1.** Evolució de la ràtio isomèrica normalitzada del en relació al % de degradació total dels LABs. La ràtio és calculada dividint els isòmers interns (on el benzè es troba en les posicions de 4 a 6) pels externs (amb l'anell benzènic es troba en les posicions 2 o 3).

### 6.3. Caracterització i dinàmica de la comunitat microbiana durant els processos de biodegradació de LABs a diferents condicions redox

La caracterització de les poblacions microbianes potencialment implicades en el procés de biodegradació de LABs en diferents condicions redox en aigües subterrànies s'ha realitzat mitjançant tècniques clàssiques dependents de cultiu (NMP d'heteròtrofs i degradadors de LABs (apartat 3.2.2 ) i tècniques d'ecologia microbiana molecular independents de cultiu (DGGE i piroseqüenciació (apartats 3.2.7. i 3.2.10).

#### 6.3.1. Quantificació de les poblacions per NMP

Les poblacions microbianes s'han quantificat mitjançant el mètode del nombre més probable (NMP), tant per heteròtrofs com per degradadors de LABs (figura 6.2.)



**Figura 6.2.** Evolució de les poblacions microbianes heteròtrofes (A) i degradadores de LABs (B) al llarg dels 90 dies d'incubació en els tres tractaments diferents: aerobi, seqüencial i desnitrificant.

S'ha observat diferències significatives pel que fa a les poblacions heteròtrofes entre tractaments. En tots els tractaments, els heteròtrofs arriben al seu màxim als 60 dies, presentant després una forta davallada en els tractaments aerobi i seqüencial i pràcticament mantenint-se en el tractament desnitrificant en el període 60-90 dies. El comportament diferencial d'aquest últim podria estar relacionat amb un consum més lent de la matèria orgànica. És important destacar que la població heteròtrofa als 60 dies és superior en el tractament seqüencial (1'5 ordres de magnitud), fet que podria implicar l'existència d'una població desnitrificant activa, responsable de la degradació de matèria orgànica i de metabòlits generats durant els primers 30 dies de degradació aeròbia.

Les poblacions degradadores de LABs presenten un increment de tres ordres de magnitud en els primers 30 dies. A diferència de les poblacions heteròtrofes, en el cas dels degradadors no s'observa una disminució significativa de les poblacions al final de les incubacions. Ambdós comportaments son coherents amb la resposta d'una població especialitzada en la degradació de un contaminant sotmesa a la presència d'aquest producte en quantitats significatives.

En tots els tractaments augmenta la ràtio degradadors de LABs/heteròtrofs, de l'escàs 0,1% fins a 2-3% els primers 30 dies. El tractament aerobi és el que mostra més proporció de degradadors, arribant al 10%.

És destacable que la població degradadora presenta el mateix augment inicial en el tractament desnitrificant que en l'aerobi i el seqüencial. No obstant el fet de no veure biodegradació de LABs en els primers 60 dies d'incubació, podria explicar-se per dos motius: la determinació de degradadors per el NMP es va realitzar en medi mineral (BMTM i no en aigua subterrània) i es va incubar en condicions aeròbies. Aquest fet indicaria que part de la població heteròtrofa que creix en condicions desnitrificants, pot ser degradadora de LABs en condicions aeròbies (NMP + BMTM i LABs) però no en condicions desnitrificants (els experiments en *batch*). Per tant aquests resultats indicarien que son poblacions diferents les que podrien estar degradant els LABs en condicions aeròbies (curt termini) i anaeròbies (a llarg termini entre els dies 60 i 90).

Diversos estudis han demostrat que l'estructura microbiana de les comunitats varia depenent de la disponibilitat d'acceptors d'electrons (Hess, Zarda et al. 1997). L'enriquiment en membres específics de la comunitat microbiana doncs no depèn exclusivament de les fonts de carboni, sinó també de les condicions d'incubació (Stoffels, Amann et al. 1998) i del temps d'incubació (Greene, Kay et al. 2000). També s'ha demostrat que es donen canvis en la predominança però no pèrdua de la diversitat filogenètica. Tot i això, el DGGE és una tècnica que permet observar l'ocurrència de canvis en les estructures poblacionals, mostrant les poblacions majoritàries. Aquells microorganismes amb menys presència no es poden observar. Calen doncs tècniques alternatives com ho son les plataformes de seqüenciació massiva com la piroseqüenciació per poder estudiar poblacions no predominants però que podrien jugar un paper clau en la degradació de contaminants en aquífers.

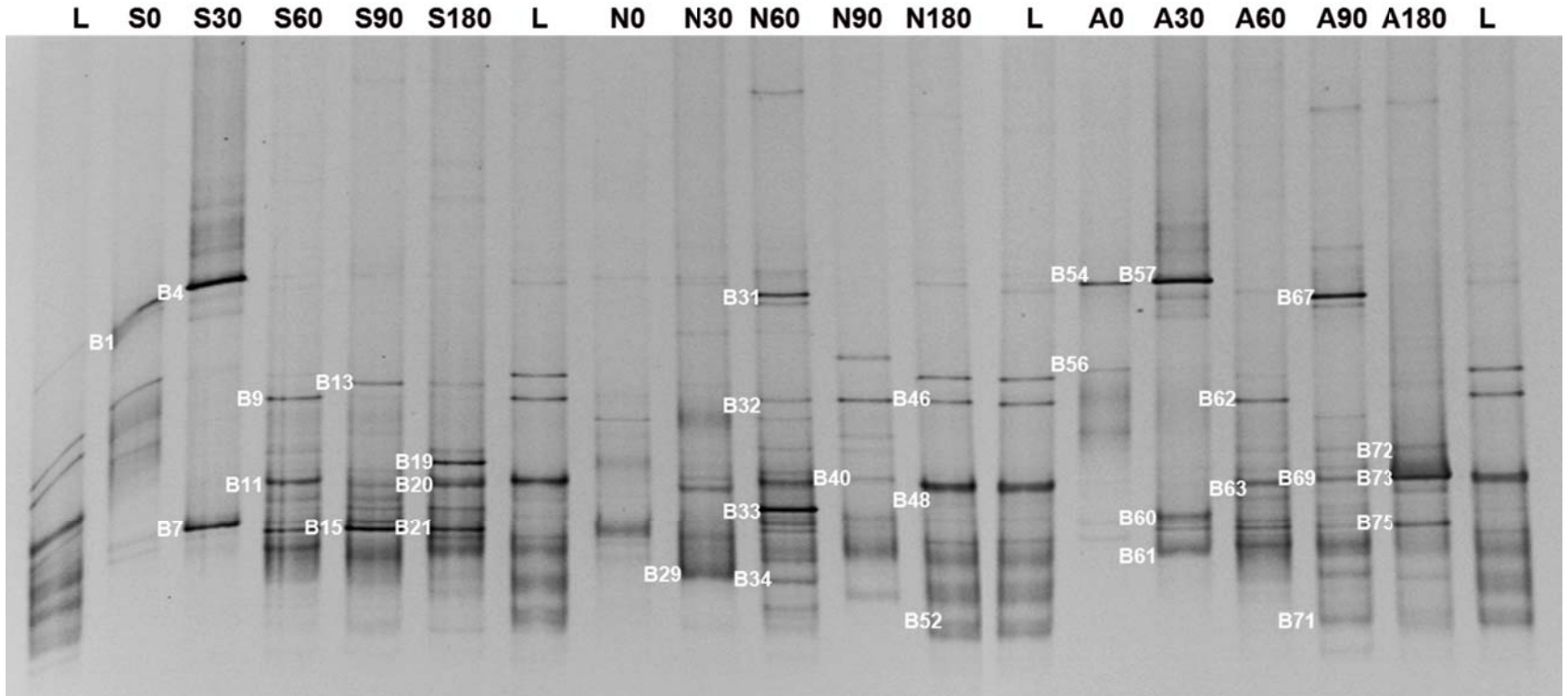
### **6.3.2. Estudi de les comunitats microbianes per DGGE**

L'estructura de la comunitat microbiana caracteritzada per DGGE d'amplicons de la regió hipervariable V3 del gen 16S rRNA es mostra a la figura 6.8. Es troben representades mostres de 0, 30, 60 i també mostres del dia 180, per tal de poder observar canvis poblacionals en un període de temps més llarg. La mostra D180 també és usada com a marcador.

A partir dels perfils dels gens 16S rRNA de les mostres preses al llarg de l'experiment (figura 6.3.) s'han escindit 75 bandes diferents. La identitat filogenètica de les bandes que no s'ha pogut obtenir directament s'ha assignat basant-se en el patró de migració de bandes d'altres punts del mateix tractament.

Les seqüències netes (processades) utilitzades per a la seva assignació filogenètica han estat en tots els casos de més de 430 parells de bases (taula 6.2), i han comprès les regions hipervariables V3-V5 del gen 16S rRNA. Donat que en estudis previs (Yu, Morrison 2004) s'havia establert la necessitat d'estudiar bandes que compreguessin com a mínim dues regions hipervariables, s'ha considerat que els fragments són suficients per a una correcta assignació filogenètica.

**Figura 6.3.** Perfils de DGGE (40 -80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les mostres dels tractaments aerobi (A), seqüencial (S) i desnitrificant (N), preses els dies 0, 30, 60, 90 i 180. Cada carril. Representa una de les tres rèpliques independents per dia i tractament.





Avaluació de la biodegradabilitat en diferents condicions redox

**Taula 6.2.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades.

Banda	Correspon dència	Detecció (>1%)	Longitud (pb)	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% similitud <sup>a</sup>	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>
B1	B4, B20, B54, B57,	S0, S30, A0, A30	527	<i>Methylophilus</i> (NR041257)	98%	$\beta$ -proteobacteria	Methilophylaceae
B7a		S30, S60, S90, N60, N90	506	<i>Hydrogenophaga</i> (AB681846)	98%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonaceae
B9		S60	441	Uncultured <i>Parvibaculum</i> sp. (EU375017)	96%	$\alpha$ -proteobacteria	Rhodobiaceae
B11	B48, B63	S60, S90, S180	489	<i>Sphingobium</i> sp. (AB681403)	100%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae
B15	B21, B75	S60, S90, S180; A60; A90; A180	498	Uncultured Chromatiales (EU375156)	98%	$\gamma$ -proteobacteria	Gammaproteobacteria incertae sedis
B19		S180	515	Uncultured Ectothiorhodospiraceae (AM936319)	99%	$\gamma$ -proteobacteria	Ectothiorhodospiraceae
B20		S60, S90, S180	480	<i>Methylophilus</i> (NR041257)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae
B29		N30	475	Uncultured <i>Parvibaculum</i> sp. (EU375222)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Rhodobiaceae
B31	B67a	N60, N180, A90	519	<i>Methylophilus</i> sp. (GU472577)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Methylophilaceae
B32	B62	N60, N90 A30, A60, A90	513	Comamonadaceae bacterium (AY651926)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
B33		N60	489	Uncultured gamma proteobacterium (EF648107)	99%	$\gamma$ -proteobacteria	Gammaproteobacteria_i ncertae_sedis
B34		S30, S60, S90, SN60S N90	468	Uncultured planctomycete (DQ899895)	96%	Bacteria	Planctomycetes

Avaluació de la biodegradabilitat en diferents condicions redox

B40	N30, N60, N90	550	<i>Sphingobium</i> sp. (JN637965)	95%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae	
B46	N180	470	<i>Dokdonella koreensis</i> strain DS-140 (AY987369)	98%	$\gamma$ -proteobacteria	Xanthomonadaceae	
B52	N180	461	<i>Brevundimonas</i> sp. (HQ327140)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Caulobacteraceae	
B56	S0, A0	493	<i>Pseudomonas</i> sp. B-2 (JN648099)	99%	$\gamma$ -proteobacteria	Pseudomonadaceae	
B60	A30	456	Uncultured Burkholderiales bacterium (DQ234159)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae	
B61	A30, A60, A90	495	<i>Methyloversatilis</i> sp. (JN177630)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Rhodocyclaceae	
B67B	A90	462	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> strain OVC21 (JQ660737)	99%	$\gamma$ -proteobacteria	Xanthomonadaceae	
B69	B73	A60, A90	506	Uncultured delta proteobacterium (AM936907)	99%	$\delta$ -proteobacteria	Desulfhalobiaceae
B71	N60, A90	470	Uncultured Acidobacteria (JN825445)	97%	Acidobacteria	Acidobacteria	
B72	A60, A90, A180	494	Uncultured <i>Chromatiales</i> bacterium clone (EU375156)	99%	$\gamma$ -proteobacteria	Gammaproteobacteria	

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009).  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  representen alfa, beta, gamma i delta-proteobacteria, respectivament.

Les seqüències determinades en aquest estudi s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC145734 a KC145765.

Considerant l'estructura del contaminant, que inclou tant estructures alifàtiques com aromàtiques, diversos grups de microorganismes poden trobar-se implicats en la seva degradació. (Schleheck, Knepper et al. 2004) han suggerit que per la mineralització completa de LASs és necessària la intervenció d'una comunitat microbiana complexa.

En el grup de  $\alpha$ -proteobacteria, s'han identificat membres de les famílies *Sphingomonadaceae*, *Caulobacteraceae* i *Rhodobiaceae*; en el grup de les  $\beta$ -proteobacteria, *Methylophilaceae*, *Rhodocyclaceae* i *Comamonadaceae*; en el grup de les  $\gamma$ -proteobacteria, *Pseudomonaceae*, *Chromatiaceae* i *Xanthomonadaceae*; a més de membres dels grups *Planctomycetes* i *Acidobacteria*.

Entre aquests membres és destacable l'àmplia presència de gèneres amb capacitat degradadora d'hidrocarburs que pertanyen al grup de les  $\alpha$ -proteobacteria, com *Sphingomonas*, *Sphingobium* i sobretot *Parvibaculum*, gènere descrit com a degradador de LASs en condicions aeròbies, i que en el present estudi (capítol 5) s'ha demostrat capaç de degradar LABs també en condicions aeròbies. També són destacables famílies del grup  $\beta$ -proteobacteria descrites com a degradadores d'hidrocarburs (*Comamonadaceae*, *Rhodocyclae*) i membres del grup  $\gamma$ -proteobacteria amb les mateixes capacitats (*Chromatiales* i *Xanthomonaceae*).

La majoria de microorganismes identificats es troben en tots o diversos tractaments. Les excepcions són *Dokdonella koreensis* (90, 180 dies) i el gènere *Brevundimonas* (180 dies) que es troben tan sols al final del tractament desnitrificant. Ambdós gèneres són aerobis facultatius i tenen l'habilitat de créixer en condicions desnitrificants. Aquest fet, coincident amb el període d'inici del procés de biodegradació de LABs (60-90 dies), podria indicar un paper important d'aquestes poblacions en el procés de degradació anaeròbia de LABs o dels seus metabòlits de degradació parcial que es generin a partir de la degradació inicial dels LABs realitzada per altres organismes.

*Dokdonella koreensis*, un microorganisme amb capacitat de créixer en condicions desnitrificants (Yoon, Kang et al. 2006), s'ha detectat amb anterioritat en ambients contaminats per hidrocarburs en condicions potencialment anaeròbies (Alonso-Gutierrez, Figueras et al. 2009). S'ha isolat una soca d'aquest gènere capaç de créixer en hidrocarburs aromàtics simples (Kaiya, Utsunomiya et al. 2011).

El gènere *Brevundimonas* s'ha detectat amb freqüència en mostres contaminades per hidrocarburs (Vinas, Sabate et al. 2005, Xiao, Guo et al. 2010).

També cal destacar l'àmplia distribució de filotips relacionats amb la família de les *Metilofilaceae*, en concret propers al gènere *Methylophilus*, un gènere metilotrof obligat, detectat en condicions aeròbies els primers 30 dies de incubació. Aquest fet es coincideix amb els valors de màxima degradació trobats en condicions aeròbies, i podria anar lligat a la utilització de metabòlits resultants de la degradació de LABs o altres compostos orgànics simples. Tanmateix és destacable la presència de *Methylophilus* també en condicions desnitrificants a partir dels 60 dies d'incubació i que podria anar lligat a la presència de compostos simples producte de la degradació de compostos orgànics presents en les aigües subterrànies de l'emplaçament. El fet de trobar *Methylophilus* en condicions desnitrificants és relativament poc freqüent però el seu creixement en condicions desnitrificants ha estat descrit anteriorment (Ginige, Hugenholtz et al. 2004).

Entre els diversos gèneres identificats és també remarcable la presència de *Parvibaculum*, identificat anteriorment (capítol 5) com a degradador de LABs en cultiu pur (veure 5.3.4.3), i descrit com a degradador de LASs en condicions aeròbies. El fet de trobar *P. lavamentivorans* en condicions desnitrificants indicaria la potencialitat de certs llinatges d'aquest gènere de créixer en condicions desnitrificants (Blothe, Roden 2009, Weert, Vinas et al. 2011). En el capítol 9 de la present tesi s'analitza la composició de la comunitat microbiana present a les mostres AE90 i DN90 (entre d'altres) per piroseqüenciament. Els resultats obtinguts demostren la predominança d'aquest gènere en condicions tant aeròbies (més del 10%) com desnitrificants (més del 30%), confirmant tant la capacitat de créixer en condicions desnitrificants com en aeròbies.

Pel que fa a l'evolució de les comunitats microbianes, al principi de la biodegradació es pot trobar un predomini de les  $\beta$ -proteobacteria en els tractaments aerobis i seqüencials. Aquesta predominança podria indicar un rol principal en la degradació dels LABs o en la utilització de metabòlits de degradació parcial dels LABs. El fet que la comunitat microbiana no s'especialitzi en un o pocs gèneres, sinó que es produeixi un enriquiment en la diversitat mostra que la complexitat del contaminant requereix una comunitat microbiana complexa i variada per tal de ser degradat.

La importància relativa de les of  $\beta$ -proteobacteria decreix gradualment, incrementant la presència dels grups  $\alpha$ -proteobacteria i  $\gamma$ -proteobacteria, que prenen importància en els tractaments aerobi i seqüencial a partir del dia 60.

En la degradació en condicions desnitrificants no s'ha observat aquest patró. Els microorganismes dels grups  $\alpha$ -proteobacteria i  $\beta$ -proteobacteria són present des del principi. Tenint en compte que la degradació es detecta per primera vegada el dia 90, és possible que aquest canvi poblacional s'hagi produït a posteriori, quedant fora del període analitzat. No obstant el que indicarien els resultats és que les comunitats microbianes no només varien en funció de les condicions redox sinó també en funció de la composició de la mescla de LABs en conjunció amb la presència o absència d'oxigen, proporcionant una major complexitat en la seva interpretació.

### **Anàlisi estadístic**

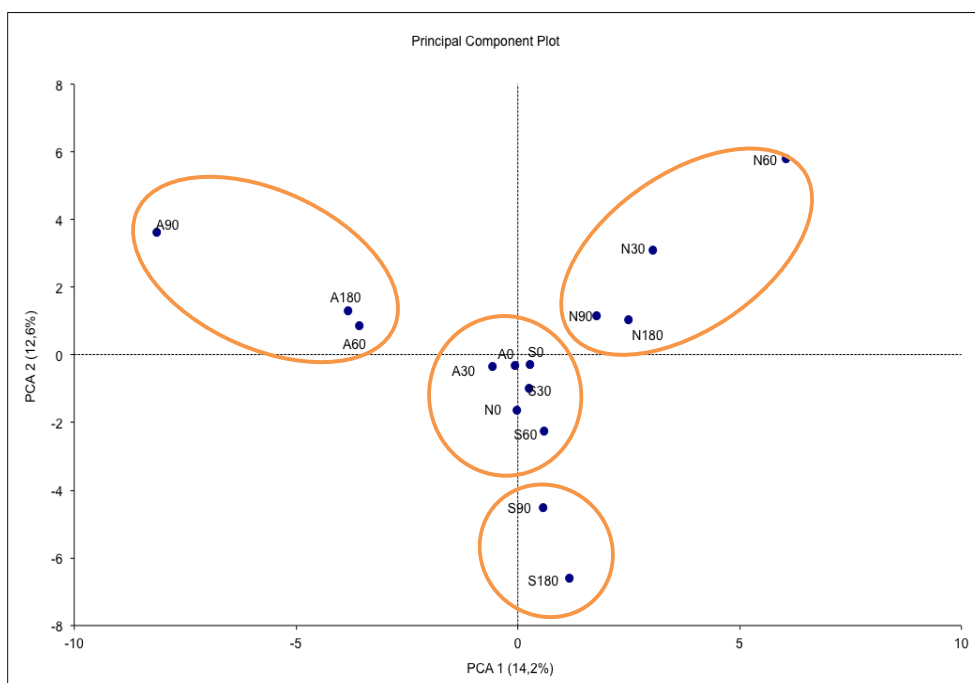
Tot i la clara predominança de certes bandes, és difícil valorar l'evolució de la comunitat microbiana basant-se en la intensitat relativa de les bandes de DGGE. En conseqüència, els canvis en l'estructura de la comunitat microbiana s'han examinat mitjançant l'anàlisi de components principals (ACP) (figura 6.4) i l'anàlisi clúster a partir del coeficient de similitud de Pearson (figura 6.5).

La variabilitat explicada per l'ACP és baixa. Aquest fet pot estar relacionat amb l'alta diversitat de la comunitat microbiana i la gran variació al llarg del temps que presenten els diversos tractaments. L'ACP mostra quatre agrupacions principals, corresponents a les mostres inicials (dies 0 i 30) i un clúster per a cadascun dels tractaments.

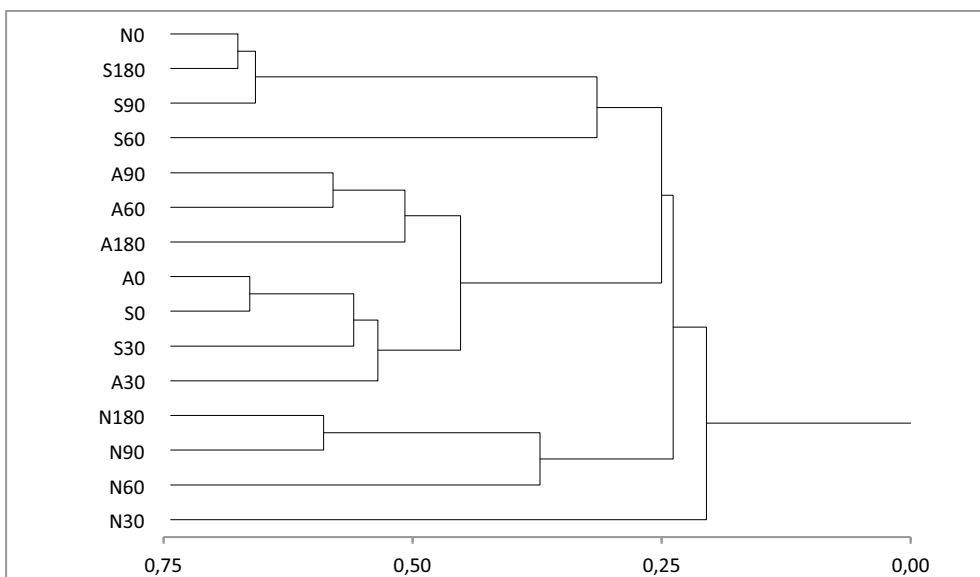
En posició central trobem la composició inicial de la comunitat microbiana, que divergeix en tres direccions diferents depenent del tractament triat. És destacable que A30 i S30 són molt properes entre elles i al punt inicial.

La component 1 diferencia les mostres sotmeses a un tractament de bioestimulació en condicions aeròbiques (amb valors negatius) de les sotmeses a una bioestimulació en condicions desnitrificants (amb valors positius).

Pel que fa a la bioestimulació en condicions seqüencials, el clúster es troba en valors positius de la component 1, tot i que en menor mesura (coherentment amb l'evolució de les poblacions microbianes, sotmeses a condicions aeròbiques inicialment i per tant amb poblacions microbianes menys adaptades a les condicions de desnitrificació). Aquest quart clúster es separa dels altres en la component 2, prenent valors negatius. Així doncs, aquesta segona component es pot relacionar amb el canvi de condicions redox durant el tractament.



**Figura 6.4.** Anàlisi de components principals. El percentatge de variabilitat explicada per cada component és mostrada en parèntesi a cada axis.



**Figura 6.5.** Anàlisi clúster a partir dels coeficients de similitud de Pearson.

L'anàlisi clúster mostra els mateixos patrons que l'ACP. El tractament aerobi, la mostra inicial, i els primers 30 dies del tractament seqüencial són molt similars, i així s'agrupen. D'altra banda, el seqüencial divergeix formant un clúster propi a partir dels 60 dies. Aquest és lleugerament més similar a l'aerobi que al desnitrificant, tot i que la similitud amb qualsevol dels dos grups és només d'un 25%. Finalment s'observa un clúster conformat per les mostres del tractament desnitrificant en tot el període experimental (N30-N180), essent les mostres de 90 i 180 dies més similars entre elles fet que podria anar lligat a una especialització i canvi poblacional relacionat amb la utilització de LABs, que s'inicia als 90 dies.

### 6.3.2.1. Evolució de la diversitat

Tot i que és clar que l'exposició a hidrocarburs provoca una davallada de la biodiversitat microbiana (Atlas 1981, Lindstrom, Barry et al. 1999), ja que l'ús dels hidrocarburs com a font de carboni enriqueix només alguns membres de la comunitat microbiana, l'impacte de la bioremediació no és encara clar. Mentre alguns autors han descrit fortes reduccions en la diversitat durant els tractaments (Ogino, Koshikawa et al. 2001, Roling, Milner et al. 2002, Vinas, Sabate et al. 2005), altres treballs mostren un increment de la biodiversitat durant la bioremediació (Zucchi, Angiolini et al. 2003, Kaplan, Kitts 2004).

En aquest cas, l'índex de Shannon-Wiener (taula 6.3) ha permès observar canvis significatius en la diversitat microbiana entre l'inici i el final de l'experiment, i entre els diversos tractaments. En les rèpliques de PCR, la desviació estàndard ha estat sempre de menys del 0'03.

**Taula 6.3.** Índex de Shannon-Wiener ( $H'$ ) de la diversitat bacteriana estimada, basat en els perfils de DGGE.

Dia	Aerobi	Desnitrificant	Seqüencial aerobi-desnitrificant
0	1,61	1,32	1,47
30	2,10	2,01	1,59
60	2,09	2,68	2,00
90	2,33	1,68	2,14
180	1,74	2,07	2,20

El càlcul de l'índex de Shannon-Wiener aplicat a la diversitat bacteriana estimada, però, s'ha de prendre com un indicador de variació de la diversitat més que un índex absolut. La tècnica del DGGE, com s'ha comentat amb anterioritat, té un llindar de detecció del 0'1% com a màxim. És a dir, les comunitats microbianes que conformen la biodiversitat "rara", no es troben representades als perfils de bandeig. En aquest cas, es pot confirmar la diferència entre els índex de Shannon-Wiener procedents de DGGE i procedents d'un anàlisi per piroseqüenciació (capítol 9) de la mateixa mostra.

En l'anàlisi per DGGE, les mostres AE90 i DN90 obtenen uns valors de l'índex de Shannon-Wiener de 2'33 i 2'14, respectivament; mentre que en l'anàlisi per piroseqüenciació, les mateixes mostres obtenen uns valors de 3'91 i 3'55 (capítol 9) respectivament. La diferència és de més d'un punt. No obstant, si que es mantenen les proporcions, essent doncs un bon indicador de l'afectació de la diversitat microbiana deguda a l'addició de contaminants o la bioestimulació sota diverses condicions.

### 6.3.3. Quantificació de població total i gens funcionals

Diversos autors s'han centrat en relacionar el potencial biodegradador amb famílies filogenètiques. Fins fa ben poc, les tècniques d'ecologia microbiana molecular s'han concentrat principalment en 16S rRNA per identificar espècies bacterianes en mostres ambientals. No obstant, el catabolisme dels hidrocarburs (tant aromàtics com alifàtics) no és limitat en pocs gèneres, i la major part de famílies filogenètiques són encara desconegudes (DeLong, Pace 2001).

En els últims anys, la detecció de gens catabòlics que codifiquen per enzims específics de degradació de contaminants s'ha implementat com una tècnica més directa per avaluar el potencial biodegradador (Baldwin, Nakatsu et al. 2003). Les tecnologies basades en el DNA permeten la demostració de la presència de gens catabòlics, l'activitat dels quals pot ser inferida basant-se en increments del nombre de còpies al llarg del temps.

Diversos gens i enzims relacionats amb el metabolisme dels hidrocarburs han estat coneguts i caracteritzats a partir d'estudis amb microorganismes aïllats. Aquests enzims duen a terme funcions claus per a la degradació com seria l'activació a través d'oxigenacions, el trencament d'anells aromàtics, etc. Pot ser hipotetitzat que una comunitat microbiana activa capaç de degradar hidrocarburs està enriquida en aquestes funcions, que poden ser analitzades amb aproximacions genotípiques (seqüències) o fenotípiques (activitat) (Junca, Pieper 2010)

L'anàlisi funcional de la comunitat microbiana proporciona la capacitat d'avaluar i optimitzar les pràctiques in situ (Beller, Kane et al. 2008).

En aquest capítol, s'han avaluat diversos gens relacionats amb la desnitrificació i la capacitat degradadora d'hidrocarburs (alcans i compostos monoaromàtics, les estructures presents en els alquilbenzens) per l'altre

El nombre de còpies gèniques es mostra a la figura 6.11. El 16S rRNA ha augmentat de  $10^7$  còpies gèniques/ml a  $10^9$  i  $10^{10}$  còpies gèniques/ml pels tractaments desnitrificant i aerobi, respectivament, al dia 30. Després les poblacions aeròbies decreixen, mentre que les desnitrificants es mantenen als mateixos nivells fins el dia 180. Aquests resultats són també coherents amb els resultats obtinguts amb la tècnica del nombre més probable.

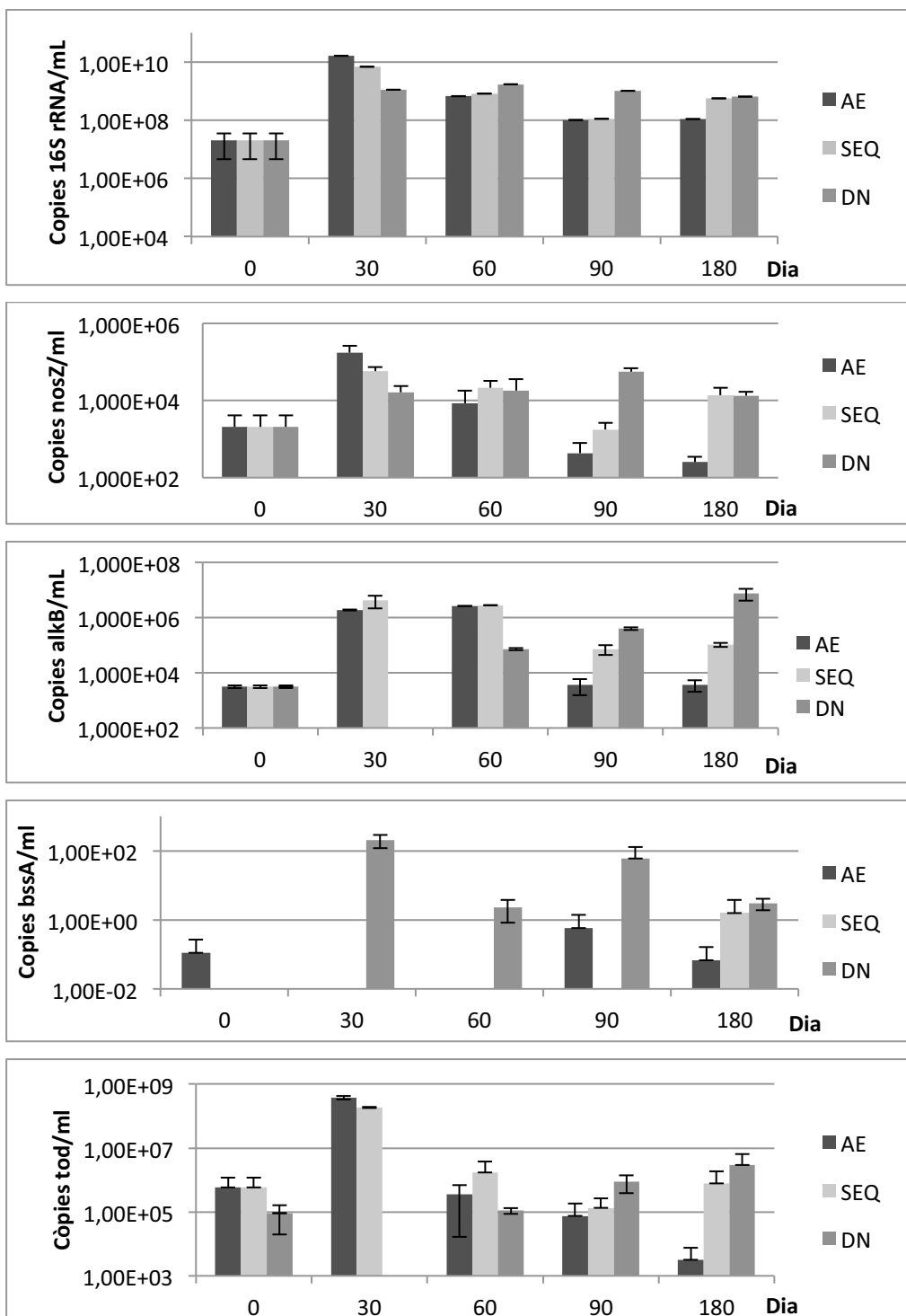
El nombre de còpies dels gens catabòlics presenta una gran variabilitat entre tractaments i al llarg del temps. En primer lloc, cal destacar que està disponible un nombre limitat de seqüències de gens catabòlics, clonats majoritàriament a partir de soques aïllades. És possible doncs que les eines moleculars puguin detectar tan sols components particulars dins de la gran variabilitat de gens catabòlics.

En el cas del *nosZ*, es pot apreciar un clar augment de còpies gèniques durant els primers 30 dies en tots els tractaments (de  $10^2$  còpies gèniques/ml a  $10^4$ - $10^5$  còpies gèniques/ml), probablement degut al fort increment en biomassa total. A partir d'aquest punt, la capacitat d'usar nitrat com a acceptor final d'electrons es perd gradualment en el cas de tractament aerobi, passant de  $10^5$  còpies gèniques/ml a  $10^2$  còpies gèniques/ml. En els altres dos tractaments, tot i que el seqüencial presenta una davallada entre els dies 60 i 90, la presència de *nosZ* s'estabilitza i augmenta fins a  $10^4$  còpies gèniques/ml, assolint un ràtio *nosZ*/16S rRNA de  $10^{-4}$ .

Pel que fa a l'*alkB*, en els tractaments aerobi i seqüencial, durant els primers 30 i 60 dies es detecta un fort increment (tres ordres de magnitud) de la presència del gen, causat per la disponibilitat del substrat i el gran augment de biomassa. Un cop degradada la major part de LABs, es produeix una davallada de la quantitat d'*alkB*. En canvi, el tractament desnitrificant, al tenir una llarga fase d'adaptació, el gen no es detectat fins al dia 60, augmentant progressivament fins a quantitats equiparables als altres tractaments el dia 180. Aquest comportament no és coherent, ja que *alkB* va lligat estrictament a la degradació aeròbia. Per altra banda, aquest gen havia desaparegut el dia 60, i per tant es tracta d'un recreixement.



Avaluació de la biodegradabilitat en diferents condicions redox



**Figura 6.6.** Còpies gèniques per mil·lilitre dels gens 16S rRNA, *nosZ*, *alkB*, *tod* i *bssA*, en el tractament aerobi (AE), seqüencial (SEQ) i desnitrificant (DN).

El gen *bssA* presenta unes dinàmiques completament oposades a les detectades pel gen *alkB*. Al ser un gen associat a la degradació en condicions anaeròbies, caldria esperar trobar-lo en major quantitat en els tractaments seqüencial o desnitrificant. En el tractament desnitrificant es detecten en tots els punts concentracions de *bssA* d'entre  $10^1$  i  $10^2$  còpies gèniques/ml. En el tractament seqüencial no es pot observar fins al dia 90, probablement a causa de la recuperació més lenta de les poblacions capaces de créixer en condicions desnitrificants. És destacable que en el tractament aerobi es detecta *bssA* el dia 180. Aquest fet podria indicar que es podria produir un esgotament de l'oxigen de manera microespacial, donat que la biodegradació es gairebé completa. Per a degradar completament els LABs continguts en un *batch* es requereixen aproximadament 80 ml d'oxigen, corresponents a 380 ml d'aire. Per tant, tot i que els *batch* estiguin airejats, existeix la possibilitat de l'esgotament de l'oxigen.

Finalment, el gen *tod*, relacionat amb la degradació aeròbia dels anells aromàtics, s'incrementa en tres ordres de magnitud els primers 30 dies dels tractaments aerobi i seqüencial, seguint el mateix patró que l'*alkB*. En els dies 60, 90 i 180, la seva presència baixa però es segueix mantenint en els dos tractaments. D'altra banda, aquest gen presenta el mateix comportament que *alkB* pel que fa a la bioestimulació desnitrificant: tot i ser un gen relacionat estrictament amb la degradació aeròbia, la seva concentració desapareix a l'inici del tractament desnitrificant però augmenta en els punts 60 a 180 dies d'aquest. Aquest gen, en indicar el potencial degradador d'anells aromàtics, va lligat a la disminució de l'aromaticitat de la mostra.

En general, les variacions de concentració dels diversos gens es corresponen amb les condicions redox aplicades i l'avanç de la biodegradació en les diverses mostres. L'increment de 16S rRNA mostra l'efectivitat de la bioestimulació, incrementant les poblacions microbianes en els *batch*.

Els gens relacionats amb la biodegradació d'hidrocarburs es poden relacionar amb variacions de proporció entre les diverses poblacions d'una comunitat diversa i principalment facultativa. La presència de *bssA*, tot i que en baixes proporcions, al final del període de biodegradació aeròbia sembla indicar-ho.

Finalment, és destacable el fenomen pel qual s'ha detectat concentracions relativament altes dels gèneres *alkB* i *tod* en mostres corresponents al tractament desnitrificant. No obstant, si s'observa la ràtio *alkB*/16S rRNA i *tod*/16S rRNA, aquest increment és menys pronunciat, és a dir, part de la diferència entre els valors inicials i finals dels gens pot ser atribuït a un increment poblacional. Aquest fet podria ser atribuït a l'augment de poblacions que contenen aquest gen, microorganismes facultatius degradadors d'hidrocarburs, sense necessitat d'expressar-lo. Per comprovar si efectivament es produeix l'activitat codificada pel gens considerats, s'hauria de dur a terme una quantificació de RNA.

#### **6.4. Assaig de degradació de LABs amb *P. lavamentivorans* DSMZ13023**

Donada la presència de *Parvibaculum lavamentivorans* al tractament seqüencial, s'ha dut a terme un experiment de biodegradació en cultiu pur i condicions desnitrificants per tal de confirmar la seva capacitat degradadora en condicions anaeròbies.

El resultat de l'experiment (taula 6.4) prova que *P. lavamentivorans* no és capaç de degradar els LABs en condicions desnitrificants en 40 dies, ja sigui amb o sense tensioactiu. Tan sols és capaç de fer-ho en condicions aeròbies, de la mateixa manera que s'ha descrit per els LASs (Schleheck, Knepper et al. 2004).

Cal considerar que el període avaluat és més breu que els períodes en que s'ha obtingut biodegradació per part de la microbiota autòctona en condicions desnitrificants. No obstant, al tractar-se d'un cultiu pur i no d'una comunitat microbiana complexa, no necessita un període d'adaptació com l'observat en les cinètiques de degradació corresponents al tractament desnitrificant.

**Taula 6.4.** Degradació de LABs per part de *P. lavamentivorans* en condicions desnitrificants.

	Sense tensioactiu		Amb tensioactiu	
Dia 0	2311,90	± 47,65	2665,34	± 817,82
Dia 20	2395,94	± 83,01	2027,91	± 451,27
Dia 40	2286,11	± 29,26	2231,41	± 31,00
Control	2004,87	± 54,028	2091,14	± 185,27

### Resultats destacats del capítol

La microbiota autòctona és capaç de degradar els LABs tant en condicions aeròbies com en condicions desnitrificants. En condicions desnitrificants el procés és més lent, requerint un període d'adaptació de 60 dies.

La quantificació de gens funcionals relacionats amb la degradació d'hidrocarburs confirma les capacitats degradadores de la microbiota autòctona.

L'estratègia seqüencial ha permès aconseguir percentatges de degradació de LABs equiparables al tractament aerobi sense addicionar oxigen els darrers 60 dies. Es tracta d'una opció ràpida i amb un menor cost, on es proporciona oxigen durant un temps limitat per després tornar a condicions desnitrificants. Aquesta aproximació podria ser usada a escala de camp per tal de disminuir els costos de la bioremediació.

Les comunitats microbianes varien tant al llarg de la degradació dels LABs com segons les condicions redox presents. Al llarg de les degradacions aeròbia i seqüencial s'ha observat una predominança dels beta-proteobacteris durant els estadis inicials de la bioestimulació, mentre que els alfa- i gamma-proteobacteris prenen importància en estadis posteriors. S'ha detectat per DGGE diverses seqüències d'alta similitud amb gèneres relacionats amb la degradació d'hidrocarburs, com *Sphingomonas*, *Sphingobium* i *Parvibaculum*.

*Parvibaculum lavamentivorans* no és capaç de degradar LABs en cultiu pur sota condicions desnitrificants. Aquesta soca s'ha detectat en els batch corresponents a la bioestimulació desnitrificant quan s'inicia la degradació dels LABs, mostrant que intervé en la degradació.



# Capítol 7

Avaluació de la implantació d'un sistema d'oxidació química acoblat a la bioremediació en reactors de tipus *batch*

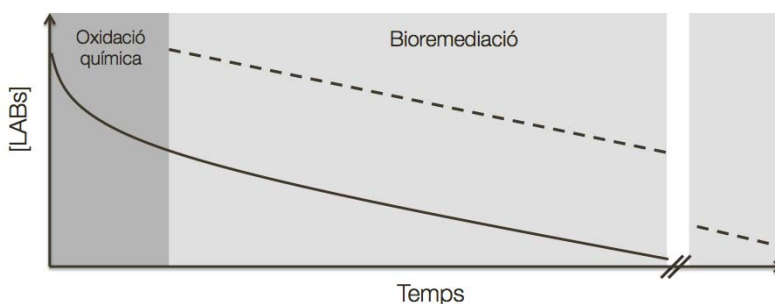


La bioremediació es una tecnologia neta i econòmica (Alexander 1999), però requereix llargs intervals de temps, especialment quan es tracta de LNAPLs on el contaminant no es troba biodisponible. És doncs una tecnologia apropiada per a la ploma de contaminants dissolts, però pot presentar problemes en cas de tenir fase lliure present (Singh, Kuhad et al. 2009).

Per tal de proveir de tractaments efectius per a l'eliminació dels contaminants, s'ha demostrat recentment que acoblar dues tecnologies diferents pot millorar el rendiment global de la remediació (Sutton, Grotenhuis et al. 2011).

En capítols anteriors, s'ha assolit bons resultats en la biodegradació dels LABs mitjançant la bioestimulació de la microbiota autòctona amb l'addició de nutrients (nitrogen i fòsfor), tant en condicions aeròbies com en seqüencials (condicions aeròbies seguides de condicions desnitrificants). No obstant, el contaminant objecte d'estudi (LNAPL de LABs) presenta una alta densitat i viscositat. Aquesta manca de fluïdesa del LNAPL li confereix una biodisponibilitat molt baixa.

Una vegada descartada la possible aplicació de tensioactius, que podrien provocar un episodi de contaminació massiva de l'aqüífer al disminuir la tensió superficial i facilitar la seva dissolució en aigües subterrànies, s'ha decidit avaluar l'acoblament de l'oxidació química amb una posterior bioremediació. La bioremediació i l'oxidació química són dos dels tractaments més efectius per a tractar aqüífers contaminats. L'acoblament de les dues tecnologies de manera efectiva permet una davallada ràpida a l'inici, deguda a l'oxidació, seguida d'un poliment biològic més lent per acabar d'eliminar el contaminant (figura 7.1).



**Figura 7.1.** Esquema d'un acoblament ideal entre les tecnologies d'oxidació química i biodegradació per a l'eliminació dels contaminants

### Objectiu

En aquest capítol s'avalua l'efectivitat de l'oxidació química cercant un sistema de ràpid remediació dels LABs per a la fase lliure.

Amb la finalitat d'obtenir una estratègia que combini rapidesa, eliminació de la totalitat del contaminant i costos, s'ha plantejat l'acoblament de les tecnologies d'oxidació química i bioremediació. S'ha avaluat l'eliminació dels LABs per part de diversos agents oxidants, l'afectació de les poblacions microbianes i la posterior biodegradació degut a l'aplicació dels oxidants.

### 7.1. Efectivitat degradadora dels oxidants i efectivitat global

Els oxidants considerats han donat resultats desiguals pel que fa a la degradació dels LABs en els experiments en *batch*. El millor resultat ha estat obtingut usant permanganat de potassi, que redueix els LABs un 30%, seguit de la MFR (100 g/L), que aconsegueix degradar-los un 15%. En canvi, la MFR (34 g/L) no presenta degradació (taula 7.1.).

**Taula 7.1.** Degradació dels LABs. Les lletres indiquen les diferències significatives entre tractaments ( $p < 0'05$ ).

	% romanent LABs			
Inici	100,00%	±	8,45%	A
MFR LC	106,69%	±	1,43%	A
MFR HC	84,48%	±	2,79%	B
PM	70,68%	±	2,53%	C

Com s'ha comentat anteriorment, els oxidants químics no només degraden el contaminant. En estudis anteriors s'ha provat també efectes sobre les poblacions microbianes, la toxicitat del contaminant i la seva biodisponibilitat, afectant per tant processos de bioestimulació aplicats posteriorment a l'aquífer (Sahl, Munakata-Marr 2006, Sutton, Grotenhuis et al. 2011). Per tant, per tal de valorar l'efecte de l'oxidant no s'ha d'avaluar únicament la degradació causada per aquest, sinó que s'ha de valorar també la variació de la biodisponibilitat del contaminant romanent (figura 7.4) i la potencial afectació dels posteriors processos de biodegradació dels LABs (figura 7.2).

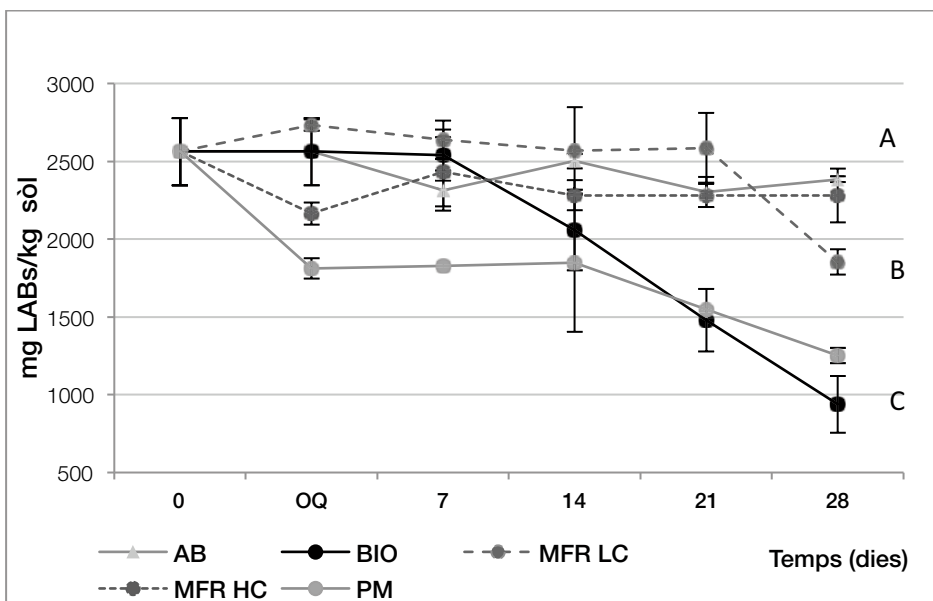
En comparar la degradació global dels LABs (oxidació química més biodegradació) s'ha observat que l'efecte d'aquests és perjudicial per a l'eliminació dels LABs. Mentre el control biòtic assoleix un 63% de degradació, el tractament d'oxidació que millor ha funcionat en global (permanganat) sobrepassa per poc el 50% de degradació. En el cas dels tractaments amb MFR, ambdós inhibeixen considerablement les posteriors biodegradacions, obtenint en total degradacions del 28% i l'11% per les concentracions baixa i alta, respectivament. S'ha de tenir també en compte a l'hora de fer les valoracions el temps necessari per oxidar químicament les mostres. Per a l'oxidació amb MFR, el temps ha estat breu, màxim una setmana, mentre que pel permanganat s'ha requerit 40 dies.

### 7.2. Afectació de la fracció biodisponible

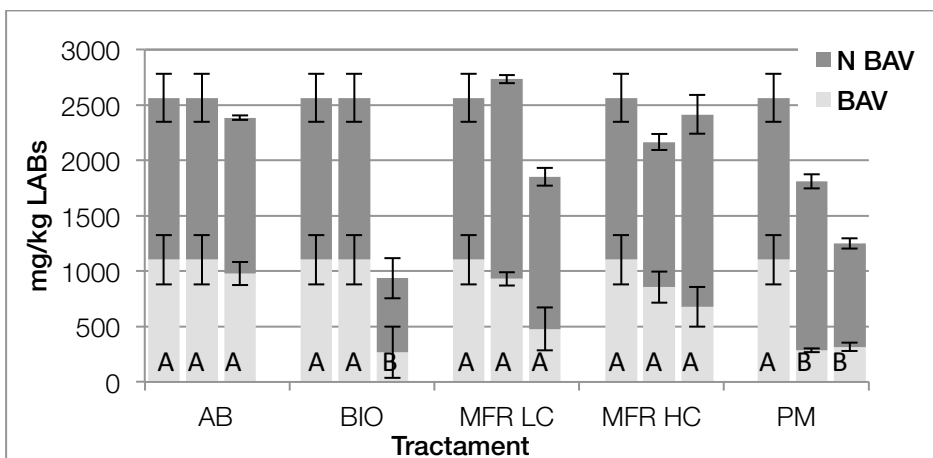
Per determinar com afecta el procés d'oxidació a la biodisponibilitat del contaminant, s'ha quantificat aquesta fracció (apartat 3.1.3.). Els resultats es mostren a la figura 7.3.

Pel que fa a l'evolució de la biodisponibilitat dels LABs, només el tractament amb permanganat la disminueix dràsticament, de ser un 43% dels LABs totals a un 15%. No obstant, al final de la biodegradació, la fracció biodisponible s'ha recuperat fins al 25%. Es pot afirmar doncs que l'oxidació química dels LABs amb MFR o permanganat no té un efecte positiu sobre la millora de la biodisponibilitat del contaminant, en contraposició a la millora en la biodegradabilitat i biodisponibilitat que s'ha observat en altres estudis (Miller, Valentine et al. 1996, Nam, Kukor 2000, Lee, Hosomi 2001, Kulik, Goi et al. 2006).





**Figura 7.2.** Concentració de LABs al sòl inicial (0 dies), al final de l'oxidació química (OQ, temps dependent de l'oxidant) i al llarg del tractament de biodegradació (7, 14, 21 i 28 dies després de la finalització de l'oxidació química), per als diferents oxidants i controls (AB control abiòtic; BIO control biològic; MFR LC reacció de Fenton modificada baixa concentració; MFR HC reacció de Fenton modificada alta concentració; PM permanganat). Les lletres indiquen les diferències significatives entre tractaments ( $p < 0.05$ ). Les barres representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents

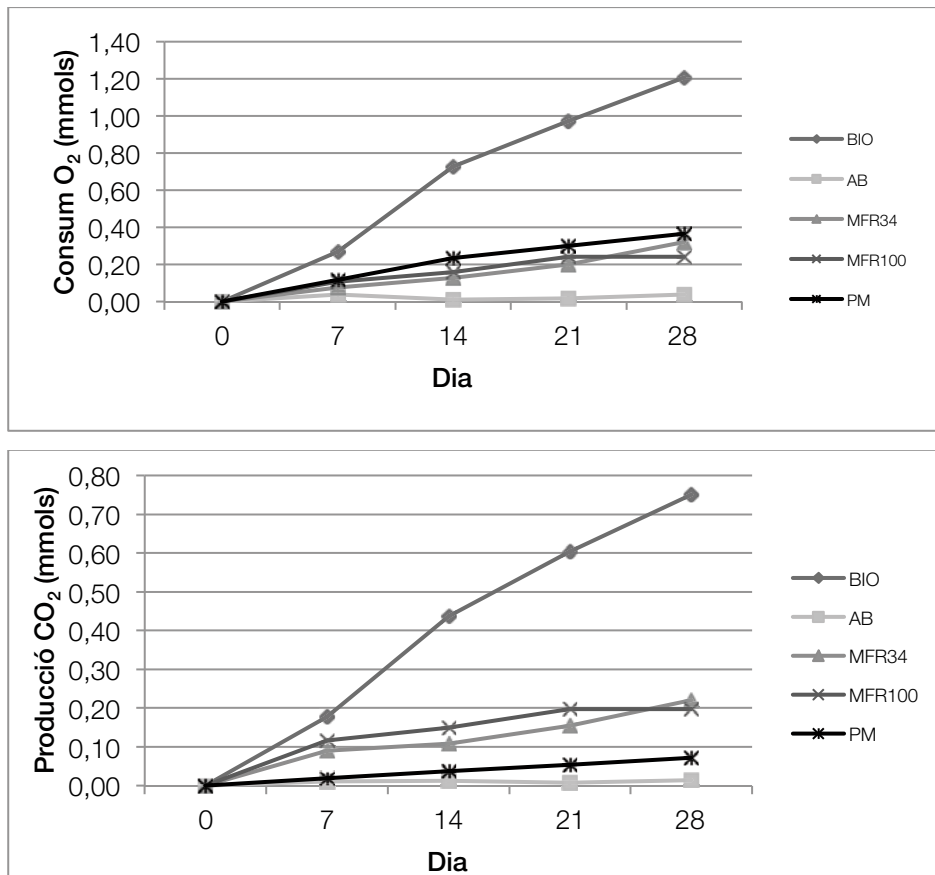


**Figura 7.3.** Biodisponibilitat dels LABs segons cada tractament (control abiòtic -AB-, control biològic -BIO-, MFR a baixa concentració -MFR LC-, MFR a alta concentració -MFR HC- i permanganat -PM-). Les tres barres que es representen per cada tractament representen: I) a l'inici, II) després de l'oxidació química i III) al final de la biodegradació. La fracció biodisponible (BAV) és clara, i la no biodisponible (N BAV) fosca. Les lletres indiquen les diferències significatives entre tractaments ( $p < 0.05$ ). Les barres representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents.

### 7.3. Recuperació de l'activitat metabòlica de les poblacions microbianes després del procés d'oxidació química

#### 7.3.1. Respirometria

L'activitat respiromètrica indicadora de l'activitat catabòlica s'ha mesurat quantificant el  $\text{CO}_2$  produït i l' $\text{O}_2$  consumit dins el microcosmos (apartat 3.1.4) durant la bioestimulació posterior als tractaments d'oxidació química (figura 7.4.).



**Figura 7.4.** Consum d'oxigen (A) i producció de diòxid de carboni (B) durant el procés de bioestimulació posterior a l'oxidació química en els diversos tractaments.

L'activitat respiromètrica màxima es troba en el control biològic, on s'ha arribat a 1,2 mmols de consum d'oxigen, juntament amb la producció de 0,7 mmols de diòxid de carboni. La producció global és de 0,04 mmols de  $\text{CO}_2$  per dia, tenint la producció màxima entre els dies 7 i 14, quan encara hi ha prou concentració de LABs disponibles per als microorganismes. En el control abiòtic les mesures són negligibles.

En els altres tractaments l'activitat respiromètrica és menor. Els tres tractaments tenen un efecte similar sobre els microorganismes. En tots, l'activitat respiromètrica és constant, i correspon a uns 0,01 mmols de  $\text{CO}_2$  produït/dia. En el cas dels tractaments de MFR es correspon a un consum d'oxigen de 0,07 mmols d' $\text{O}_2$ , i en el cas del permanganat, de 0,025 mmols d'oxigen. Els valors són coherents amb els resultats obtinguts en el procés de biodegradació, exceptuant el tractament MFR 100, que no presenta degradació, però sí activitat respiromètrica. En aquest cas, la producció de  $\text{CO}_2$  pot anar associada a la degradació de la matèria orgànica del sòl.

La respiració s'ha emprat de manera generalitzada per analitzar la resposta de les comunitats microbianes a la contaminació i per monitoritzar la biodegradació (Margesin, Zimmerbauer et al. 2000, Saviozzi, Cardelli et al. 2009).

En el camp de l'extrapolació de resultats a escala de laboratori a resultats a escala de camp (Diplock, Mardlin et al. 2009), s'ha determinat que les taxes mínimes de respiració per assegurar bioremediació al camp són de 0'1 mg CO<sub>2</sub>/g sòl/dia (2'27 mmols CO<sub>2</sub>/g sòl/dia). En aquest cas, la producció de CO<sub>2</sub> en el control biològic és d'entre 1'50 i 3 mg CO<sub>2</sub>/g sòl/dia, àmpliament per damunt del límit. En el cas del sòl tractat amb oxidants químics, les poblacions es recuperen de manera que al dia 28, les taxes de respiració es troben per damunt de 0'35 mg CO<sub>2</sub>/g sòl/dia en tots els casos.

En observar la ràtio mmols O<sub>2</sub> consumit/mmols CO<sub>2</sub> produït, s'ha observat que el permanganat presenta una producció molt menor de CO<sub>2</sub> per unitat d'oxigen consumida que les reaccions de MFR o el control biològic. Aquest fet podria indicar que, en el cas del permanganat, es consumeix O<sub>2</sub> primordialment per activitats que no tenen a veure amb la biodegradació de l'hidrocarbur.

No obstant, crear un balanç de masses entre consum d'oxigen, producció de CO<sub>2</sub> i degradació de LABs és complex. A més dels processos de degradació biològics, existeixen processos abiòtics que poden contribuir a l'alliberació de CO<sub>2</sub>, com l'alliberament de carbonats o l'oxidació de la matèria orgànica (Schinner, Ohlinger et al. 1995).

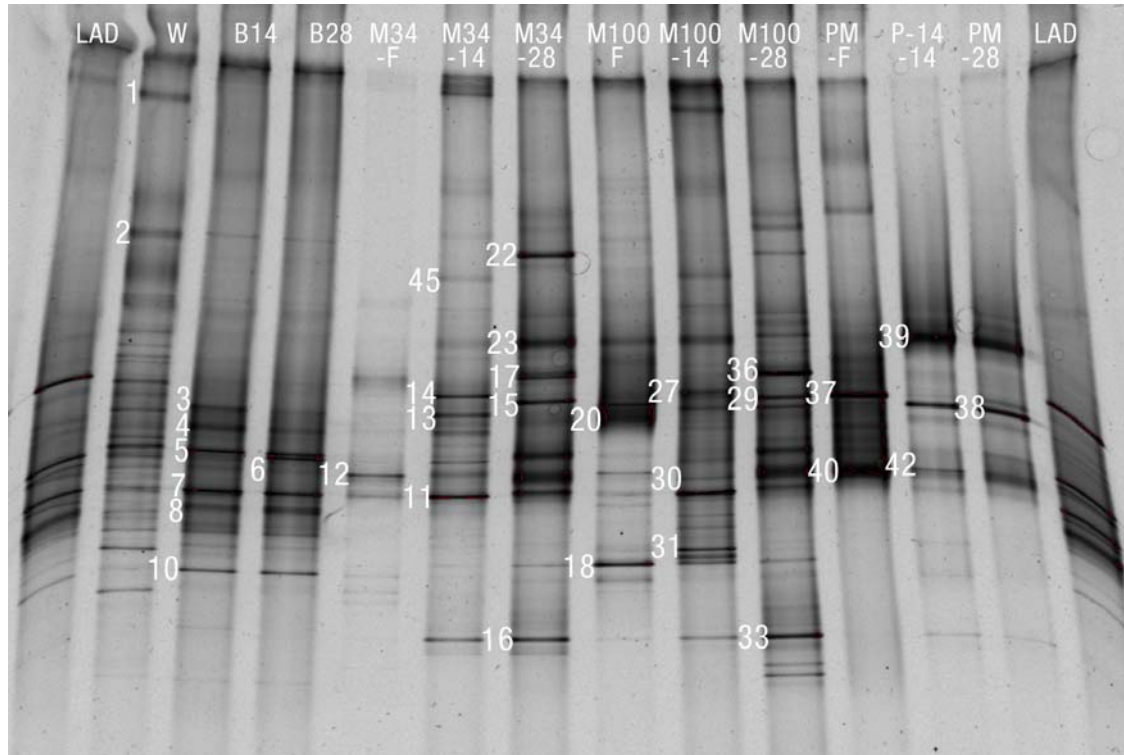
### **7.3.2. Anàlisi de les comunitats microbianes durant el procés de bioestimulació.**

Per analitzar les poblacions microbianes predominants, l'efecte dels oxidants sobre l'estructura microbiana i la recuperació de les poblacions durant la posterior bioestimulació, s'ha analitzat el 16S rRNA procedent de la mostra inicial, les diferents oxidacions i posteriors bioestimulacions, i el control biològic (figura 7.5., taula 7.2.).

Existeix poca informació sobre la recuperació de les poblacions microbianes després de l'oxidació química, una situació d'estrès. La informació existent es centra més en el rendiment de la biodegradació o comptatges cel·lulars (Nam, Kukor 2000, Kulik, Goi et al. 2006, Ndjou'ou, Bou-Nasr et al. 2006), i no en la variació de l'estructura i composició de la comunitat microbiana.

En aquest cas, el control biològic (mostres sense oxidar) proporciona una pauta per a l'anàlisi de la variació de la població microbiana. El perfil de bandeig que presenta les mostres B14 i B28 és el resultat de l'aplicació d'una pressió selectiva produïda per la presència de LABs sense l'afectació per part d'oxidants químics.

## Oxidació química acoblada a la bioremediació



**Figura 7.5.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les mostres d'aigua i sòl inicial (W), al final de l'oxidació química (M34-F, M100-F, PM-F) i als dies 14 i 28 del control biològic (B), de la MRF MFR a 34 g/L (M34), i a 100 g/L (M100) i del permanganat (PM)

**Taula 7.2.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades

Ban- da	Detecció											Lon g (bp)	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% sim <sup>a</sup>	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>	
	W	B14	B28	M34 F	M34 14	M34 28	M100 F	M100 14	M100 28	PM F	PM 14						PM 28
N4	X	X	X	X	X								494	<i>Caulobacter</i> sp. 1005 (JX566545)	98%	α-proteobacteria	Caulobacteraceae
N5	X	X	X			X							521	Uncultured gamma proteobacterium (EF648107)	95%	γ-proteobacteria	Chromatiales[39%] Ectothiorhodospirac eae[12%]
N11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				517	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium (AM268343)	99%	β-proteobacteria	Rhodocyclaceae
N12	X	X	X	X	X	X							522	<i>Achromobacter</i> sp. R-41395 (FR682938)	99%	β-proteobacteria	Alcaligenaceae
N13	X	X	X		X	X							515	<i>Acidovorax</i> sp. TPEB03 (JX390645)	99%	β-proteobacteria	Comamonadaceae
N15						X	X	X	X				525	<i>Achromobacter</i> sp. SPE2-6 (AY898614)	99%	β-proteobacteria	Alcaligenaceae
N23				X	X	X	X	X	X				445	<i>Caulobacter</i> sp. BSL1 (HQ113383)	99%	α-proteobacteria	Caulobacteraceae
N27	X							X					414	<i>Rhizobium</i> sp. (HQ694754)	93%	α-proteobacteria	Rhizobiales[72%] Brucellaceae[33%]

Oxidació química acoblada a la bioremediació

N31	X	X	X			X	X		521	Uncultured <i>Methyloversatilis</i> sp.	100%	β-proteobacteria	Rhodocyclaceae
N33				X	X	X	X	X	X	521	100%	Actinobacteria	Nocardiaceae
N36	X			X			X			497	99%	β-proteobacteria	Burkholderiaceae
N37 =N18					X		X	X	X	483	97%	α-proteobacteria	Brucellaceae
N39	X			X	X	X	X	X	X	434	99%	γ-proteobacteria	Moraxellaceae
N42				X	X	X	X	X	X	491	95%	β-proteobacteria	Alcaligenaceae

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Wang et al. 2009). α, β i γ representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament.

Les seqüències determinades en aquest estudi s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC887357 a KC887370.

És destacable la gran diversitat de bandes en la mostra inicial, i la gran variació que presenten les mostres oxidades, tant al final de l'oxidació química com en la seva evolució al llarg del temps (taula 7.3.).

**Taula 7.3.** Índex de diversitat de Shannon-Wiener (H') de la diversitat bacteriana estimada, al llarg dels diversos tractaments. El punt 0 del tractament biològic és també el punt inicial abans dels tractaments d'oxidació.

	H' BIO	H' MFR 34	H' MFR 100	H' PM
0 dies	2,96	1,64	2,09	1,89
14 dies	2,38	2,19	2,43	1,27
28 dies	2,34	2,47	2,62	1,68

Es pot observar que després de l'aplicació dels oxidants químics, la biodiversitat dels microcosmos ha disminuït, probablement deguda a l'eliminació o davallada poblacional de microorganismes poc resistents als oxidants emprats.

En el cas del control biològic, com també s'ha vist en capítols anteriors, al llarg de la bioremediació baixa el valor de H'.

Pel que fa a la recuperació de diversitat dels microcosmos tractats amb oxidants, en els que han estat tractats amb MFR es pot observar una certa recuperació, mentre que els tractats amb permanganat es queden fins i tot per sota la H' del final del tractament, degut a la major predominança d'uns pocs gèneres.

Els principals filotips (bandes de DGGE) detectats s'engloben en els grups microbians de les  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  proteobacteria i Actinobacteria. En el grup de  $\alpha$ -proteobacteria, s'han identificat membres de les famílies *Caulobacteraceae* i *Brucellaceae*; en el grup de les  $\beta$ -proteobacteria, *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Rhodocyclaceae* i *Comamonadaceae*; en el grup de les  $\gamma$ -proteobacteria, *Moraxellaceae* i *Chromatiales*; a més de membres del grup *Actinobacteria*.

En la mostra inicial s'ha detectat la presència predominant dels gèneres *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Methyloversatilis* i *Caulobacter*. Cal destacar que l'estructura de la població predominant difereix força de la detectada als capítols 4,5 i 6, probablement a causa de la diferent matriu experimental (aigua subterrània en els primers capítols i sòl colonitzat amb aigua subterrània en aquest) Només s'ha detectat un filotip coincident, proper al gènere *Acidovorax* (banda N13 de la taula 7.5 i banda B6 de la taula 5.2 –capítol 5-) Aquests resultats mostren la importància de la matriu en l'establiment de la comunitat microbiana.

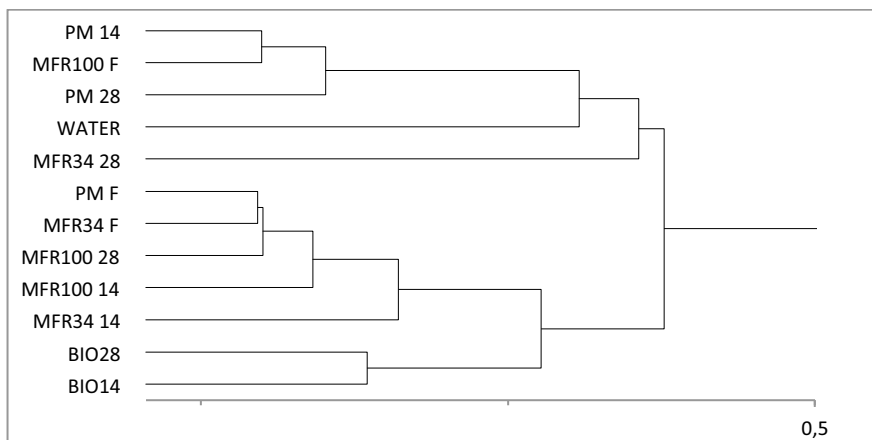
Pel que fa a l'afectació de la població microbiana inicial sembla que després de l'acció de l'oxidant MFR es manté la mateixa població especialment amb la dosis de 34 g/l mentre que l'acció de l'oxidant PM causaria una eliminació de la població inicial. No obstant, l'aparició en el sòl de filotips predominants amb seqüències properes a gèneres bacterians com *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter* i *Cupriavidus*, coneguts per la seva potencial activitat degradadora d'hidrocarburs,

suggereix que podrien ser els responsables de la important biodegradació observada amb posterioritat a l'aplicació de permanganat (PM) en el sòl.

La falta de resolució pròpia de la tècnica del DGGE (comentada anteriorment) ha dificultat la identificació de bona part de les bandes detectades en menor intensitat relativa. Aquestes bandes s'han assignat usant els patrons de migració.

L'anàlisi clúster basat en el coeficient de Pearson (figura 7.6.) ha revelat resultats no del tot concloents a causa de l'elevada quantitat de bandes difoses trobades en el gel de DGGE. No obstant si que es pot observar per una banda la similitud del perfils del sol no tractat per oxidació química després de 14 i 28 dies d'incubació, molt diferents als punts finals de bioestimulació després d'un tractament d'oxidació química. Això posa de manifest l'efecte dels tractaments d'oxidació química sobre la composició i estructura de les comunitats microbianes, explicant la menor degradació obtinguda després de l'aplicació dels oxidants.

Es pot observar que el tractament de permanganat i MFR a baixa concentració (els dos tractaments que han permès una posterior biodegradació) es troben englobats en el mateix grup de similitud. En aquests tractaments s'ha detectat els filotips amb seqüència propera a *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter* i *Cupriavidus*. Es podria afirmar que aquests filotips són resistents a l'acció d'oxidant químics ( $KMnO_4$  i MFR a baixa concentració), i podrien jugar un paper important en la biodegradació dels LABs post oxidació química. Aquests filotips també podrien ser en part responsables de la biodegradació de LABs en l'aigua subterrània (W) sense l'adició d'oxidants forts, sense ser tant predominants ja que no s'han detectat en el sòl sense la presència d'oxidació química prèvia.



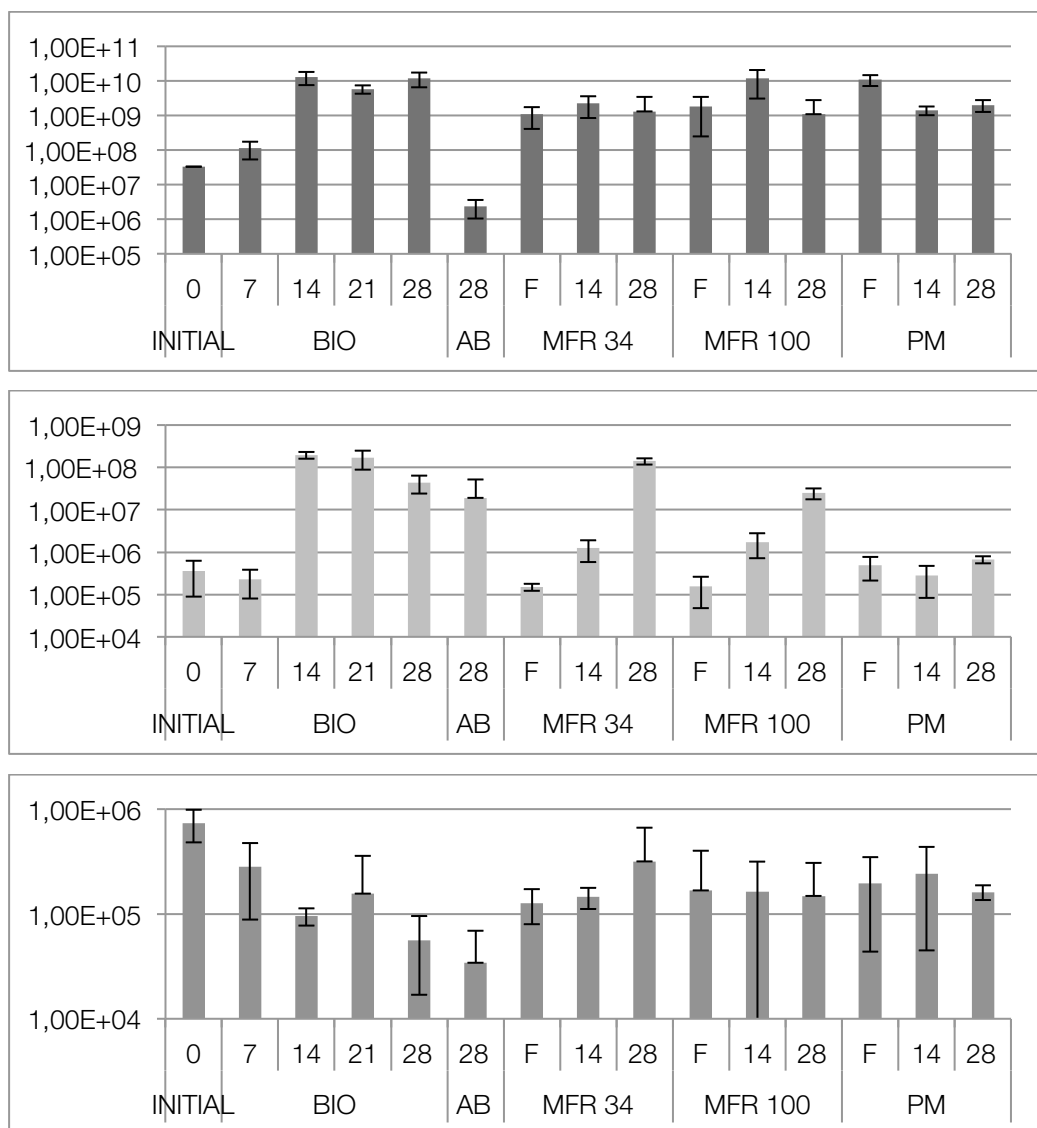
**Figura 7.6.** Anàlisi clúster a partir dels coeficients de similitud de Pearson

### 7.3.3. Evolució quantitativa de les poblacions microbianes i gens funcionals

Per tal de poder relacionar la degradació observada amb la capacitat degradadora de la microbiota durant l'etapa de la bioremediació, i estimar l'efecte dels oxidants químics sobre la població microbiana total i degradadora s'ha dut a terme la quantificació per qPCR del gen 16SrRNA i de gens funcionals lligats a



activitat enzimàtiques relacionades amb la degradació d'hidrocarburs (gens *alkB*, *tod* i *bssA*) (figura 7.7.).



**Figura 7.7.** Quantificació dels gens 16S rRNA (A), *alkB* (B) i *bssA* (C) al llarg dels diversos tractaments d'oxidació química i controls. Els valors són la mitjana de reaccions de qPCR triplicades amb les desviacions estàndard.

La PCR quantitativa no mostra diferències o canvis en les poblacions microbianes, a pesar de la clara afectació d'aquestes durant el tractament d'oxidació química. Es podria doncs deduir que, tot i que l'activitat fisiològica de les poblacions sí que s'ha vist afectada, l'oxidació no ha afectat al DNA poblacional.

És destacable el ràpid increment del gen *alkB* en el control biològic, fins a ràtios de 10<sup>-2</sup> i 10<sup>-3</sup> còpies de *alkB*/còpies 16S rRNA en tan sols set dies, en contraposició als tractaments. En el cas de la MFR, les poblacions comencen a

augmentar l'*alkB* paulatinament, mentre que en el cas del PM no s'aprecia cap increment destacable, mantenint la ràtio en valors de  $10^{-4}$  còpies de *alkB*/còpies 16S rRNA (taula 7.4.).

És també interessant la relació del gen *alkB*, en el control biològic amb la presència de contaminant. En aquest cas la població de gens *alkB* augmenta en presència dels LABs els primers 14 dies, disminuint en el període entre 14 i 28 dies probablement degut a limitacions en el substrat. Aquest fenomen ha estat observat amb anterioritat per altres autors en sòls contaminats amb olis minerals (Sutton, Gaans et al. 2012), indicant la validesa del gen *alkB* per a ser utilitzat com una eina de diagnosi ambiental, indicant el potencial de biodegradació d'alcans de les poblacions autòctones en emplaçaments contaminats per TPH i alquilbenzens.

**Taula 7.4.** Ràtios *alkB*/16S rRNA i *bssA*/16S rRNA.

Tractament		<i>alkB</i> /16S rRNA	<i>bssA</i> /16S rRNA
Inicial	0	$1,09 \cdot 10^{-2}$	$2,26 \cdot 10^{-2}$
Control biològic	7	$2,04 \cdot 10^{-3}$	$2,49 \cdot 10^{-3}$
	14	$1,51 \cdot 10^{-2}$	$7,29 \cdot 10^{-6}$
	21	$2,92 \cdot 10^{-2}$	$2,67 \cdot 10^{-5}$
	28	$3,68 \cdot 10^{-3}$	$4,71 \cdot 10^{-6}$
Control abiòtic	28	$8,25 \cdot 10^{-1}$	$1,47 \cdot 10^{-2}$
MFR 34	F	$1,39 \cdot 10^{-4}$	$1,16 \cdot 10^{-4}$
	14	$5,60 \cdot 10^{-4}$	$6,47 \cdot 10^{-5}$
	28	$1,07 \cdot 10^{-1}$	$2,41 \cdot 10^{-4}$
MFR 100	F	$8,26 \cdot 10^{-5}$	$9,00 \cdot 10^{-5}$
	14	$1,49 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^{-5}$
	28	$2,29 \cdot 10^{-2}$	$1,37 \cdot 10^{-4}$
PM	F	$4,50 \cdot 10^{-5}$	$1,80 \cdot 10^{-5}$
	14	$1,95 \cdot 10^{-4}$	$1,68 \cdot 10^{-4}$
	28	$3,31 \cdot 10^{-4}$	$7,96 \cdot 10^{-5}$

D'altra banda, l'anàlisi del gen *bssA*, permet inferir la presència de capacitat degradadora d'anells benzènics en condicions d'anaerobiosi. Aquest gen dona informació sobre el manteniment o la pèrdua de la capacitat de degradar en condicions desnitrificants (veure capítol 6). En general, el gen *bssA* no ha presentat grans canvis en la seva presència durant els tractaments. Trobant-se en uns valors d'entre  $10^4$  i  $10^6$  còpies de *alkB*/ml mostra.

Tot i això, sí que s'observen increments en la presència tant de 16S rRNA com de gens funcionals, sobretot *alkB* en els tractaments MFR, on es pot apreciar un increment de les ràtios *alkB*/16S rRNA de tres ordres de magnitud (figura 7.11.). En el tractament de permanganat potàssic no s'ha observat aquest comportament, i les ràtios entre gens funcionals i 16S rRNA s'han mantingut més o menys estables. Aquest fet indica una major afectació de les poblacions microbianes, que impedeix la seva recuperació amb la mateixa velocitat que els tractaments amb MFR.

Els resultats doncs indiquen que en el cas del MFR de baixa concentració s'ha detectat una clara recuperació de poblacions microbianes amb activitat potencialment degradadora d'alcans, mentre que en l'assaig amb permanganat les poblacions es mantenen sense incrementar-se, el que podria indicar una major afectació de les poblacions, a més de la possibilitat de traces romanents de l'oxidant. Això confirma les hipòtesis plantejades durant l'anàlisi de l'activitat respiratòria dels batch.

Si bé no es pot negligir l'efecte de l'oxidant sobre la microbiota, treballs recents indiquen que les poblacions microbianes tenen la capacitat de regenerar-se (Kao, Wu 2000, Aunola, Goi et al. 2006, Ndjou'ou, Bou-Nasr et al. 2006), fins i tot millorant-les de cara a la bioremediació, ja sigui augmentant les poblacions globalment (Allen, Reardon 2000) o augmentant la proporció de població amb capacitats degradadores (Miller, Valentine et al. 1996).

En aquest estudi, les poblacions microbianes tractades amb MFR mostren signes de regeneració al cap de 28 dies (respirometria, increment de còpies gèniques 16S rRNA i gen *alkB*). Les mostres tractades amb permanganat però, no es veuen particularment enriquides en gens que codifiquen per la degradació. No obstant, les poblacions microbianes tenen potencial per assolir nivells de degradació similars als controls biològics, però el temps emprat en el present estudi no ha estat suficient, necessitant períodes mes llargs d'incubació.

També caldria confirmar fins a quin punt les possibles traces de permanganat romanen actives a llarg termini provocant la inactivació metabòlica de les poblacions microbianes existents.

Tot i que l'estructura de la població es modifiqui, trobant-se diversos patrons de bandeig en els gels de DGGE, s'ha de considerar que comunitats microbianes amb composicions diferents o variables poden dur a terme les mateixes activitats (Singh, Ward 2004). Per tant, si s'observa regeneració microbiana i presència de gens funcionals, poden estar produint-se els mateixos processos encara que els microorganismes que formen la comunitat microbiana siguin diferents o es trobin en diferents concentracions. Així doncs, per facilitar la presa de decisions a l'hora d'aplicar la remediació a escala de camp és més efectiu assignar funcionalitat a les poblacions microbianes a partir de la quantificació de gens funcionals relacionats amb la biodegradació. Aquestes mesures donen una idea molt més acurada de les capacitats de les poblacions microbianes i, per tant, de l'efecte dels oxidants químics sobre la biodegradació posterior.

En diversos casos s'ha suggerit que l'oxidació química no només elimina part dels contaminants sinó que ajuda a la posterior biodegradació mitjançant una davallada de la concentració del contaminant fins a nivells menys tòxics (Chapelle, Bradley et al. 2005), millorant la biodisponibilitat del contaminant (Miller, Valentine et al. 1996, Lee, Hosomi 2001, Kulik, Goi et al. 2006) o proveint oxigen per a la creació de condicions aeròbies (Kulik, Goi et al. 2006). En aquest cas, no s'ha millorat la biodisponibilitat del contaminant amb l'aplicació d'oxidants químics. Tot i que la concentració de LABs si que ha disminuït amb l'oxidació química, l'acoblament de les dues tecnologies no representa una millora en la degradació del contaminant, sinó que es mostra menys efectiu que el tractament de biodegradació sol.

No obstant, tot i que la degradació del contaminant no ha resultat especialment efectiva en aquest cas, és destacable la compatibilitat entre ambdues tecnologies. L'oxidant químic aplicat ha afectat les poblacions microbianes, però aquestes presenten la capacitat de recuperar-se en un període de temps relativament curt. És necessari però avaluar l'efectivitat de la combinació de tractaments emprant material extret de l'aquífer (sòl i aigua subterrània). D'altra banda, per tal de determinar la conveniència de l'aplicació d'un tractament o combinació de tractaments in situ, és necessari conèixer el comportament dels oxidants químics en condicions similars a les del subsòl. Les condicions hidrodinàmiques i la relació entre sòl i aigua es poden replicar de manera molt més fidedigna en assajos realitzats en columnes de sòl.

### **Resultats destacats del capítol**

L'anàlisi química de les mostres ha posat de manifest que l'acoblament de les tecnologies d'oxidació química i biodegradació no aconsegueix millorar els resultats obtinguts amb la biodegradació sola. L'aplicació d'oxidants químics no fa incrementar la biodisponibilitat dels LABs.

Les poblacions microbianes es veuen afectades negativament per l'oxidant químic, que redueix la seva activitat respiromètrica i la diversitat poblacional, però no les poblacions totals. La comunitat microbiana es capaç de recuperar-se d'un tractament d'oxidació química emprant la reacció de Fenton modificada.

El procés d'oxidació química provoca un canvi dràstic de la comunitat microbiana, disminuint la diversitat i condicionant la diversitat en situacions de recuperació de la comunitat microbiana. Filotips amb seqüència similar als gèneres *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter* i *Cupriavidus* es mostren resistents a processos d'oxidació química i podrien ser responsables dels posteriors processos de biodegradació de LABs un cop bioestimulats.

Els resultats d'aquest estudi mostren que és necessari testar els mètodes de manera rutinària abans de prendre decisions sobre l'ús de les tecnologies de remediació. La compatibilitat entre tecnologies permet la cerca de la combinació més adequada en cada cas.

# Capítol 8

Avaluació de l'efecte de l'aplicació de MFR en columnes de sòl: afectació de les poblacions microbianes



En el capítol anterior s'ha estudiat l'acoblament de les tecnologies d'oxidació química i biodegradació per a l'eliminació dels LABs en sòl i aigua en experiments tipus *batch*; posant especial atenció en l'efecte combinat de l'oxidant químic sobre la degradació de LABs i l'activitat metabòlica de la microbiota. En aquest capítol s'aborda la mateixa qüestió en columnes de sòl.

Les columnes de sòl són un sistema experimental que permet reproduir amb major similitud el comportament dels microorganismes i els compostos químics que es troben a la subsuperfície, sotmesos a unes condicions similars a les naturals.

Els experiments en columnes de sòl, tant saturades com no saturades, han estat àmpliament emprats en estudis teòrics i aplicats en camp (Lewis, Sjöstrom 2010). Diversos autors (Silva, Zagatto et al. 2005, Palmroth, Langwaldt et al. 2006, Palmroth, Langwaldt et al. 2006) han descrit experiències positives en el camp de l'oxidació química aplicada a columnes de sòl, emprant en tots els casos la reacció de Fenton.

La construcció de columnes implica afrontar diversos problemes tècnics, com la presència o absència de macro porus, la producció de canals preferencials o humitats poc realistes. Tenint en compte els avantatges i desavantatges de les diverses aproximacions, s'ha optat per construir una columna empaquetada saturada, observant les bones pràctiques descrites per (Lewis, Sjöstrom 2010).

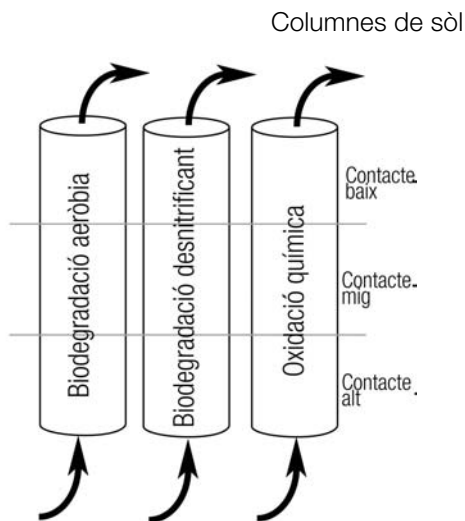
## **Objectius**

En el present capítol s'avalua l'efectivitat de l'oxidació química i el seu efecte sobre les poblacions microbianes en columnes de sòl. Primerament s'ha estudiat la colonització inicial de la matriu mineral del sòl per part de la microbiota de l'aqüífer (aigua subterrània), i a continuació s'han assajat condicions aeròbies, desnitrificants i d'oxidació química en les columnes, avaluant el procés de degradació de LABs i els seus efectes sobre la microbiota.

## **8. Muntatge columnes**

Les condicions *in situ* s'han intentat reproduir a la columna. La velocitat real del flux al camp és de 0,3 m/dia, amb una porositat estimada de 0,2. Per tant, la velocitat de Darcy seria d'uns 0,06 m/dia.

A l'hora de dissenyar les columnes, s'ha marcat com a objectiu un temps de residència (HRT) de 6 hores. Els paràmetres de disseny de les columnes es poden veure a la taula 8.1. Per tal d'assegurar la homogeneïtat de les columnes s'ha fet un assaig de traçador. Els resultats mostren que les columnes tenen un empaquetat força homogeni. Els temps de residència s'han determinat com a 162, 336 i 588 min, per a les columnes que properament correspondran als tractaments BA, OQ i BD respectivament.



**Figura 8.1.** Esquema del muntatge de les tres columnes de sòl. Columnes operant en *up-flow*.

**Taula 8.1.** Paràmetres de disseny de les columnes de sòl.

Paràmetres de disseny per a les columnes		
Diàmetre intern	40	mm
Longitud	250	mm
Punts de mostreig	4	punts
Punts d'injecció (inferior)	1	punts
Alçada punts injecció	50, 100, 150, 200	mm
Volum de la columna	0,31	L
Porositat del rebliment (estimada)	0,15	
Volum d'aigua (amb rebliment)	0,05	L
	47,12	MI
Temps residència	0,25	Dies
Cabal d'aigua (entrada)	0,1885	l/dia
	0,1309	ml/min
Velocitat de l'aigua (flux vertical)	100	cm/dia

Com a conseqüència de la diferència de temps de residència entre l'aquífer i les columnes, es produeixen diferències entre l'experiment al laboratori i el sòl in situ que s'han de tenir en compte.

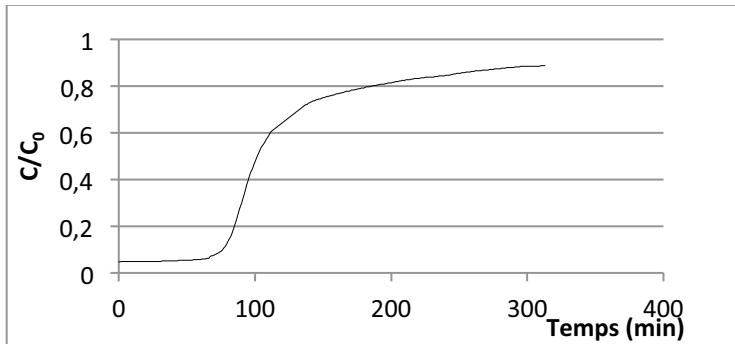
En primer lloc el temps de contacte entre contaminant i oxidant s'ha fet més llarg, per tant, teòricament es produirien degradacions de LABs més elevades a les columnes. A més, en el cas de les columnes el muntatge experimental s'ha mantingut a 20°C i amb condicions òptimes de nutrients, cosa que té un efecte positiu sobre la degradació. Els aquífers de Catalunya oscil·len entre els 12 i els 18°C de temperatura.

El temps de contacte entre l'oxidant i les poblacions microbianes és també més alt en l'experiment en columna, fet que hauria d'incloure a una major afectació i dany

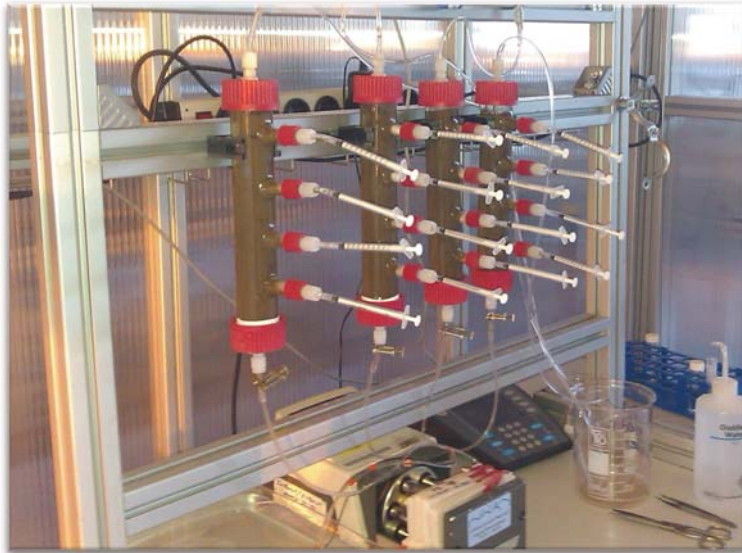


cel·lular en el sistema en columna. D'altra banda, el cabal d'aigua subterrània és menor a la columna, així que es produeix una menor repoblació microbiana.

No obstant, es pot considerar que el temps de residència es troba dins el mateix ordre de magnitud en les columnes de sòl que *in-situ*. Per tant, els resultats seran possibles de reproduir al camp sense grans diferències.



**Figura 8.2.** Corba experimental obtinguda durant el test de traçador de la columna empaquetada per a realitzar el tractament BA (162 min de temps de residència)



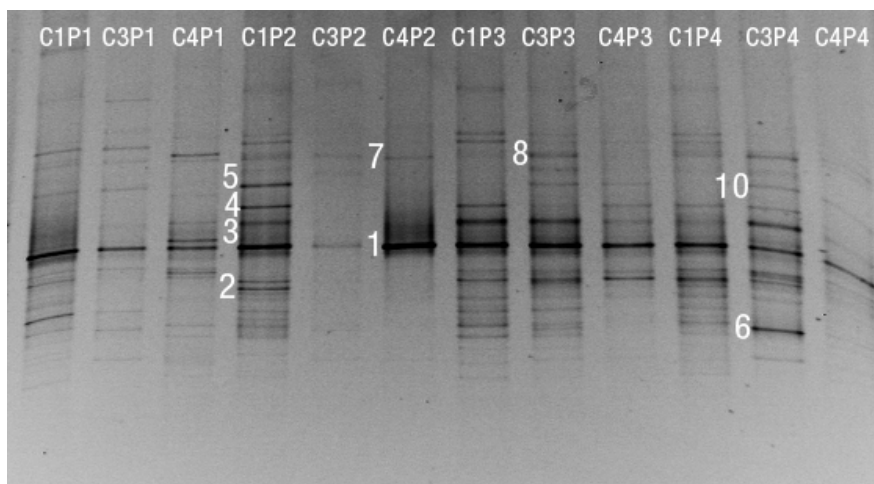
**Figura 8.3.** Detall del muntatge realitzat (columnes de sòl)

## 8.2. Colonització de les columnes de sòl per part de la microbiota de les aigües subterrànies

Donat que el sòl emprat procedeix dels testimonis de la perforació per col·locar els piezòmetres, i s'ha dopat emprant LABs dissolts en acetona i hexà (apartat 3.1.7.), s'ha considerat que era necessària una colonització del sòl. La colonització de les columnes s'ha dut a terme durant dues setmanes, amb aigua subterrània airejada per maximitzar les condicions aeròbies. Quatre columnes (corresponents al que posteriorment seran BA, BD, OQ i un control de concentració de LABs inicial per tal de quantificar pèrdues per rentat) s'han irrigat amb aigua procedent de l'aquífer per colonitzar el sòl. S'ha pres mostra els dies 8 i 14 de la colonització, i s'han analitzat els canvis poblacionals qualitius (mitjançant DGGE) i quantitius (mitjançant quantificació de la població total i de poblacions especialitzades mitjançant gens funcionals (*bssA*, *alkB* i *tod* per qPCR). Durant la colonització, no hi ha hagut pèrdues per rentat de les columnes.

### 8.2.1. Estudi de l'evolució de la comunitat microbiana durant el procés de colonització de les columnes de sòl

S'ha analitzat l'estructura de la comunitat microbiana durant la colonització del sòl a les columnes mitjançant DGGE d'amplicons de la regió hipervariable V3-V5 del gen 16SrRNA d'eubacteris.. A la figura 8.4. es pot veure els perfils de DGGE obtinguts en els diferents punts de mostreig situats al llarg de cadascuna de les columnes de sòl en finalitzar la colonització (dia 14). A les figures 8.15, 8.16 i 8.17 (material complementari) es pot veure els perfils de bandeig dels diversos punts de mostreig de cadascuna de les columnes, als dies 8 i 14 de la colonització.



**Figura 8.4.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les mostres de colonització de les columnes BA, BD i OQ als diversos punts de mostreig (P1 a P4) al final de la colonització (dia 14).

**Taula 8.2.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades al final del procés de colonització de les columnnes de sòl

Ba n- da	Detecció												Long (pb)	Organisme més proper (accession no.)	% sim <sup>a</sup>	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>
	P1C1	P1C3	P1C4	P2C1	P2C3	P2C4	P3C1	P3C3	P3C4	P4C1	P4C3	P4C4					
B1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	516	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
B2				X			X	X	X	X			522	<i>Hydrogenophaga defluvii</i> (AB638427)	98%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
B5				X			X		X	X	X		495	<i>Sphingomonas</i> sp. HTCC399 (AY429693)	97%	α-proteobacteria	Sphingomonadaceae
B6	X	X	X	X				X	X		X	X	519	<i>Aquabacterium citratiophilum</i> (NR_024871)	99%	β -proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis
B7	X	X								X	X	X	489	<i>Acidovorax</i> sp. S7 (GU372409)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009). α, β i γ representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament.

Les seqüències obtingudes s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC887371 a KC88737.

En la figura 8.4, en els perfils dels gens 16S rRNA de les mostres s'han escindit 10 bandes, tenint en compte criteris d'intensitat, repetibilitat i representativitat. La identitat filogenètica de les bandes que no s'ha pogut obtenir directament s'ha assignat basant-se en el patró de migració de bandes d'altres punts del mateix tractament. Els amplicons seqüenciats han estat en tots els casos de més de 450 parells de bases (taula 8.2), i han comprès tres regions hipervariables del gen 16s rRNA.

La colonització provoca perfils de bandeig de DGGE molt similars quan comparem un mateix punt en les diferents columnes, però diferent al comparar diferents punts en una mateixa columna. Per tant la colonització ha estat repetitiva en les diferents columnes però no homogènia pel que fa als trams dins d'una mateixa columna. L'estructura poblacional observada a la colonització no és la mateixa que l'observada a l'aigua subterrània (capítol 7, figura 7.6.). A partir dels 14 dies ja s'ha pogut iniciar els tractaments en les diferents columnes assumint una colonització homogènia entre columnes. Per tant, els resultats referents a l'afectació de les poblacions microbianes diversos tractaments seran comparables.

Entre els microorganismes identificats, cal destacar la presència de *Acidovorax*. Tot i que aquest microorganisme no va ser detectat com a majoritari en l'aigua subterrània (capítol 4), sí que es mostra predominant al llarg de la colonització, en tots els punts de la columna. Aquesta diferència d'importància es deu a la diferència de condicions entre els *batch* i les columnes. *Acidovorax*, es troba present en totes les columnes i punts de mostreig. Aquest microorganisme és un membre del grup  $\beta$ -proteobacteria de la família *Comamonadaceae*, descrit com a degradador d'hidrocarburs aromàtics (Singleton, Richardson et al. 2011). *Acidovorax* és un gènere aerobi facultatiu, capaç de créixer en condicions desnitrificants (Shen, Zhou et al. 2013).

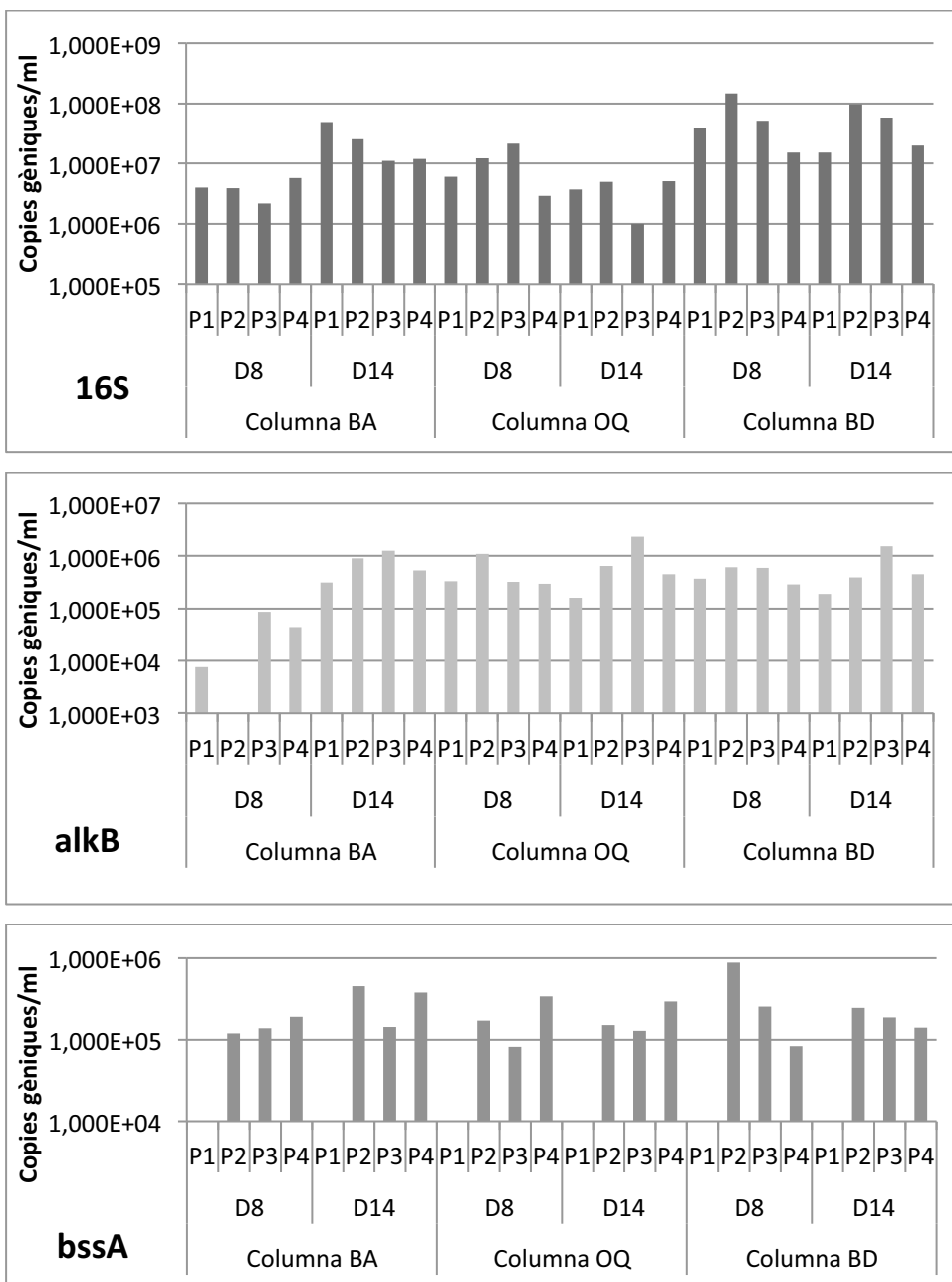
S'ha detectat amb certa freqüència el gènere *Aquabacterium*, microorganisme amb una gran capacitat de créixer en biofilms i amb un metabolisme facultatiu usant l'oxigen o el nitrat com acceptors finals d'electrons (Kalmbach, Manz et al. 1999), descrit també com a degradador d'hidrocarburs (Mikkonen, Lappi et al. 2011, Aburto-Medina, Adetutu et al. 2012).

*Hydrogenophaga*, també pertanyent al mateix phylum i família que *Acidovorax* ha estat descrita com a degradadora de diversos productes amb anells benzènics, com el bifenil (Lambo, Patel 2006) i l'aminobenzè sulfonat (Gan, Shahir et al. 2011).

*Sphingomonas* es un gènere del phylum  $\alpha$ -proteobacteria, associat a degradadors de petroli i derivats (Van Hamme, Singh et al. 2003) a més d'estar associat a la degradació dels HAPs (Sabate, Vinas et al. 2003, Vinas, Sabate et al. 2005). És interessant destacar que *Sphingomonas* s'ha detectat principalment en el tram P4 de les columnes, corresponent a la part superior de la columna.

Per tal d'avaluar la colonització de les columnes de sòl de manera quantitativa, s'ha quantificat mitjançant qPCR les còpies gèniques de 16S rRNA i de gens funcionals relacionats amb la degradació d'hidrocarburs, com *alkB* i *bssA* (figura 8.5). La colonització es va dur a terme emprant aigua procedent de l'emplaçament, però sense nutrients. Per tant, és probable que no s'observi creixement microbià en aquesta etapa.

Columnes de sòl



**Figura 8.5.** Quantificació dels gens 16S rRNA (A), *alkB* (B) i *bssA* (C) al llarg de la colonització en les diferents columnes.

Les còpies de 16S oscil·len entre 10<sup>6</sup> còpies gèniques/ml i 10<sup>8</sup> còpies gèniques/ml en totes les columnes, amb variacions que podrien atribuir-se a la desviació estàndard. Les mostres es van prendre amb una xeringa recollint tant aigua com sòl de la columna.

Les còpies de *alkB* es detecten en gairebé tots els punts amb valors entre 10<sup>5</sup> còpies gèniques/ml i 10<sup>6</sup> còpies gèniques/ml, corresponents a un 0'1-1% de les còpies de 16S rRNA. Tret de la colonització del dia 8 a la columna A, els valors són força

homogenis, mostrant que aquest gen és freqüent entre la població microbiana considerada, i que per tant, aquesta població és potencialment capaç de degradar les cadenes alquílques que formen els LABs.

El gen *bssA* apareix, tant el dia 8 com el dia 14 en es punts P2, P3, i P4 de totes les columnes, en concentracions relativament elevades (aproximadament  $10^5$  còpies gèniques/ml). El fet que el gen no aparegui al P1, punt més proper a la injecció d'aigua subterrània, i sí als altres podria indicar la creació de condicions microanaeròbies dins la columna, o bé a la proliferació de microorganismes facultatius amb aquesta capacitat aprofitant fonts de carboni i nitrogen presents a la matriu mineral. Els resultats obtinguts al capítol 6 no mostraven aquesta ubiqüitat, degut a les característiques pròpies de la incubació realitzada (major aireació i manca de disponibilitat de nitrogen i fòsfor presents a la matriu mineral).

### 8.3. Efecte de la Reacció de Fenton Modificada en l'activitat microbiana i l'eliminació de LABs en columnes de sòl contaminat

#### 8.3.1. Degradació de LABs en columna de sòl i durant la incubació posterior en els diferents tractaments

La concentració inicial de LABs al sòl s'ha quantificat en  $6035 \text{ mg/kg} \pm 147 \text{ mg/kg}$ . S'ha avaluat la degradació dels LABs en cadascuna de les columnes. Després de l'aturada i seccionament de les columnes (figura 8.6.), s'ha avaluat també la capacitat biodegradadora en incubacions de tipus *batch* de cadascun dels trams considerat (figura 8.7.).

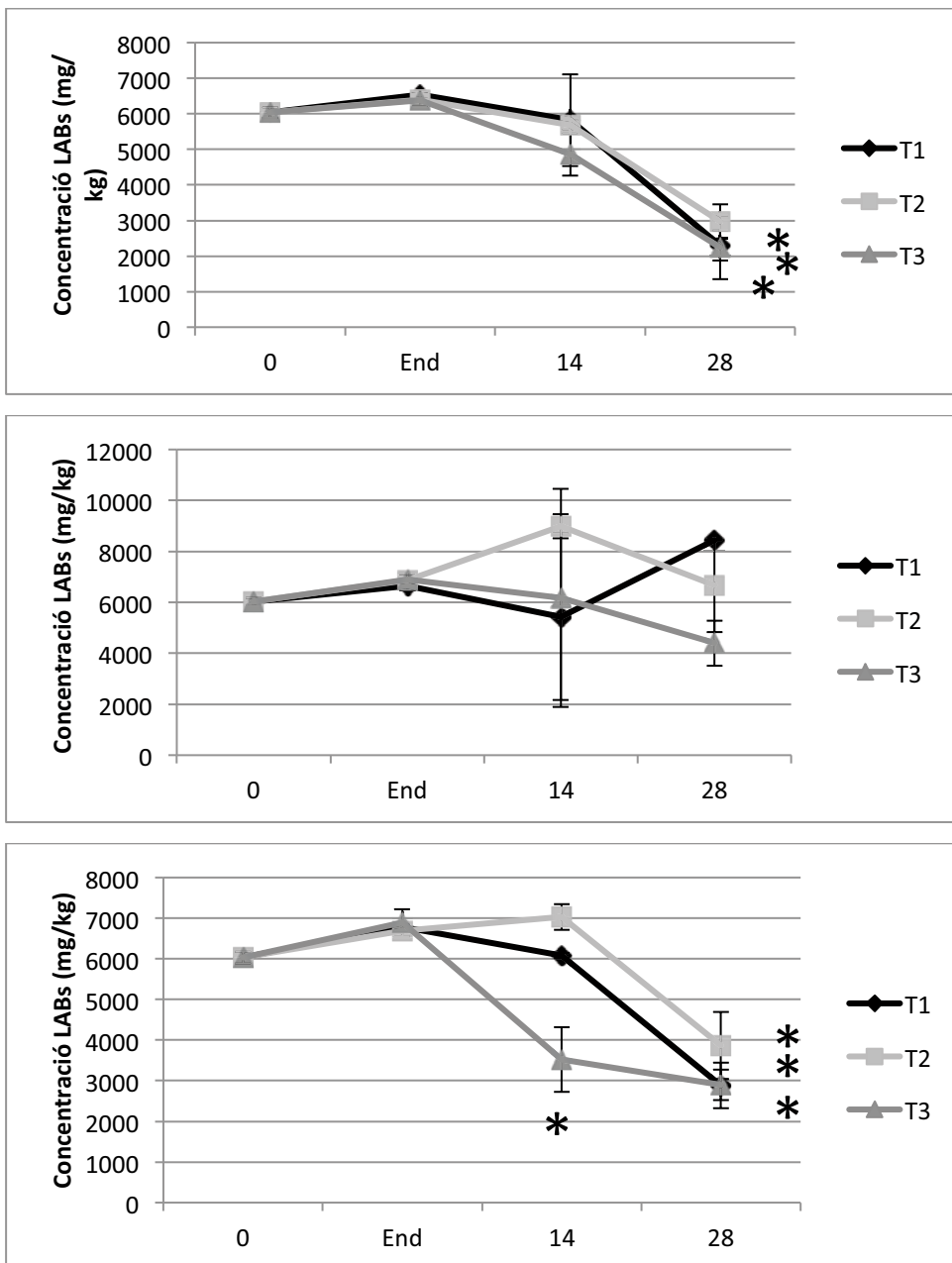
Els experiments en columna presenten condicions més similars al subsòl, al contrari que els experiments de tipus *batch*, que estan orientats a l'obtenció de resultats considerant condicions òptimes, amb proporcions sòlid- líquid ideals, afavorint l'oxigenació i amb agitació.

La degradació en columna no s'ha produït en cap dels tractaments (aerobi, desnitrificant i oxidació química mitjançant MFR). Tot i que en experiments anteriors (capítol 5) s'ha observat degradació *in vitro* en condicions aeròbies i períodes similars de temps d'incubació, aquests resultats s'havien obtingut en experiments de tipus *batch*, i per tant en condicions no extrapolables als experiments en columna.



**Figura 8.6.** Detall de la partició de la columna post incubació en tres trams.

Columnes de sòl



**Figura 8.7.** Degradació dels LABs en els tractaments aerobi (A), desnitrificant (B) i oxidació química (C) durant el temps de degradació en columna i en la incubació posterior en *batch*, en els trams alt (T1), mig (T2) i baix (T3) de les columnes. Les barres representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents. L'asterisc indica diferències significatives amb la concentració inicial.

El fet que l'oxidació química no hagi funcionat en les columnes, a diferència dels diversos exemples trobats a la literatura podria estar relacionat amb el sentit de circulació de l'aigua dins les columnes. A diferència d'altres estudis (Silva, Zagatto et al. 2005, Palmroth, Langwaldt et al. 2006) on la circulació es va fer de tipus *downflow*, en el present estudi la circulació s'ha fet de tipus *upflow*. Donat que l'anàlisi de

traçador presentava una cinètica correcta, es va considerar que no es produïa retenció dels productes injectats a la columna. No obstant, els resultats de degradació suggereixen que el reactiu de Fenton ha quedat retingut en el tram inferior (T3) de la columna de sòl, sense reaccionar amb els hidrocarburs o la matèria orgànica, fins al muntatge dels sistemes *batch*. Tenint en compte que la colonització de les columnes ha estat homogènia, tal com s'ha descrit en l'apartat anterior, el comportament fortament diferenciat entre els trams T1-T2 i T3 suggereix que el reactiu de Fenton ha quedat retingut en el darrer tram de la columna i ha reaccionat degradant els hidrocarburs presents. Així doncs, la degradació en *batch* del primeres 14 dies podria haver estat produïda majoritàriament per l'oxidant i no per a les poblacions microbianes mentre que la degradació que es detecta entre els dies 14 i 28 de l'oxidació podria estar causada per les poblacions microbianes, mostrant l'afectació d'aquestes a l'últim tram (T3).

En el cas de la columna i posterior incubació en *batch* de les mostres de biodegradació aeròbia, les comunitats microbianes presents en la totalitat de la columna no mostren degradació durant la incubació en columna, però presenten una capacitat biodegradadora important assolint un 63% de biodegradació dels LABs als 28 dies d'incubació en *batch*. No s'observen diferències en el comportament dels diversos trams de la columna. Possiblement donades les condicions d'empaquetament de les columnes el temps d'incubació hagi estat insuficient.

Pel que fa a la columna en condicions desnitrificants, la curta durada de la incubació en columna sigui molt probablement el factor limitant a l'hora de trobar degradació en aquesta primera fase. Tant les columnes anaeròbies com la incubació posterior no han mostrat degradació. És probable doncs que la degradació anaeròbia sigui prou lenta per ser gairebé negligible en experiments de tipus columna. (Johnson 2003) ha mostrat l'existència d'activitat microbiana en columnes de sòl contaminades per LABs en condicions anaeròbies, durant 253 dies. No obstant, aconsegueix una reducció de tan sols el 38%, i atribuïda en gran part a la retenció dels LABs en el sòl o la columna.

### **8.3.2. Caracterització de les poblacions microbianes durant els experiments en columnes de sòl**

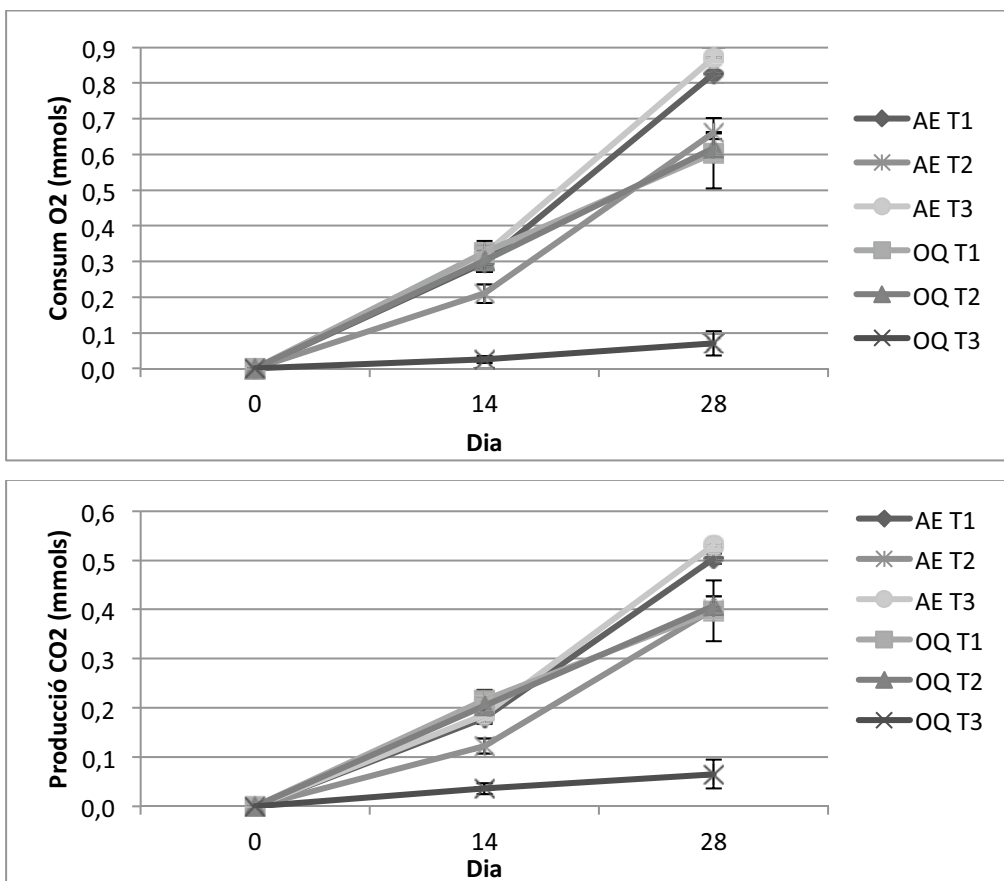
La caracterització de la comunitat microbiana s'ha dut a terme mitjançant una respirometria (producció de CO<sub>2</sub> i consum d'O<sub>2</sub> (apartat 3.1.5.)) per determinar l'activitat microbiana, i mitjançant l'anàlisi de DGGE del gen 16SrRNA i la quantificació de gens funcionals per qPCR per definir l'estructura, composició i potencial metabòlic de la comunitat microbiana existent.

#### **8.3.2.1. Avaluació de l'activitat microbiana mitjançant respirometria**

La respirometria mostra l'activitat de les poblacions microbianes. S'ha mesurat el consum d'oxigen i la producció de diòxid de carboni al llarg de les incubacions post- columna de les columnes d'oxidació química i biodegradació aeròbia (figura 8.8.). En el cas de la columna sota condicions desnitrificants, les incubacions posteriors s'han dut a terme sense oxigen, i per tant aquests paràmetres no són mesurables.



### Columnnes de sòl



**Figura 8.8.** Consum d'oxigen (A) i producció de diòxid de carboni (B) al llarg de la incubació en els diversos trams dels tractaments aerobi (AE) i oxidació química (OQ). Les barres representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents.

El tractament aerobi i els trams T1 i T2 (superior i mig) del tractament d'oxidació química presenten respirometries similars, d'aproximadament 0'023 mmols d'oxigen consumits i 0'014 mmols de diòxid de carboni produïts diàriament. El tram T3 (més proper a l'influent) del tractament d'oxidació química mostra una tendència completament diferent presentant una activitat respiratòria quasi nul·la.

El consum d'oxigen i la producció de CO<sub>2</sub> en les incubacions de sòl del tram més baix de la columna tractada amb oxidació química són aproximadament 0'002 mmols diaris cadascun. És a dir, el consum d'oxigen és una desena part de l'observat en les altres mostres. En canvi, la producció de CO<sub>2</sub> és més elevada. La relació entre oxigen consumit i diòxid de carboni emès en els processos de biodegradació (en la columna BA i en els trams superior i mig de la columna OQ) és de 1'66 aproximadament, mentre que en aquest tram és de 0'89, indicant que es produeix diòxid de carboni a partir d'altres processos.

La producció de CO<sub>2</sub> en el tram T3 es podria atribuir a la degradació produïda per restes de reactiu de Fenton que quedessin en porus intersticials del sòl. Aquest resultat confirmaria que el reactiu ha quedat retingut en el tram inferior durant la incubació en columna. Tot i que aquest comportament no s'ha descrit en la bibliografia, sí que s'ha observat la producció de lixiviats amb contingut oxidant en altres

experiments realitzats en columnes tractades per oxidació química emprant peròxid d'hidrogen (Silva, Zagatto et al. 2005, Palmroth, Langwaldt et al. 2006).

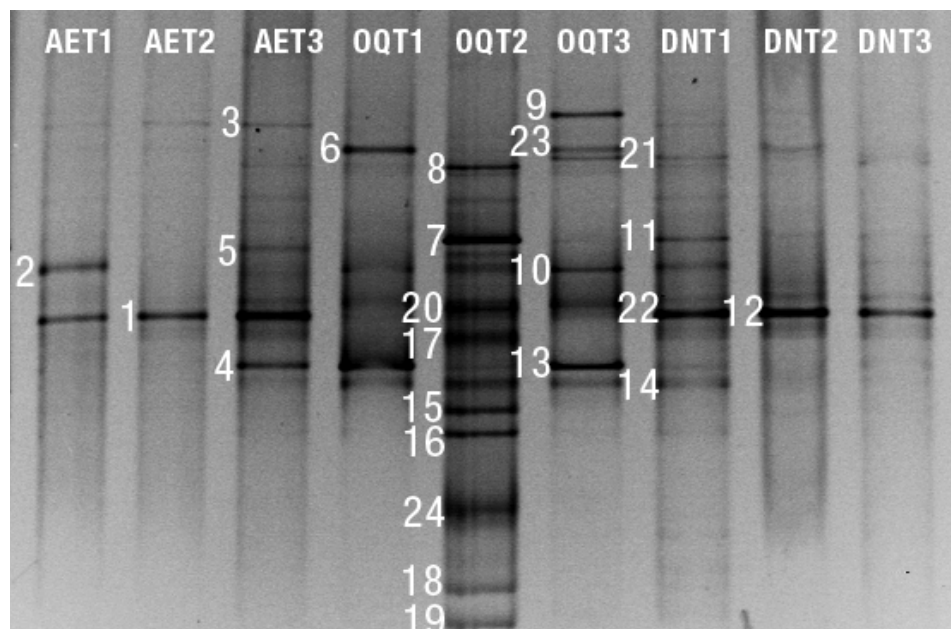
La respirometria suggereix que les poblacions microbianes del tram considerat (OQ-T3) han quedat perjudicades per la reacció de Fenton produïda durant la incubació en *batch*, presentant una menor activitat respiromètrica i una recuperació metabòlica més lenta que en els trams més allunyats de l'influent (T1 i T2). Aquests resultats confirmarien que la degradació de LABs observada per a la mostra de T3 en els primers 14 dies dels experiments post columna en *batch*, es deu a activitats fisicoquímiques, i no biològiques.

### 8.3.2.2. Estudi de l'estructura de la comunitat microbiana mitjançant DGGE

L'estructura de la comunitat microbiana trobada al final de la incubació en columna caracteritzada per DGGE es mostra a la figura 8.9. L'estructura de la comunitat microbiana en els diversos trams de les columnes un cop acabada la incubació en *batch* es mostra a la figura 8.10.

En els perfils dels gens 16S rRNA de les mostres s'han escindit 24 i 23 bandes diferents respectivament, tenint en compte criteris d'intensitat, repetibilitat i representativitat. La identitat filogenètica de les bandes que no s'ha pogut obtenir directament s'ha assignat basant-se en el patró de migració de bandes d'altres punts del mateix tractament. Els amplicons seqüenciats han estat en tots els casos de més de 450 parells de bases (taula 8.3.).

#### Perfils de DGGE de mostres obtingudes al final de l'experiment en columna



**Figura 8.9.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA del punt final de les incubacions en columna. Columnes BA, BD i OQ.

Columnnes de sòl

**Taula 8.3.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades

Ban da	Detecció									pb	Organisme més proper (accession no.)	% sim	Grup filogenètic	Família
	A T1	A T2	A T3	Q T1	Q T2	Q T3	DT 1	D T2	D T3					
H1	*	X	X	X			X	X	X	527	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
H2		X		X	X	X	X	X	X	500	<i>Novosphingobium subterraneum</i> (AB681046)	100%	α-proteobacteria	Sphingomonadaceae
H4	*		X	X	X	X	X			517	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
H5	*		X	X		X				515	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
H6					X					494	<i>Clostridium</i> sp. (Y15985)	99%	Firmicutes	Clostridiaceae
H7						X				525	<i>Perlucidibaca piscinae</i> (AB681750)	94%	γ-proteobacteria	Moraxellaceae
H8						X				475	<i>Cupriavidus basilensis</i> (HQ647272)	99%	β -proteobacteria	Burkholderiaceae
H9							X			529	<i>Methylophilus methylotrophus</i> (NR041257)	98%	β -proteobacteria	Methylophilaceae
H12	*						X	X	X	528	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
H13							X	X		528	<i>Comamonas aquatica</i> (AB680704)	100%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
H15					X					462	<i>Bacillus</i> sp. (JX406329)	96%	Firmicutes	Bacillaceae
H16					X					470	<i>Xenophilus</i> sp. M2T2B11	93%	β -proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis

Columnnes de sòl

								(GQ246689)				
H17		X						500	<i>Caulobacter</i> sp. 1005 (JX566545)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Caulobacteraceae
H18		X						429	<i>Williamsia limnetica</i> (JX841020)	97%	Actinobacteria	Nocardiaceae
H19		X						465	<i>Rhodococcus baikonurensis</i> (JX683682)	100%	Actinobacteria	Nocardiaceae
H20		X	X	X	X	X	X	483	uncultured bacterium (CU924435)	95%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae (53%), Burkholderiales 89%
H21	*			X	X	X	X	517	<i>Acidovorax</i> sp. (JQ670734)	100%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
H22				X	X	X		527	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
H23			X					485	<i>Clostridium</i> sp. (Y15985)	99%	Firmicutes	Clostridiaceae

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank. <sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009).  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  representen alfa, beta i gamma Proteobacteria, respectivament. \* Grup H1, H4, H5, H12, H22.

Les seqüències obtingudes s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC887376 a KC887394.

Atenent a la intensitat relativa de les bandes, al llarg de l'experiment han predominat els  $\beta$ -proteobacteris. Aquests resultats són consistents amb els obtinguts anteriorment en biodegradació sota diverses condicions redox (Capítol 5), on es detectava una primera fase de predominança dels  $\beta$ -proteobacteris, seguida d'una disminució relativa d'aquests en favor de les famílies de  $\alpha$ -proteobacteria i  $\gamma$ -proteobacteria.

Dins els  $\beta$ -proteobacteris, el gènere *Acidovorax* es el més ubic, trobant-se en tots els tractaments, tot i que en diferents posicions, i sent la població majoritària en les columnnes BA i BD. Aquest resultat concorda amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de les poblacions colonitzadores, on és l'únic dels gèneres identificats que s'ha detectat a tots els punts de mostreig al llarg de les columnnes. *Acidovorax* és un conegut degradador d'hidrocarburs, tant aromàtics com alifàtics, i s'ha detectat prèviament en les incubacions de tipus *batch* (capítol 8), tot i que no amb tanta hegemonia, així com jugant un rol predominant en la colonització del sòl. La seva presència pot estar lligada a la degradació dels LABs. S'ha descrit en la literatura la capacitat desnitrificant per a soques pertanyents a aquest gènere (Shen, Zhou et al. 2013). S'han detectat també altres membres del mateix grup com *Xenophilus*, *Cupriavidus* i *Methylophilus*, els dos primers en la part intermèdia de la columna d'oxidació química i l'últim en la part inferior de la mateixa columna. *Xenophilus* és un gènere descrit com a degradador de compostos azo (compostos derivats del diazè, on molt freqüentment els hidrogens estan substituïts per compostos aromàtics o alifàtics) (Pandey, Singh et al. 2007). *Cupriavidus* ha estat descrit amb freqüència com a degradador d'hidrocarburs i els seus metabòlits (Bacosa, Suto et al. 2010, Bacosa, Suto et al. 2012, Ivanova, Borzenkov et al. 2012), així com d'altres compostos aromàtics, com cloroaromàtics com halobenzoats, clorofenols i nitrofenols (Pérez-Pantoja, De la Iglesia et al. 2008). *Methylophilus* s'ha detectat amb anterioritat (capítol 6). Membres d'aquest gènere han estat suggerits com a degradadors de PAHs (Zhang, Wang et al. 2011).

Dels diversos microorganismes identificats al llarg de la incubació en columna, dins el grup  $\alpha$ -proteobacteria destaca la presència de *Novosphingobium*, detectable en major o menor proporció en gairebé tots els tractaments. Diverses soques pertanyents a aquest gènere han estat descrites prèviament com a degradadores d'hidrocarburs (Takeuchi, Hamana et al. 2001, Sohn, Kwon et al. 2004, Liu, Wang et al. 2005).

És també destacable la presència de la classe *Actinobacteria*, amb el gènere *Rhodococcus*. Aquest gènere s'ha identificat nombrosos cops en episodis de contaminació per hidrocarburs (Vinas, Sabate et al. 2005, Alonso-Gutierrez, Figueras et al. 2009). S'han reportat a la bibliografia soques degradadores d'alcans del gènere *Rhodococcus* (Kim, Kim et al. 2002), i s'han detectat gens degradadors d'alcans i hidrocarburs aromàtics en *Rhodococcus* (Andreoni, Bernasconi et al. 2000). *Rhodococcus* s'ha associat a la degradació d'*n*-alcans de fins a 36 carbonis (Yuste, Corbella et al. 2000, Whyte, Smits et al. 2002, Quatrini, Scaglione et al. 2008).

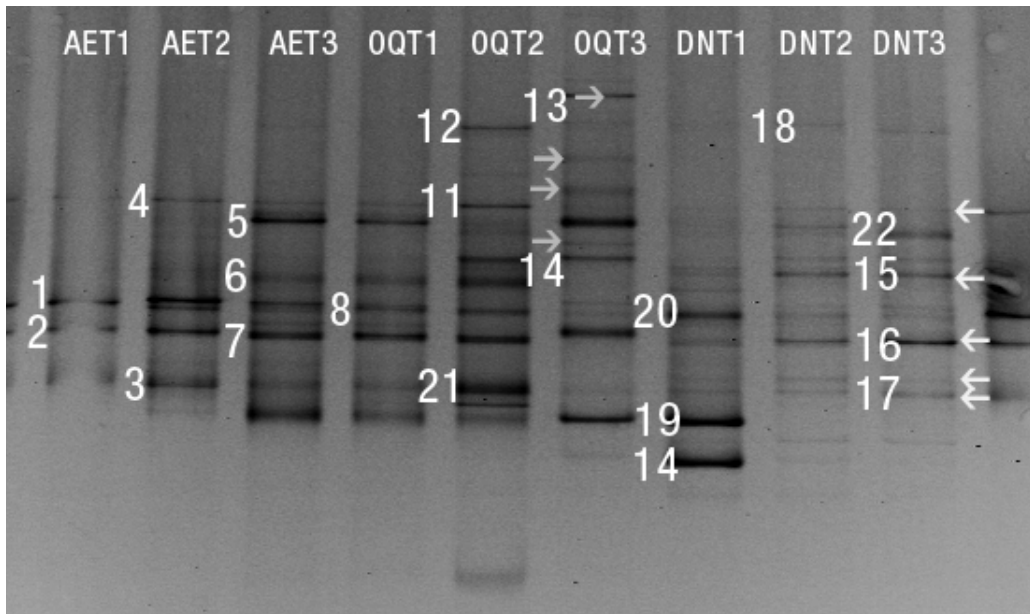
Pel que fa a la diversitat microbiana, s'ha de ressaltar la diferència entre els perfils de bandeig corresponents a la columna BA i els corresponents a la columna OQ, entre els quals s'observen diferències substancials degudes a l'efecte de l'oxidant químic. Les mostres corresponents al tractament de biodegradació aeròbia (BA) i biodegradació desnitrificant (BD) mostren en general una menor diversitat microbiana que les mostres provinents de la columna OQ. En canvi, la columna OQ és la que mostra una menor ràtio degradadors d'alcans/heteròtrofs totals (veure apartat 8.3.3.4.), sent lleugerament major del 0'01% pels trams T1 i T2 i un 0'002% pel tram T3. Així doncs,

## Columnes de sòl

els microorganismes degradadors es troben per sota del llindar de detecció de la tècnica, en el cas de la columna OQ (no, en canvi, en la columna BA).

Sorprenentment, el tram més afectat per la oxidació química no sembla ser el T3 (tram inferior, amb major contacte amb l'oxidant) si no el tram intermedi. Aquest fenomen podria ser causat per la producció d'oxigen i productes d'oxidació parcial de la matèria orgànica del sòl (no LABs) a partir del peròxid d'hidrogen. L'oxigen i els compostos orgànics d'oxidació parcial s'han pogut crear en el segon tram, o bé arribar al tram intermedi seguint el flux de la columna, proporcionant majors concentracions d'oxigen i per tant ajudant a un increment de la diversitat microbiana.

### Final de la incubació en batch



**Figura 8.10.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les incubacions de tipus *batch* dels diversos trams de les tres columnes. Les fletxes marquen les bandes amb major influència sobre les components principals, en gris per la component 1, i en blanc per la component 2.

Columnnes de sòl

**Taula 8.4.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades

Band a	Detecció									Longi- tud (pb)	Organisme més proper (accession no.)	% sim	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>
	A T1	A T2	A T3	Q T1	Q T2	Q T3	D T1	D T2	D T3					
G1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	479	uncultured Chromatiales (JN038237)	98%	$\gamma$ -proteobacteria	$\gamma$ -proteobacteria incertae_sedis[67%]
G5			X	X	X	X				472	uncultured <i>Ottowia</i> sp. (JN648305)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
G6			X	X	X					478	<i>Caulobacter</i> sp. 1005 (JX566545)	98%	$\alpha$ -proteobacteria	Caulobacteraceae
G9		X	X	X	X	X				474	uncultured <i>Parvibaculum</i> sp. (EU375222)	98%	$\alpha$ -proteobacteria	Rhodobiaceae
G10 =G15				X	X					455	uncultured <i>Acidovorax</i> sp. (JX944539)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
G12				X						480	<i>Cupriavidus basilensis</i> (HQ647272)	96%	$\beta$ -proteobacteria	Burkholderiaceae
G13						X				497	uncultured Methylophilaceae bacterium (JF703342)	95%	$\beta$ -proteobacteria	Methylophilaceae
G14							X	X	X	507	<i>Azoarcus</i> sp. HxN1 (AF331975)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Rhodocyclaceae
G15 =G10							X	X	X	515	<i>Acidovorax soli</i> strain C3RA3 (JQ689195)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
G16							X	X	X	519	uncultured Rhodocyclaceae bacterium (JQ278974)	98%	$\beta$ -proteobacteria	Rhodocyclaceae
G19						X	X			500	uncultured <i>Methyloversatilis</i> sp. (JN177630)	98%	$\beta$ -proteobacteria	Rhodocyclaceae
G20							X	X	X	487	<i>Sphingobium xenophagum</i> (GU969041)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009).  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament.

Les seqüències obtingudes s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC887395 a KC887407.

Els *batch* van ser creats emprant el sòl i aigua destil·lada suplementada amb nutrients. Per tant, les poblacions microbianes provenen enterament de la columna.

En primer lloc, és destacable la major diversitat poblacional obtinguda un cop acabada la incubació en *batch* en relació a la diversitat detectada al finalitzar l'experiment amb les columnes de sòl. El canvi de condicions provocat per l'agitació i una major ràtio sòlid: líquid ha millorat l'aireació i ha proporcionat unes condicions més adequades per al creixement dels microorganismes, provocant una major diversitat poblacional. D'altra banda, les diferències entre les mostres tractades en condicions aeròbies i en condicions desnitrificants es fan més paleses.

El tercer tram de la columna d'oxidació química presenta una composició molt diferent als altres dos, probablement a causa de l'efecte de l'oxidant químic sobre les poblacions microbianes. La mostra corresponent al segon tram de l'oxidació química presentava una diversitat molt més elevada en columna, probablement deguda a la major oxigenació produïda per l'arribada d'oxigen producte de la descomposició de l'oxidant químic. Al final de la degradació en *batch*, el perfil és molt similar a la del tram alt, i per tant no s'observa diferències amb aquest.

Als tractaments aerobis es troben membres dels grups  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  proteobacteria. En el grup de  $\alpha$ -proteobacteria, s'han identificat membres de les famílies *Caulobacteraceae* i *Rhodobiaceae*; en el grup de les  $\beta$ -proteobacteria, *Methylophilaceae*, *Comamonadaceae* i *Burkholderiaceae*; en el grup de les  $\gamma$ -proteobacteria, *Chromatiaceae*. En canvi, en els tractament desnitrificant s'han identificat majoritàriament membres del phylum  $\beta$ -proteobacteria com *Rhodocyclaceae* i *Comamonadaceae*, i un representant de les  $\alpha$ -proteobacteria, de la família *Sphingomonadaceae*.

Un cop finalitzada la incubació en *batch*, la ràtio entre els microorganismes degradadors d'alcanes i els heteròtrofs totals és d'entre 0'1% i 0'9% per a BA i d'aproximadament l'1% per a OQ. Per tant, els microorganismes amb capacitats degradadores es troben dins el rang de detecció de la tècnica (veure apartat 8.3.3.4.).

Entre els gèneres detectats és destacable la presència d'*Acidovorax*, microorganisme destacat en la colonització de les columnes, el qual s'ha detectat en les mostres d'oxidació química i desnitrificació, però no en les aeròbies, on podria haver estat desplaçat per altres gèneres. S'ha pogut identificar un filotip amb una seqüència propera a un membre del gènere *Parvibaculum* no cultivat (Alonso 2009) en trams de les columnes BA i OQ. Aquest microorganisme ha estat relacionat amb la degradació de LASs (Schleheck, Knepper et al. 2004) i LABs (Martinez-Pascual, Jimenez et al. 2010), i s'ha detectat amb anterioritat als experiments de biodegradació (capítols 5 i 6). S'ha detectat també els gèneres *Caulobacter*, descrit com a degradador de PAHs i alcanes (van Beilen, Funhoff 2007), i *Ottowia*, un gènere anaerobi facultatiu.

La banda G1 presenta un percentatge de similitud molt elevat (98%) amb una soca de *Chromatiales* aïllada d'un sol contaminat per petroli. Per tant, aquest microorganisme, detectat en les incubacions procedents de les mostres de tots els trams de la columna podria estar relacionat amb la degradació dels LABs.

Entre els filotips detectats en les incubacions desnitrificants (columna DN), cal subratllar aquells amb seqüències similars a *Acidovorax*, *Azoarcus*, *Methyloversatilis* i *Sphingobium*, microorganismes descrits com a degradadors d'hidrocarburs i anaerobis facultatius.



Comparant els gels de DGGE realitzats durant la colonització de les columnnes, al final de la incubació en columna i un cop realitzada la posterior incubació en *batch*, s'ha pogut constatar que els diferents gèneres detectats s'han comportat de maneres diverses, augmentant o disminuint la seva predominança al llarg del temps.

En general, els microorganismes predominants en la colonització, en la incubació en columna i en els assajos *batch* varien molt, arribant al punt de tenir relativament poques coincidències entre perfils de bandeig i bandes identificades.

En primer lloc, el gènere *Acidovorax*, com s'ha comentat amb anterioritat, és un gènere especialment predominant durant la colonització de les columnnes. Aquest gènere és també predominant al final de les incubacions en columna, detectant-se en diverses bandes i present a tots els tractaments. No obstant, després de la incubació de tipus *batch*, aquest gènere no es detecta en el tractament aerobi i la seva presència es redueix dràsticament per als altres tractaments. Aquest comportament sembla indicar que *Acidovorax* perd la predominança en favor d'altres microorganismes de creixement més ràpid o més adaptat a les condicions de *batch*.

Un altre microorganisme que segueix aquest patró és *Bacillus*, detectat en la colonització i en la incubació de la columna de sòl. No obstant, aquest gènere és molt més minoritari, i durant la incubació en columna només es manté i incrementa la seva presència en el tram OQ T2.

El gènere *Parvibaculum*, en canvi, no és detectat en la colonització de les columnnes ni en el breu període d'incubació en columna, però juga un paper important en la incubació *batch*. Aquest microorganisme és detectat tan sols en els tractaments BA i OQ, contràriament al detectat als capítols 6 i 9. *Parvibaculum* es veu afavorit per les condicions ambientals proporcionades per la incubació en *batch*, com es pot veure al capítol 9.

Un altre gènere que es detecta en la incubació de tipus *batch*, però no abans, és *Azoarcus*, microorganisme trobat amb freqüència en ambients anòxics contaminats per compostos aromàtics. És possible que aquest microorganisme requereixi més temps per créixer, ja que el rendiment cel·lular és menor en condicions anòxiques. De la mateixa família (*Rhodocyclaceae*), es detecta també el gènere *Methyloversatilis*. Aquest gènere es troba en baixa proporció en la colonització de la columna, però augmenta fins a tenir una gran importància en la incubació *batch* del tram DN-T1.

Els gèneres *Caulobacter* i *Cupriavidus* no s'han detectat en la colonització de les columnnes de sòl, però es troben tant al final de la incubació en columna com després dels assajos en *batch*. És destacable que aquests microorganismes s'han detectat només en les mostres provinents de la columna OQ.

D'altra banda, la família *Sphingomonadaceae* es troba àmpliament present en la colonització de les columnnes (gèneres *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Sphingopyxis*), però desapareix en els DGGEs de la incubació en columna. *Sphingobium* apareix altra vegada en les incubacions anaeròbies en *batch*. S'ha detectat també el mateix gènere en assajos de degradació en condicions desnitrificants (capítol 6), suggerint la seva implicació en la degradació dels LABs en anaerobiosi.

Diversos gèneres detectats en la colonització de la columna de sòl s'han deixat de detectar durant les incubacions en *batch* i columna, com per exemple *Aquabacterium*, *Curvibacter*, *Leifsonia*, *Hidrogenophaga*, *Microbacterium*, *Arenimonas* o *Massilia*. Molts d'aquests gèneres han estat detectats també durant la degradació in vitro dels LABs en *batch* (capítol 6). No obstant, podria ser que les condicions de la incubació en columna no haguessin permès el creixement d'aquests microorganismes,

que les concentracions de LABs fossin massa altes, o que hagin estat desplaçats per altres microorganismes de creixement més ràpid.

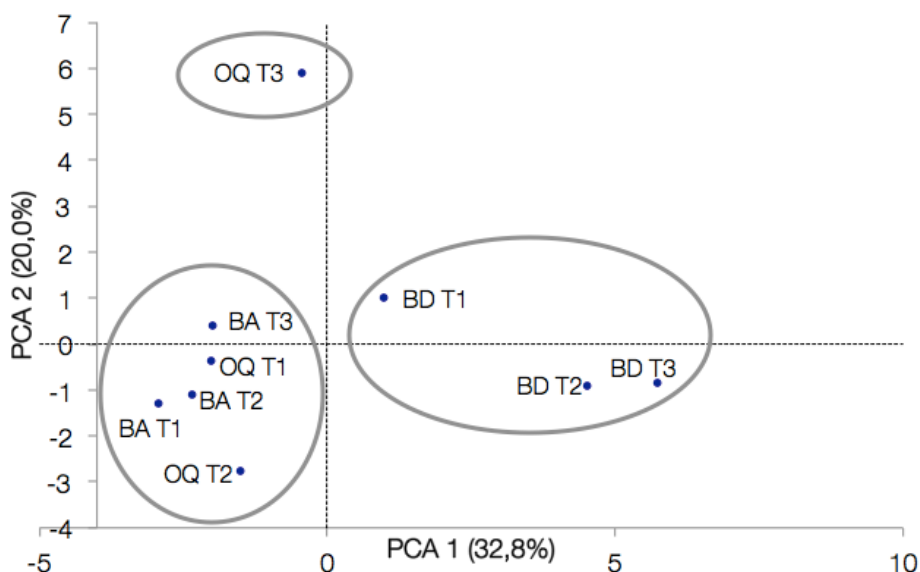
Finalment, s'ha considerat interessant fer una comparació entre les poblacions microbianes detectades sota condicions desnitrificants en experiments de tipus *batch* (capítol 6) i les detectades en aquest capítol. S'ha detectat gèneres completament diferents entre els dos sistemes experimentals probablement a causa de les diferents condicions d'incubació (presència o no de matriu sòlida, aireació, disponibilitat de nutrients...). L'únic gènere coincident en els dos experiments és *Sphingobium*, que s'ha detectat tant en els *batch* desnitrificants com en els *batch* seqüencials (capítol 6).

### Anàlisi de components principals

Tot i el clar predomini d'algunes bandes al llarg de les incubacions (per exemple, les bandes 5, 7 i 9), és difícil analitzar l'evolució de l'estructura de la comunitat microbiana i els canvis associats només a partir de la presència o intensitat relativa de les bandes.

Els canvis temporals i entre tractaments s'han avaluat per anàlisi de components principals (PCA) i amb una anàlisi clúster a partir de la matriu de similitud de Pearson.

Representant gràficament les dues primeres components, que expliquen un 52,8% de la variabilitat, s'han detectat tres clústers clarament diferenciats (figura 8.11). El primer format per les mostres provinents de les incubacions en condicions desnitrificants (C4). El segon comprèn les incubacions en condicions aeròbies provinents de la columna aeròbia i els dos trams superiors de la columna tractada amb oxidants químics. Per últim, el tercer inclou només el tram baix de la columna tractada amb oxidants químics, el tram més afectat per l'exposició al reactiu de Fenton (veure punts 8.3.3.1 i 8.3.3.2.1.).



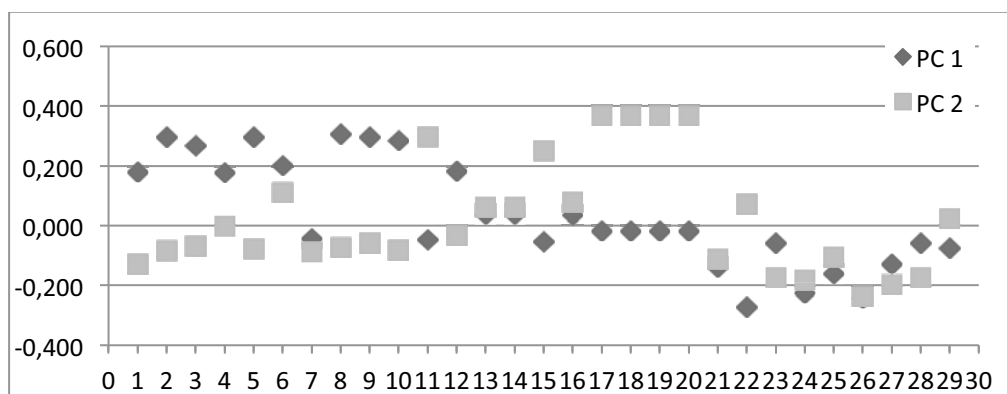
**Figura 8.11.** Diagrama de dispersió per a les dues primeres variables (PC1 i PC2) obtingudes en l'anàlisi de components principals.

Pel que fa a la primera component (PC1), sembla estar relacionada amb la presència o absència d'oxigen. Amb valors positius, es troben les mostres anòxiques, mentre que en valors negatius es troben les mostres aeròbies. És interessant conèixer quines bandes permeten explicar la variabilitat d'aquesta component: seran les bandes corresponents a microorganismes associats a la degradació dels LABs sota unes condicions redox determinades.

Les bandes amb més pes en aquesta component són les marcades al gel de DGGE (figura 8.10) (bandes 2, 5, 8, 9 i 10, figura 8.12). Aquestes es detecten principalment en els tres primers carrils, corresponents a les incubacions a partir del sòl de la columna aeròbia. D'aquestes bandes s'ha pogut identificar alguns microorganismes (corresponents a les bandes G1, G5 i G6), com serien *Ottowia*, *Caulobacter* i *Chromatiales*. Com s'ha comentat en l'apartat anterior, *Ottowia* és un gènere dins el qual s'han detectat microorganismes aerobis facultatius amb capacitat per reduir nitrats (Spring, Jackel et al. 2004).

En aquesta component, no existeix cap banda especialment predominant, si bé si que hi influeixen positivament les bandes que es troben en els primers carrils (corresponents a les mostres incubades en aerobiosi), exceptuant la banda 7, identificada com a *Chromatiales* (G1), que és comuna a gairebé tots els carrils. És destacable també que les bandes que es troben als carrils incubats en anaerobiosi hi influeixen negativament, però també sense cap banda predominant.

La segona component (PC2, figura 8.12.) sembla estar relacionada amb l'efecte dels oxidants químics sobre el sòl. L'única mostra que destaca respecte les altres és la OQ T3, corresponent a les incubacions del tram inferior de la columna d'oxidació química. Les bandes que influeixin positivament en aquesta component seran les bandes corresponents a microorganismes associats a la presència de l'oxidant química, mentre que les que hi són associades negativament seran les que no es troben en aplicar l'oxidant. Per a aquesta component existeixen quatre bandes amb una forta influència positiva, les bandes 17 a 20, detectades tan sols en la mostra OQ T3 (la més propera a l'influent amb entrada de reactiu MFR). Les bandes amb més pes en aquesta component estan marcades al gel de DGGE (figura 8.10).



**Figura 8.12.** Coeficients de pes en component (PC loading) de cada banda en les components principals 1 i 2.

**Anàlisi de la diversitat****Taula 8.5.** Índex de diversitat de Shannon-Wiener ( $H'$ ) de la diversitat bacteriana estimada, al llarg de les diverses incubacions

$H'$	AER	OQ	DNIT
Tram 1	1,29	2,1	1,68
Tram 2	1,66	2,23	2,2
Tram 3	2,06	2,08	2,05

L'Índex de Shannon-Wiener mostra una major diversitat microbiana en les incubacions procedents de la columna sotmesa a l'oxidació química. Una hipòtesi es la major disponibilitat de compostos orgànics simples resultants de l'oxidació parcial de la matèria orgànica del sòl, tot i que no es pot afirmar amb seguretat. També és interessant destacar la major diversitat de les incubacions dutes a terme en condicions desnitrificants.

**8.3.2.3. Quantificació de la població total i gens funcionals**

Pel que fa a l'evolució de gens 16S rRNA i gens funcionals, els resultats es mostren a la figura 8.13.

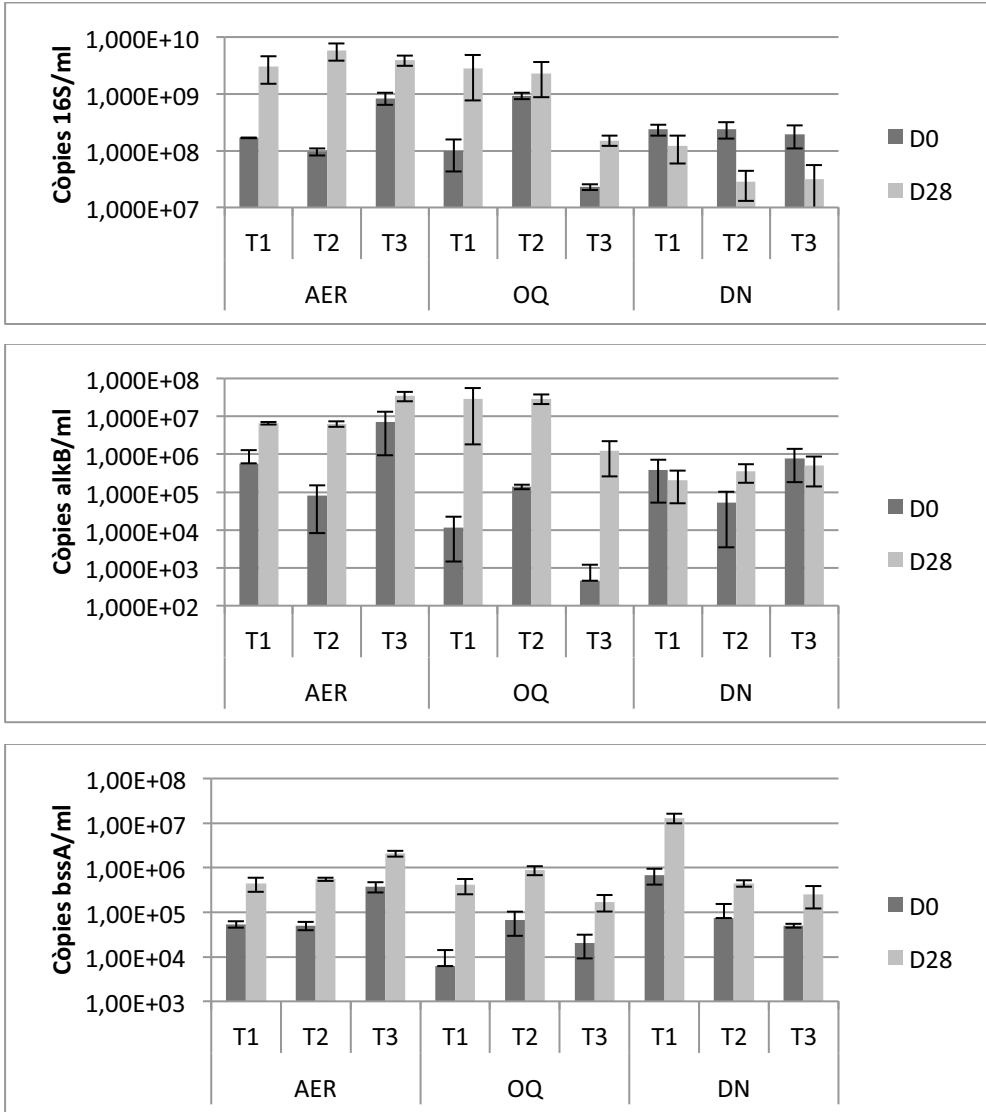
La quantificació de la població total (gen 16S rRNA) proporciona dades coherents amb els resultats obtinguts en la degradació i la respirometria.

En la columna de biodegradació aeròbia (AE), al final de la degradació en columna s'han obtingut valors d'aproximadament  $10^8$  còpies/ml per als dos trams superiors i de  $10^9$  còpies/ml en el tram inferior. El major creixement en la part inferior podria ser degut a la major aportació de nutrients i oxigen, ja que és la zona d'entrada de l'aigua a la columna. Un cop la columna ha estat tallada i incubada en *batch*, les diferències entre trams desapareixen i la població augmenta fins a valors d'aproximadament  $5 \cdot 10^9$  còpies/ml.

Pel que fa a la columna on s'ha aplicat l'oxidant químic (OQ), s'ha detectat valors equiparables a la columna AE al tram superior (T1), mentre que en els altres dos trams s'ha fet palès l'efecte de l'oxidant. El tram inferior (T3) mostra concentracions de 16S rRNA inferiors als altres, mostrant una certa recuperació als 28 dies d'incubació en *batch*, però sempre un ordre de magnitud per sota dels altres ( $10^7$  còpies/ml al final de la incubació en columna i  $10^8$  còpies/ml al final de la incubació en *batch*). En canvi, el tram mig sembla estar beneficiat per una possible oxigenació i/o presència de productes d'oxidació parcial produïts per la presència de  $H_2O_2$  a la part baixa de la columna, presentant valors de  $10^9$  còpies/ml al final de la incubació en columna. Un cop finalitzada la incubació en *batch*, els valors s'han equiparat amb els del tram mig i els de la columna AE.

En la columna desnitrificant, els valors de 16S rRNA són molt més baixos, probablement a causa del creixement més lent dels microorganismes en condicions desnitrificants. D'altra banda, durant la incubació en *batch* els valors de 16S rRNA disminueixen.

Columnes de sòl



**Figura 8.13.** Quantificació dels gens 16S (A), *alkB* (B) i *bssA* (C) els dies 0 (corresponent al final de la incubació en columna) i 28 (corresponent al final de la incubació en *batch*) de les incubacions dels diversos trams de columnes de sòl. Les barres representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents.

La quantificació del gen *alkB*, que codifica per l'alcà hidroxilasa, dóna una idea de la capacitat potencial degradadora d'alcans de la població. En general, les còpies de *alkB*/ml oscil·len entre  $10^5$  còpies/ml i  $10^7$  còpies/ml, però amb variacions depenent del tractament aplicat a la columna. En el cas de la columna AE, generalment les quantitats d'*alkB* són proporcionals al 16S, mantenint-se en tots els trams la ràtio en un valor aproximat de  $10^{-3}$ , tant al final de la incubació en columna com al final de la incubació en *batch*. En la columna OQ, en canvi, al final de la incubació en columna els valors de *alkB* són significativament inferiors, proporcionant una ràtio de l'ordre de  $10^{-4}$  en els trams superior i mig i  $10^{-5}$  en el tram inferior. L'oxidant químic, per tant, ha disminuït la ràtio microorganismes degradadors/població total. No obstant, al final de la incubació en *batch* les poblacions s'han recuperat, arribant a nivells similars als de la columna BA. Finalment, en la columna BD, la quantificació al final de la incubació en

columna i al final de la incubació en *batch* dóna resultats molt similars, al voltant de  $10^5$  còpies *alkB*/ml. La disminució de 16S al final de la incubació en *batch* representa un augment de la ràtio, tot i que no impliqui un increment de microorganismes degradadors.

Per últim, la quantificació del gen *bssA* dóna una idea de la capacitat degradadora dels microorganismes en condicions anaeròbies. Al contrari del que es podria esperar, i dels resultats obtinguts en capítols anteriors (capítols 6 i 7), el gen *bssA* no desapareix sota condicions aeròbies. En la columna BA (condicions aeròbies), les quantitats al final de la incubació en columna són d'unes  $10^5$  còpies/ml, augmentant un 50% en la incubació en *batch*. En el cas de la columna OQ, tot i que al final de la incubació en columna tots els trams presenten quantitats inferiors a les observades a la columna BA, les poblacions es recuperen per arribar a valors similars al final de la incubació en *batch*.

Finalment, és destacable la forta presència del gen *bssA* en la columna BD i les incubacions en *batch* posteriors, arribant fins a  $10^7$  còpies/ml en el primer tram de la columna. En aquest cas, la quantitat de *bssA* es troba entre l'1% i el 10% dels valors detectats pel gen 16SrRNA, suggerint l'existència de mecanismes de biodegradació anaeròbia de LABs, lligats a la transformació de l'anell aromàtic.

Els resultats obtinguts amb les anàlisis de l'estructura, composició i activitat poblacional mostren que, l'oxidant químic ha afectat els trams T3 i T2 de la columna on ha estat aplicat. Al tram T2 l'estructura i quantitat de les poblacions microbianes s'han vist afectades, però no el potencial biodegradador de la comunitat. En canvi, el tram que ha tingut més contacte amb l'oxidant químic (T3), a més de reduir-se la diversitat, el nombre de còpies gèniques (16S rRNA i *alkB*) i l'activitat, s'ha perdut part del potencial degradador de la comunitat.

No obstant, tot i haver-hi un fort efecte de l'oxidant químic sobre les poblacions microbianes, es pot concloure que aquestes es poden recuperar en un lapse de temps relativament curt.

## Resultats destacats del capítol

El temps de reacció que s'ha considerat per avaluar la degradació en columna no ha estat prou llarg, tot i que experiments previs mostren degradació en temps equivalents (capítol 5). Si que s'ha observat degradació de LABs en els assajos de biodegradació posteriors en batch en els tractaments de biodegradació aeròbia i oxidació química.

Les poblacions microbianes s'han vist afectades per la presència de MFR, tant en termes qualitius (canvis en les estructures poblacionals) com en termes quantitius (disminució de la població total i degradadora, i reducció de l'activitat metabòlica de les poblacions). No obstant, són capaces de recuperar-se en un període de temps relativament curt en experiments en batch.

La comunitat microbiana present a les columnnes de sòl està formada majoritàriament per  $\beta$  -proteobacteris. El gènere *Acidovorax*, predomina durant el procés de colonització de les columnnes de sòl i es manté en les incubacions de columna i *batch*, sobretot en el tractament de biodegradació desnitrificant. Altres gèneres que podrien estar lligats als processos de degradació dels LABs són *Xenophilus*, *Cupriavidus* i *Methylophilus* ( $\beta$  -proteobacteris) i *Caulobacter* i *Parvibaculum* ( $\alpha$ -proteobacteria).

Durant l'oxidació química en columna amb MFR s'ha detectat un increment de població gram positiva (*Actinobacteria* i *Clostridium*).

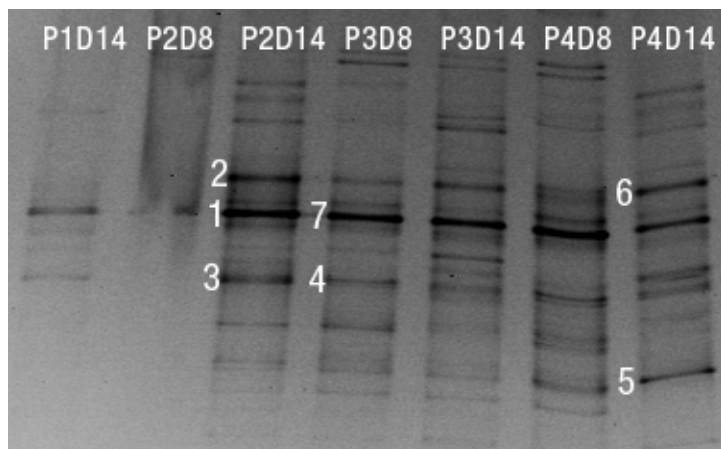
Els gèneres funcionals s'han confirmat bons indicadors de la biodegradació. *alkB* és un bon indicador del procés de biodegradació de LABs en condicions aeròbies. La ràtio *bssA*/16S és un bon indicador de l'ocurrència de condicions desnitrificants.

L'heterogeneïtat del sòl es veu confirmada en l'anàlisi de les poblacions després de la incubació en columna, on en les diferents alçades de la mateixa columna de sòl s'hi troben poblacions lleugerament diferents, sobretot en el cas de la columna MFR. Un cop el sòl ha passat a sistemes de tipus *batch*, les diferències es mitiguen.

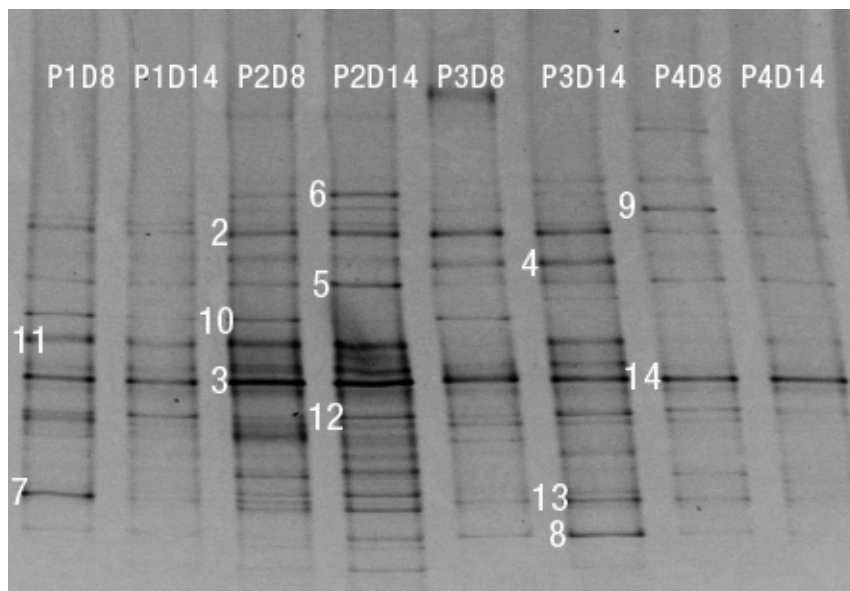
### 8.5. Material complementari: colonització de les columnes de sòl

En l'apartat 8.2, corresponent a la colonització de les columnes de sòl, s'ha descrit en línies generals la colonització.

En les taules i figures següents es mostren els perfils dels gens de 16S rRNA de mostres preses en els diversos punts de mostreig de cadascuna de les columnes al llarg del procés de colonització del sòl, els dies 8 i 14.

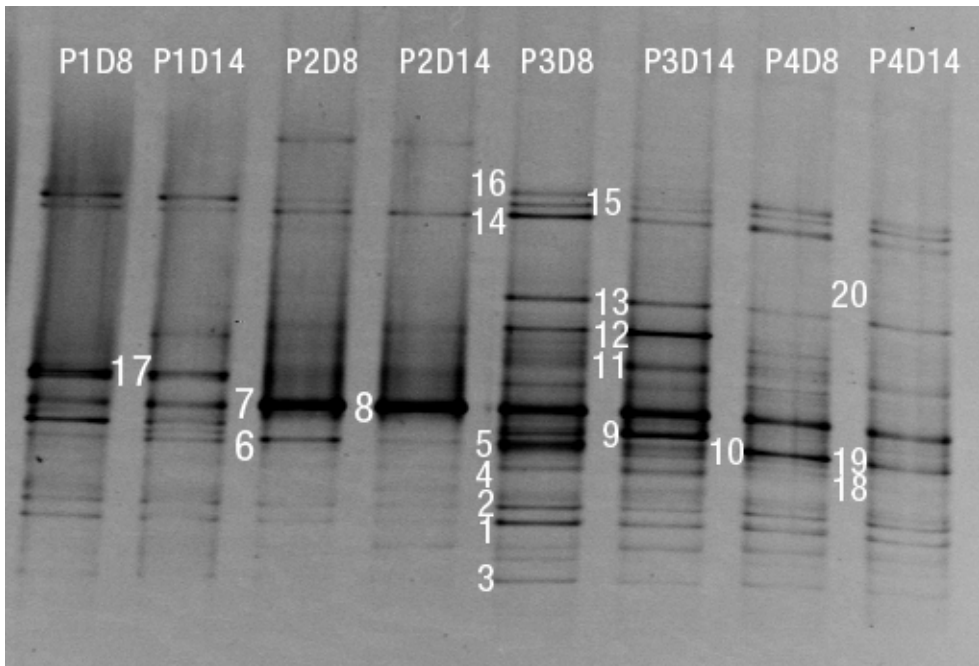


**Figura 8.14.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les mostres de colonització de la columna A (futura columna BA) als diversos punts de mostreig (P1 a P4), els dies 8 i 14. La mostra P1D8 no s'ha representat al DGGE.



**Figura 8.15.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les mostres de colonització de la columna B (futura columna OQ) als diversos punts de mostreig (P1 a P4), els dies 8 i 14.





**Figura 8.16.** Perfils de DGGE (40-80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens 16S rRNA de les mostres de colonització de la columna C (futura columna BD) als diversos punts de mostreig (P1 a P4), els dies 8 i 14.

La majoria de bandes es poden detectar a tots els punts de mostreig, amb canvis principalment en el P1 (entrada). Es poden observar també diferències d'intensitat entre els dies 8 i 14. *Acidovorax* és el gènere predominant, però s'han detectat també de manera força homogènia altres membres del phylum  $\beta$ -proteobacteria (*Curvibacter* i *Aquabacterium*), així com *Sphingomonas*, del phylum  $\alpha$ -proteobacteria.

Pel que fa a la columna C, es troben característiques molt similars a les colonitzacions analitzades anteriorment. Com a les altres columnes, *Acidovorax* és el gènere més destacat en tots els punts, podent identificar també membres de la família Sphingomonadaceae (*Sphingomonas*, *Sphingobium*) a més de *Methylophilus*, detectat àmpliament en els experiments de degradació i *Micobacterium*.

**Taula 8.6.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades

Ban da	Corr	Detecció								Longit ud (pb)	Organime més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% similit ud	Grup filogenètic	Família
		P1 D8	P1 D14	P2D 8	P2D 14	P3 D8	P3 D14	P4 D8	P4D 14					
A1	A7	X	X	X	X	X	X	X	X	440	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
A3		X		X	X	X	X	X	X	526	<i>Curvibacter</i> sp. HJ-DR1 (JQ665447)	96%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
A4				X	X	X	X	X	X	486	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
A5				X	X	X	X	X	X	475	<i>Aquabacterium citratiphilum</i> (NR024871)	96%	β -proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis
A6				X	X	X	X	X	X	487	<i>Sphingomonas</i> sp. (GU596951)	96	α -proteobacteria	Sphingomonada-ceae
A7	A1	X	X	X	X	X	X	X	X	522	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009). α, β i γ representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament.

Les seqüències obtingudes s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC8873408 a KC887413.

**Taula 8.7.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades

Ban- da	Detecció								Lon (pb)	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% sim <sup>a</sup>	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>
	P1 8	P1 14	P2 8	P2 14	P3 8	P3 14	P4 8	P4 14					
C3	X	X	X	X	X	X	X	X	516	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
C4	X	X	X	X	X	X			492	<i>Sphingopyxis chilensis</i> (JQ342870)	100%	α-proteobacteria	Sphingomonadaceae
C5	X	X	X	X	X	X	X	X	492	<i>Sphingomonas</i> sp. enrichment culture (GU596951)	99%	α-proteobacteria	Sphingomonadaceae
C7	X	X	X	X	X	X	X		516	<i>Aquabacterium citratiphilum</i> (NR024871)	100%	β -proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis
C8	X	X	X	X	X	X	X	X	514	<i>Arenimonas malthae</i> (NR043670)	100%	γ-proteobacteria	Xanthomonadaceae
C11	X	X	X	X		X			451	<i>Acidovorax</i> sp. KKS102 (CP003872)	98%	β -proteobacteria	Comamonadaceae
C12	X	X	X	X	X	X	X	X	498	<i>Novosphingobium</i> <i>subterraneum</i> ( <i>Sphingomonas subterranea</i> ) (AB681046)	99%	α-proteobacteria	Sphingomonadaceae
C13	X	X	X	X	X	X	X		513	<i>Aquabacterium citratiphilum</i> (NR024871)	99%	β -proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis
C15	X	X	X	X	X	X	X	X	515	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	β -proteobacteria	Comamonadaceae

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009). α, β i γ representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament.

Les seqüències obtingudes s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC8873414 a KC887422.

En el cas de la columna 3, *Acidovorax* és també el gènere més destacat en la colonització de la columna, trobant-se amb gran intensitat de banda en tots els punts, tant el dia 8 com el dia 14. S'han identificat també altres gèneres, principalment de la família Sphingomonadaceae, com serien *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* i *Novosphingobium*. És destacable la major diversitat en els punts centrals, tant el dia 8 com el dia 14, i la gran similitud entre patrons de bandeig.

**Taula 8.8.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades

Ban- da	Detecció								Lon (pb)	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% sim <sup>a</sup>	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>
	P1 D8	P1 D14	P2 D8	P2 D14	P3 D8	P3 D14	P4 D8	P4 D14					
D1	X	X	X	X	X	X	X	X	494	<i>Bacillus subterraneus</i> (JQ684234)	97%	Firmicutes	Bacillales[96%] Bacillaceae 1[46%]
D2	X	X	X	X	X	X	X	X	518	uncultured <i>Leifsonia</i> sp. (EU375203)	93%	Actinobacteria	Microbacteriaceae
D3					X	X	X	X	496	<i>Microbacterium</i> <i>pygmaeum</i> (FR682684)	100%	Actinobacteria	Microbacteriaceae
D5					X	X			486	<i>Sphingobium</i> sp. C22(2011) (JN224965)	97%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae
D6			X	X					517	<i>Acidovorax</i> sp. enrichment culture clone KWE55-19 (JQ670734)	100%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
D7 =D8	X	X	X	X	X	X	X	X	515	<i>Acidovorax soli</i> (JQ689195)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
D9					X	X			492	<i>Sphingomonas</i> sp. F15 (EU072021)	100%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae
D10							X	X	521	uncultured bacterium (JF697495)	92%	$\beta$ -proteobacteria	Comamonadaceae
D11					X	X	X	X	495	uncultured <i>Methyloversatilis</i> sp. (HE798202)	98%	$\beta$ -proteobacteria	Methylophilaceae
D12					X	X			450	<i>Brevundimonas nasdae</i>	100%	$\alpha$ -proteobacteria	Caulobacteraceae

Columnnes de sòl

(KC128911)													
D13				X	X	X	X	489	<i>Sphingomonas</i> sp. (GU596951)	97%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae	
D14	X	X	X	X	X	X	X	X					
D15	X	X	X	X	X	X	X	X	483	<i>Massilia</i> sp. THGR28 (JF799817)	98%	$\beta$ -proteobacteria	Oxalobacteraceae
D16				X	X	X	X	518	<i>Methylophilus</i> <i>methylophilus</i> (NR041257)	98%	$\beta$ -proteobacteria	Methylophilaceae	
D17	X	X						496	<i>Bacillus</i> sp. JAEA No. 3- 2 (AB437410)	95%	Firmicutes	Bacillaceae 2[61%]	

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009).  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament. Les seqüències obtingudes s'han dipositat a la base de dades GenBank amb els *accession numbers* KC8873423 a KC887437.



# Capítol 9

Caracterització microbiològica de les aigües subterrànies i diferents estratègies de bioremediació mitjançant la combinació de tècniques de cultiu, DGGE i *bar-coded* pirosequenciació.





La microbiota autòctona ambiental és el motor que dirigeix el procés de bioremediació en un emplaçament contaminat: la composició i activitat de la comunitat microbiana determina doncs la funcionalitat de la biodegradació (Rittmann, Hausner et al. 2006). S'han dut a terme diversos estudis sobre l'impacte de la presència de contaminants sobre les comunitats microbianes, encara que la major part d'aquests ofereixen conclusions basades en experiments realitzats a curt termini, de contaminació recent o en matrius dopades, que podrien no ser representatives de les comunitats existents *in situ* en un emplaçament amb contaminació històrica d'origen industrial. Es té doncs poca informació sobre la diversitat i la dinàmica de les comunitats microbianes durant processos de bioestimulació en emplaçaments afectats per contaminacions històriques (Singleton, Richardson et al. 2011).

### Objectius

L'objectiu d'aquest capítol es estudiar les poblacions microbianes presents *in situ* mitjançant l'ús d'un ampli ventall d'aproximacions metodològiques, tant per a la presa de mostra com pel que fa als mètodes per a caracteritzar les comunitats microbianes. D'altra banda, per avaluar la resposta de les poblacions microbianes a les estratègies de bioestimulació considerades, s'ha aplicat noves aproximacions per a caracteritzar les poblacions al punt final de la biodegradació *in vitro* descrita amb anterioritat (capítol 6).

Finalment, es pretén fer una comparació entre les diverses tècniques emprades (aïllament, DGGE, BioSeps i DGGE i piroseqüenciació), i identificar les variacions que presenten, tan pel que fa a l'estructura com al nombre de microorganismes

### 9.1. Aïllament de microorganismes

En l'aïllament de poblacions a partir de les mostres d'aigua contaminada per LABs s'ha considerat tant les poblacions de creixement ràpid (tres setmanes d'incubació de la placa abans d'aïllar microorganismes), com les de creixement lent (tres mesos d'incubació). Els resultats es poden observar a les taules 9.1 i 9.2.

**Taula 9.1.** Microorganismes identificats per aïllament en temps curt (tres setmanes d'incubació).

Núm <sup>a</sup>	Longitud (pb)	Accession no.	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% sim <sup>b</sup>	Grup filogenètic <sup>c</sup>	Família <sup>c</sup>
1	500	KC887438	<i>Bacillus cereus</i> (GU904693)	100%	Firmicutes	Bacillaceae
2	509	KC887439 KC887440	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (GU586317)	99%	γ-proteobacteria	Pseudomonadaceae
1	472	KC887441	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (GU384224)	98%	γ-proteobacteria	Pseudomonadaceae
1	513	KC887442	<i>Pseudomonas</i> sp. PH1 (AF065166)	98%	γ-proteobacteria	Pseudomonadaceae
2	507	KC887443 KC887444	<i>Pseudomonas</i> sp. 2N1-1 (AJ419674)	99%	γ-proteobacteria	Pseudomonadaceae

## Caracterització microbiològica

6	511	KC887445 - KC887450	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> (EF620457)	100%	$\gamma$ -proteobacteria	Pseudomonadaceae
1	501	KC887451	<i>Shewanella</i> sp. IST-21 (FM877977)	99%	$\gamma$ -proteobacteria	Shewanellaceae
1	477	KC887452	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (FN397900)	99%	$\gamma$ proteobacteria	Pseudomonadaceae
1	506	KC887453	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU827544)	99%	$\gamma$ -proteobacteria	Pseudomonadaceae
2	515	KC887454 KC887455	<i>Burkholderia xenovorans</i> (EF139188)	99%	$\beta$ -proteobacteria	Burkholderiaceae

<sup>a</sup> Nombre de soques aïllades amb morfologia diferent i seqüència idèntica (>97% de similitud)

<sup>b</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>c</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009).  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament.

Per tal de determinar si el creixement de les soques ha estat a expenses dels LABs, usant-los com a font de carboni i energia, s'ha comprovat que les soques no creixien en medi mineral sense font de carboni. Les soques s'han ressebrat en medi ric, ja que al ser ressebrades la majoria no han pogut créixer a expenses dels LABs. Aquest fenomen pot ser causat per diversos factors: d'una banda és probable els microorganismes aïllats requereixin la presència d'un consorci microbià per créixer usant els LABs com a font de carboni, en cas que podessin créixer només sobre metabòlits de degradació parcial de LABs. D'altra banda, és possible que els microorganismes puguin perdre la capacitat degradadora d'una manera espontània al créixer en un medi ric. En aquest cas la capacitat inicial de degradar els LABs vindria codificada en gens ubicats en plasmidis els quals es podrien perdre en medi ric (Rusansky, Avigad et al. 1987).

**Taula 9.2.** Microorganismes identificats per aïllament en temps llarg (tres mesos d'incubació).

Núm	Longitud (pb)	Accession no.	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% similitud <sup>b</sup>	Grup filogenètic <sup>c</sup>	Família <sup>c</sup>
2	476	KC786250 KC786251	<i>Ochrobactrum</i> sp. (JQ994365)	100%	$\alpha$ -proteobacteria	Brucellaceae
1	468	KC786252	<i>Paracoccus</i> sp. (EU374897)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Rhodobacteraceae
1	473	KC786253	<i>Bosea minatitlanensis</i> (NR028787)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Bradyrhizobiaceae
1	472	KC786254	<i>Caulobacter segnis</i> (CP002008)	99%	$\alpha$ -proteobacteria	Caulobacteraceae
1	478	KC786255	<i>Oleomonas sagaranensis</i> (D45202)	96%	$\alpha$ -proteobacteria	Rhodospirillaceae
2	472	KC786256 KC786257	<i>Sphingobium</i> sp. (FN293045)	100%	$\alpha$ -proteobacteria	Sphingomonadaceae
1	469	KC786258	uncultured	99%	$\alpha$ -proteobacteria	$\alpha$ -

## Caracterització microbiològica

			bacterium (EU275400)			proteobacteria incertae sedis
7	503	KC786259- KC786265	<i>Cupriavidus necator (Ralstonia eutropha)</i> (AF501357)	99%	β-proteobacteria	Burkholderia- ceae
2	501	KC786266 KC786267	<i>Bacillus cereus</i> (HQ286640)	100%	Firmicutes	Bacillaceae
1	481	KC786268	<i>Brevibacterium casei</i> (HMO12705)	99%	Actinobacteria	Brevibacteria- ceae
1	496	KC786269	<i>Microbacterium terricola</i> (JN084156)	96%	Actinobacteria	Microbacteria- ceae
1	480	KC786270	<i>Williamsia muralis</i> (AM409316)	99%	Actinobacteria	Nocardiaceae

<sup>a</sup> Nombre de soques aïllades amb morfologia diferent i seqüència idèntica (>97% de similitud)

<sup>b</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>c</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009). α, β, γ i δ representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament.

Es pot observar una clara diferència entre els tipus de microorganismes detectats en els dos períodes d'incubació considerats.

Els microorganismes que han estat capaços de créixer en menys temps formen part majoritàriament (83%) de la classe *γ-proteobacteria*. La major concentració de nutrients i font de carboni a les plaques ha afavorit la proliferació de microorganismes de creixement ràpid, com *Pseudomonas*, gènere completament dominant entre els microorganismes de creixement ràpid.

El gènere *Pseudomonas* inclou espècies amb funcions de gran importància en camps tan diversos com la salut, la biotecnologia i l'ecologia (Widmer, Seidler et al. 1998). Una propietat interessant d'aquest gènere és la seva versatilitat metabòlica, fet que ha fet que es consideri un dels gèneres més descrits en els processos de bioremediació.

Diversos estudis han descrit el potencial de *Pseudomonas* per degradar gran varietat d'hidrocarburs (Haigler, Pettigrew et al. 1992, Guerin, Boyd 1995, Johnsen, Andersen et al. 1996, Grimberg, Stringfellow et al. 1996), incloent LABs (Bayona, Albaigés et al. 1986). *Pseudomonas* també és un gènere descrit com a productor de biosurfactants, especialment *Pseudomonas aeruginosa*, productora de ramnolípid, un dels biosurfactants més comuns. A més de membres d'aquest gènere, en el present estudi s'han identificat diversos aïllats amb gran similitud (99%) amb els gèneres *Burkholderia xenovorans* i *Shewanella*. És important destacar que a la literatura s'han descrit membres del gènere *Burkholderia* lligats a processos de degradació d'hidrocarburs aromàtics i de mescles d'hidrocarburs (Bacosa, Suto et al. 2012). *Shewanella* és un gènere dins el qual s'han descrit soques hidrocarbonoclàstiques (Gentile, Bonasera et al. 2003), i relacionat amb la reducció del ferro i dels nitrats (Blothe, Roden 2009, Yoon, Sanford et al. 2013).

Per poder identificar altres gèneres s'ha hagut d'incubar les plaques durant deu setmanes per permetre als microorganismes de creixement lent formar colònies visibles.

Entre aquests es pot apreciar molta més diversitat, incloent membres de  $\alpha$  i  $\beta$ -*proteobacteria*, així com *Actinobacteria* i *Firmicutes*. Aquests grups són considerats estesos en sòls. És també destacable la coincidència amb seqüències detectades anteriorment (capítol 7), com *Cupriavidus* i *Caulobacter*.

*Cupriavidus*, majoritari entre els aïllats a llarg termini, i *Caulobacter*, són gèneres microbians coneguts per la seva capacitat en la degradació de xenobiòtics. *Cupriavidus* és un gènere relacionat amb freqüència amb la biodegradació d'hidrocarburs i els seus metabòlits (Bacosa, Suto et al. 2010, Bacosa, Suto et al. 2012, Ivanova, Borzenkov et al. 2012) així com compostos cloroaromàtics (halobenzoats, clorofenols i nitrofenols) (Pérez-Pantoja, De la Iglesia et al. 2008). *Caulobacter* ha estat descrit com a degradador d'hidrocarburs (van Beilen, Funhoff et al. 2006).

D'altra banda també s'ha aïllat soques pertanyents al gènere *Bosea*. *Bosea* ha estat isolada de sòls contaminats amb hidrocarburs (Ruggeri, Franzetti et al. 2009).

*Bacillus*, gènere detectat tant en els aïllats de creixement lent com en els de creixement ràpid, és un microorganisme també relacionat amb la degradació d'hidrocarburs, sobretot PAHs (Samanta, Singh et al. 2002)

És destacable que gran part dels microorganismes aïllats formen part de gèneres descrits com a productors de biosurfactants, com *Bacillus* (Samanta, Singh et al. 2002, Bento, Camargo et al. 2005), *Cupriavidus* (Ruggeri, Franzetti et al. 2009), *Bosea* (Ruggeri, Franzetti et al. 2009) i *Ochrobactrum* (Calvo, Silva-Castro et al. 2008). Atès que un dels principals inconvenients a l'hora de degradar els LABs és la baixa solubilitat d'aquests, la producció de biosurfactants és un element clau per la bioremediació, incrementant potencialment la biodisponibilitat dels LABs i permetent l'acceleració dels processos de degradació. La presència de microorganismes descrits com a productors de biosurfactants i com a degradadors d'hidrocarburs en els aïllaments a partir de l'aigua subterrània mostren la capacitat degradadora de la microbiota.

D'altra banda, la capacitat de créixer en condicions desnitrificants ha estat reportada en diversos dels gèneres detectats, com *Bacillus* (Verbaendert, Boon et al. 2011) i *Cupriavidus*, gènere relativament nou format per acomodar membres atípics del gènere *Alcaligenes*, que alberga membres reconeguts com bacteris desnitrificants dominants en sòls (Gamble, Betlach et al. 1977). Diverses soques d'*Ochrobactrum* i de *Pseudomonas* s'han descrit també com a desnitrificants (Heylen, Gevers et al. 2006).

No obstant, cal considerar que la capacitat degradadora d'hidrocarburs, desnitrificant o productora de surfactants reportada en membres dels gèneres detectats no implica que les soques aïllades tinguin aquestes capacitats, sinó que potencialment les podrien tenir. Caldria testar aquestes capacitats *in vitro*, simulant de la forma més fidel possible les condicions ambientals de l'aqüífer per a poder afirmar-ho amb seguretat.

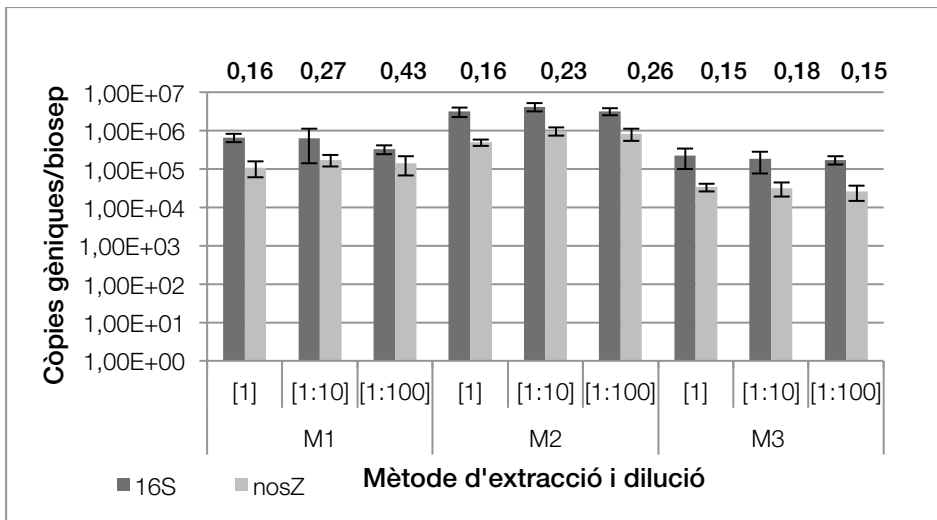
**Figura 9.1.** Imatge dels BioSeps i el BioTrap



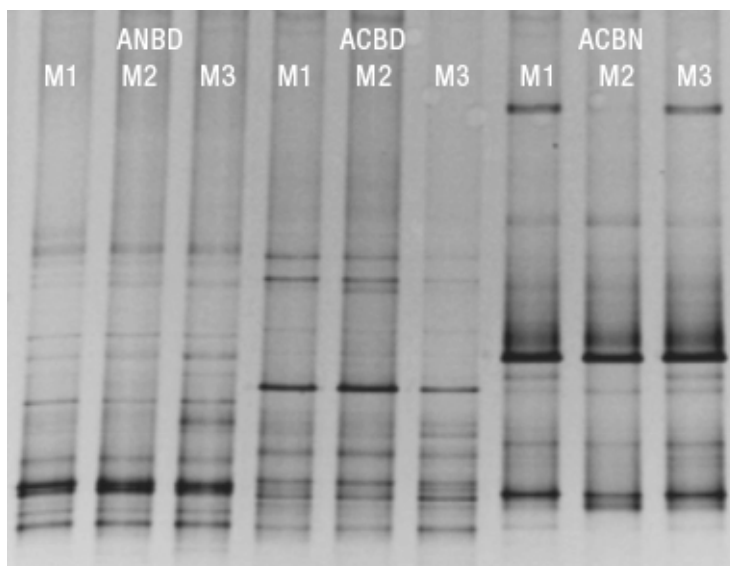
**9.2. Anàlisi de les poblacions microbianes en perles BioSep**

**9.2.1. Avaluació de diferents mètodes d'extracció de DNA en BioSeps**

S'ha avaluat i comparat l'efectivitat d'extracció de biomassa de cada mètode per mètodes quantitius (qPCR de còpies gèniques de 16S rRNA i el gen *nosZ*) (figura 9.2.) i qualitius (perfils de població gènica de 16SrRNA per DGGE) (figura 9.3).



**Figura 9.2.** Còpies gèniques (16S rRNA i *nosZ*) per BioSep en diferents mètodes d'extracció de DNA (M1, M2, M3) i diferents dilucions del DNA motlle considerades. El nombre mostrat a la part superior de les barres és la ràtio *nosZ*/16S. Les barres representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents.



**Figura 9.3.** Perfils de DGGE (amplicons de gens 16SrRNA en un gradient 40 - 80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 dels gens *16S rRNA* de les mostres extretes amb els diferents mètodes (M1, M2 i M3) dels BioTraps incubats en l'aigua subterrània. AN: aigua no contaminada, AC: aigua contaminada, BD: BioSep dopat, BN: BioSep no dopat. Cada carril representa una de les tres rèpliques independents.

L'anàlisi per DGGE dels extractes de DNA obtinguts a partir dels BioSeps mostra perfils amb elevada similitud. Aquesta similitud entre les mostres extretes amb els diversos mètodes avaluats indica que no es produeixen canvis a nivell estructural en funció del mètode emprat. Si que s'observen diferències en la quantitat total de biomassa recuperada (còpies 16S rRNA), essent el mètode M2 el més efectiu a l'hora d'extreure el DNA. Cap dels mètodes va mostrar diferències significatives en dependència de la concentració.

En resum, els resultats obtinguts permeten afirmar que es produeix un enriquiment de biomassa en els BioSeps, permetent obtenir majors quantitats de microorganismes, presumiblement metabòlicament actius, que per processos de mostreig actiu o filtrat de l'aigua de l'aquífer

## 9.2.2. Caracterització de la població microbiana

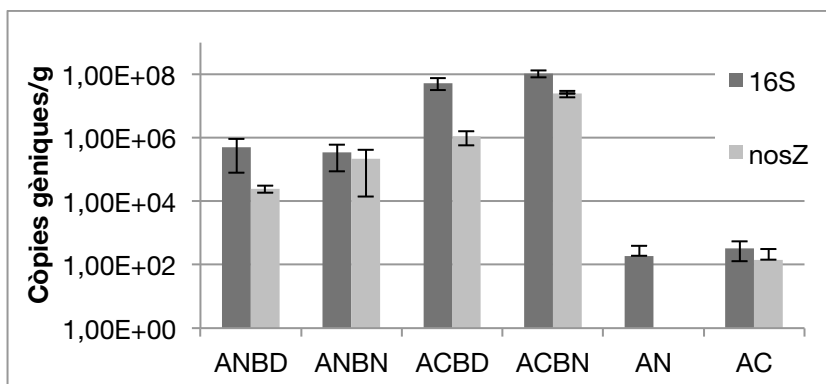
### 9.2.2.1. Quantificació de població total i gens funcionals

El nombre de còpies gèniques per als gens 16S rRNA i *nosZ* es mostra a la figura 9.4. La població gènica de 16S rRNA presenta grans variacions quantitatives entre mostres. En primer lloc, es pot observar clarament que les mostres d'aigua subterrània presenten menys quantitat de DNA que les mostres de BioSeps (figura 9.4.). Tot i que el paràmetre de mesura de concentració és diferent (còpies/ml aigua respecte còpies/g BioSep), aquest fet mostra la major efectivitat a l'hora de col·lectar biomassa representativa de l'emplaçament. Per tal de recol·lectar una quantitat de biomassa equivalent a la recollida amb els BioSep, caldria un volum d'aigua equivalent de 50 ml d'aigua per perla en el cas de l'aigua no contaminada, i uns 1000mL en el cas de l'aigua amb LABs. Es confirma la capacitat de la biomassa per a crear biofilms als

BioSeps amb dependència de la quantitat de font de carboni disponible a l'aigua subterrània.

Les mostres provinents de BioSep incubats en aigües contaminades contenen unes  $10^7$  còpies gèniques de 16S rRNA/BioSep, mentre que les mostres provinents de BioSep incubats en l'aigua neta contenen unes  $10^4$  còpies 16S rRNA/BioSep. Aquest fet es pot associar amb la major quantitat de font de carboni aportada pel contaminant. D'altra banda, és destacable l'adaptació de la microbiota autòctona a l'hora de créixer en presència d'altres concentracions de LABs, com demostra la formació de biofilm en els BioSep dopats amb LABs incubats en aigua neta.

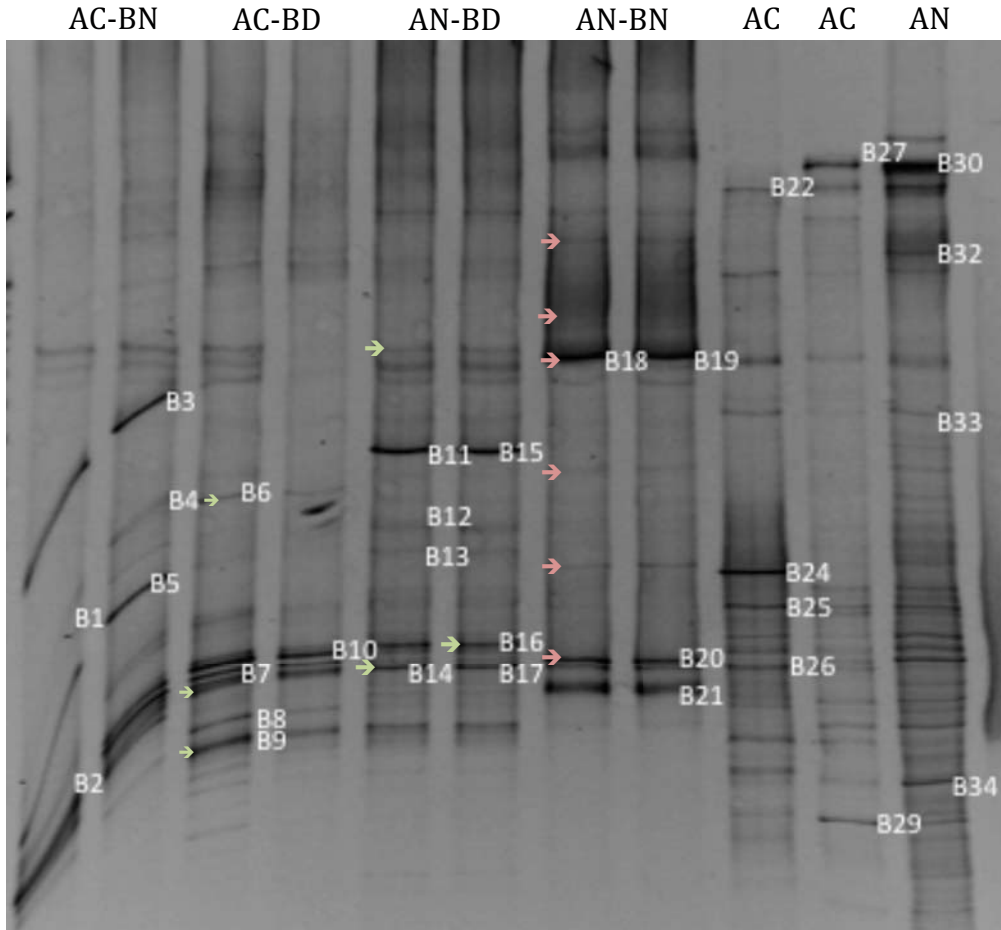
D'altra banda, s'ha de destacar el comportament del gen *nosZ*. Aquest gen codifica per l'òxid nítrós reductasa, i està relacionat amb l'últim pas del procés de desnitrificació, transformant el  $N_2O$  a  $N_2$ . *nosZ* presenta valors més elevats en les mostres trobades al les aigües contaminades, fet que indicaria la major prevalença de la capacitat de desnitrificació en aquestes aigües, coherentment amb les dades obtingudes al capítol 6. En cas que s'estigués produint una atenuació natural *in situ*, el consum d'oxigen seria major en les àrees contaminades, i menaria a l'esgotament d'aquest i l'ús d'altres acceptors d'electrons, com els nitrats. No obstant, aquest gen s'observa proporcionalment en major abundància en els BioSep no dopats. Aquest fet indueix a pensar que part dels microorganismes desnitrificants estarien més relacionats amb la degradació d'altres compostos orgànics (podent ser metabòlits de degradació parcial de LABs o altres compostos orgànics solubles presents a l'aigua subterrània), que en els passos inicials de la transformació dels LABs. Tot i això, s'ha de tenir en compte que el gen *nosZ* codifica per a l'últim pas de la desnitrificació (òxid nítrós reductasa), i no dóna informació sobre transformacions prèvies. Així doncs no seria descartable que altres microorganismes desnitrificants poguessin estar implicats en la degradació de LABs mitjançant processos de desnitrificació parcial amb la implicació de gens com *narG* (nitrat reductasa), *nirK* i *nirS* (nitrit reductasa), essent desnitrificants parcials.



**Figura 9.4.** Còpies gèniques per gram de BioSep o mil·lilitre d'aigua dels gens: 16S rRNA i *nosZ*. El pes mitjà dels BioSep es de 0,04 g per unitat. AN: aigua no contaminada, AC: aigua contaminada, BD: BioSep dopat, BN: BioSep no dopat. Les barres representen la desviació estàndard de tres rèpliques independents.

**9.2.2.2. Estructura de la comunitat microbiana**

L'estructura de la comunitat microbiana al final de la incubació *in situ* dels BioSeps caracteritzada per DGGE es mostra a la figura 9.5. En els perfils dels gens 16S rRNA de les mostres s'han escindit 34 bandes diferents, tenint en compte criteris d'intensitat, repetibilitat i representativitat. La identitat filogenètica de les bandes que no s'ha pogut obtenir directament s'ha assignat basant-se en el patró de migració de bandes d'altres punts del mateix tractament. Els amplicons seqüenciats han estat en tots els casos de més de 475 parells de bases (taula 9.3.), i han comprès tres regions hipervariables del gen 16s rRNA, com en els anàlisis mostrats en capítols previs.



**Figura 9.5.** Perfils de DGGE 16SrRNA (40 -80% desnaturalitzant) de les regions hipervariables V3-V5 del gen 16S rRNA procedents dels biofilms creats a cada BioTrap i de les mostres d'aigua subterrània (AN: aigua neta, AC: aigua contaminada, BD: BioSep dopat, BN: BioSep no dopat).



Caracterització microbiològica

**Taula 9.3.** Propietats de les bandes de DGGE seqüenciades.

Banda	Carrils						Lon- gitud (bp)	Organisme més proper (accession no.) <sup>a</sup>	% sim	Grup filogenètic <sup>b</sup>	Família <sup>b</sup>
	AC BN	AC BD	AN BD	AN BN	AC	AN					
B1 =B5	X						504	<i>Delftia tsuruhatensis</i> (HQ731453)	99%	β-proteobacteria	Comamonadaceae
B2	X	X			X	X	479	<i>Aminobacter</i> sp. (EU304289)	99%	α-proteobacteria	Phyllobacteriaceae
B3	X						510	<i>Methylovorus glucosotrophus</i> (AY486133)	95%	β-proteobacteria	Methylophilaceae
B4	X			X		X	508	Uncultured bacterium (AB205728)	99%	β-proteobacteria	Methylophilaceae [67%]
B7	X	X	X				523	<i>Dechloromonas</i> sp. (AY124797)	97%	β-proteobacteria	Dechloromonas
B8		X		X	X	X	511	Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. (DQ234213)	98%	β-proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis
B9		X	X				505	<i>Aquabacterium parvum</i> (NR_024874)	100%	β-proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis
B10	X	X	X				508	<i>Paucibacter toxinivorans</i> (AY515384)	96%	β-proteobacteria	Burkholderiales incertae sedis
B11			X				510	Uncultured bacterium (AB205728)	100%	β-proteobacteria	Methylophilaceae [53%]
B12			X				499	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ (CP001157)	99%	γ-proteobacteria	Pseudomonadaceae
B13			X				488	Uncultured <i>Mycobacterium</i> sp. (AM934740)	99%	Actinobacteria	Mycobacteriaceae
B14			X	X			498	<i>Methylophilus</i> sp. (FJ391507)	97%	β-proteobacteria	Methylophilaceae
B15			X				510	Uncultured bacterium (AB205728)	100%	β-proteobacteria	Methylophilaceae [53%]
B16			X		X	X	481	<i>Massilia timonae</i> (HQ238347)	98%	β-proteobacteria	Oxalobacteraceae

Caracterització microbiològica

B17	X	X	X	X	499	<i>Hydrogenophaga</i> sp. (FJ711213)	98%	β-proteobacteria	Comamonadaceae
B19=B 18	X	X	X	X	507	Uncultured <i>Methylobacillus</i> sp. (AM936266)	99%	β-proteobacteria	Methylophilaceae
B20		X			452	<i>Marinifilum fragile</i> (FJ394546)	98%	Bacteroidetes	Bacteroidetes"_incertae _sedis
B21		X			501	<i>Aminobacter</i> sp. (AB552884)	100%	α-proteobacteria	Phyllobacteriaceae
B22			X	X	440	<i>Chryseobacterium</i> sp. (HQ331141)	95%	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae
B24			X		515	<i>Burkholderia xenovorans</i> (EF139188)	98%	β-proteobacteria	Burkholderiaceae
B25			X		493	Uncultured Burkholderiales bacterium (EU642240)	99%	β-proteobacteria	Comamonadaceae [62%]
B26			X	X	497	<i>Dechloromonas</i> sp. (AY124797)	99%	β-proteobacteria	Rhodocyclaceae
B27			X	X	516	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. (FJ946537)	98%	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae
B29			X	X	499	<i>Mycobacterium</i> sp. (FJ772065)	99%	Actinobacteria	Mycobacteriaceae
B30			X	X	499	Flavobacteriaceae bacterium (AM292405)	98%	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae
B32				X	497	<i>Marinifilum fragile</i> (FJ394546)	96%	Bacteroidetes	Bacteroidetes"_incertae _sedis
B33			X	X	495	Uncultured <i>Acidovorax</i> sp. (HQ857618)	98%	β-proteobacteria	Comamonadaceae
B34			X	X	524	Uncultured Desulfuromonadales bacterium (AM935554)	97%	δ -proteobacteria	Desulfohalobiaceae

<sup>a</sup> Organisme més proper a la base de dades GenBank.

<sup>b</sup> Classificació segons Ribosomal Database Project (Maidak, Cole et al. 2000, Cole, Chai et al. 2005, Cole, Wang et al. 2009). α, β, γ i δ representen alfa, beta i gamma proteobacteria, respectivament

Els biofilms formats als BioSeps presenten perfils diferenciats, on es pot apreciar els canvis en la predominança dels microorganismes en les diferents situacions experimentals. Els carrils corresponents a l'aigua subterrània presenten una major diversitat i homogeneïtat, però el gel no té prou resolució per desxifrar similituds i diferències en les estructures poblacionals dels perfils d'aigua amb LABs (AC) i sense LABs (AN).

En aquests carrils existeix una diversitat massa gran per ser analitzada per aquesta tècnica. Els carrils corresponents a mostres obtingudes als BioSeps (ANBN, ANBD, ACBN, ACBD) presenten una menor diversitat, mostrant amb més claredat les poblacions microbianes més actives. Es compleix doncs la previsió d'obtenir un menor nombre de bandes amb intensitats presumiblement relacionades amb l'activitat dels microorganismes.

S'ha identificat microorganismes pertanyents als grups filogenètics  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  *proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*.

En els BioSeps, contràriament a les poblacions cultivables, *Proteobacteria* es troba dominant per *B-proteobacteria* en les mostres d'aigua amb i sense LABs. En canvi, en les mostres procedents de la bioestimulació predomina la classe  $\alpha$ -*proteobacteria*, sobretot sota condicions desnitrificants.

Destaca la gran presència de la família *Methylophilaceae* (B3, B4, B11, B14, B15, B18, B19). Dins aquesta família, es troben seqüències similars als gèneres *Methylobacillus*, *Methylophilus* i *Methilovorus* (95%), tots ells de metabolisme metilotròfic per a la utilització de compostos orgànics simples. En segon lloc, és destacable la presència d'*Aminobacter* ( $\alpha$ -*proteobacteria*) en totes les situacions experimentals estudiades.

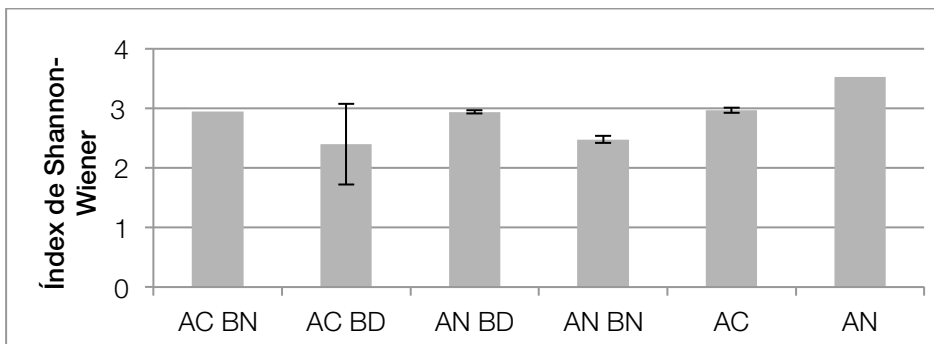
Entre els microorganismes detectats en part dels carrils, es pot observar dos grups de poblacions microbianes clarament diferenciades: d'una banda, les poblacions relacionades amb l'aigua subterrània no contaminada, que es detecten tant a l'aigua sense contaminar com als BioSeps sense dopar, com serien *Hydrogenophaga* o *Methylobacillus* ( $\beta$ -*proteobacteria*). D'altra banda, els microorganismes que podríem relacionar amb la contaminació per LABs, que es troben en l'aigua contaminada i els BioSeps dopats (inclòs els dopats i submergits en l'aigua neta). Dins d'aquest grup s'ha de destacar la presència de *Dechloromonas* i *Paucibacter* ( $\beta$ -*proteobacteria*). *Dechloromonas* ha estat relacionat amb la degradació de BTEX i compostos monoaromàtics, mineralitzant-los completament, en condicions tant aeròbies com anaeròbies (Coates, Chakraborty et al. 2001, Chakraborty, O'Connor et al. 2005). *Paucibacter* no ha estat relacionat amb la degradació d'hidrocarburs, però s'ha reportat com a degradadora de microcistines, pèptids d'estructura complexa contenint un anell aromàtic (Jimbo, Okano et al. 2010, Rapala, Berg et al. 2005).

S'han identificat també diversos membres del grup Burkholderiaceae, relacionats amb la degradació, com *Burkholderia xenovorans* o *Aquabacterium*. *Aquabacterium* forma biofilms amb facilitat, i s'ha detectat en sistemes de canalització d'aigües (Kalmbach, Manz et al. 1999). Tot i que membres d'aquest gènere han estat descrits com a degradadors d'hidrocarburs (Mikkonen, Lappi et al. 2011, Aburto-Medina, Adetutu et al. 2012), la banda s'ha detectat tant en les mostres en contacte i sense contacte amb els LABs. Així doncs, és un gènere que no es pot associar únicament a la degradació en aquestes condicions.

Finalment, s'ha de destacar la presència d'*Acidovorax* en aigua, però no formant part dels biofilms dels BioSeps. És possible però que aquest microorganisme, amb elevada contribució als experiments del capítols 7 i 8 (oxidació química en *batch* i columna), es trobi en menor concentració en una altra alçada de migració.

### Anàlisi de la diversitat

En relació amb la diversitat microbiana, en totes les mostres l'índex de diversitat de Shannon-Wiener es troba entre 2'5 i 3, excepte la mostra corresponent a l'aigua neta, que mostra una major diversitat, arribant a un valor de 3'5 (figura 9.6.).

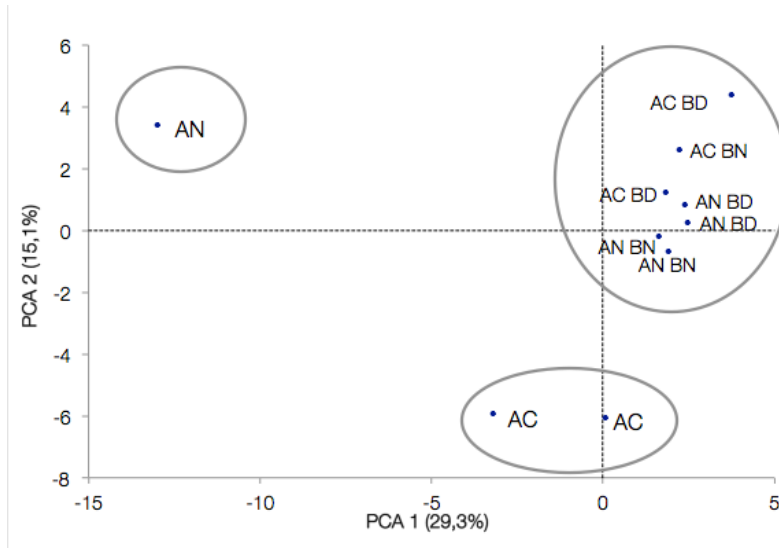


**Figura 9.6.** Índex de Shannon-Wiener ( $H'$ ) de la diversitat bacteriana estimada, basat en els perfils de DGGE de les mostres d'aigua subterrània i de biofilm format als BioSeps (AN: aigua no contaminada, AC: aigua contaminada, BD: BioSep dopat, BN: BioSep no dopat).

### Anàlisi multivariant mitjançant components principals dels perfils identificats per DGGE en aigua subterrània i BioSeps.

Tot i el clar predomini d'algunes bandes en cada tractament (B3 i B5 per ACBN, B7, B9 i B10 per ACBD; B11, B14 i B16 per a ANBD i B18, B20 i B21 per ANBN) resulta difícil analitzar les similituds entre l'estructura de la comunitat microbiana només a partir de les intensitats relatives de cada banda.

Representant les dues primeres components, que expliquen el 44'4% de la variància, es poden apreciar tres clústers diferents (figura 9.7.). Un amb les mostres d'aigua neta, el segon amb les mostres d'aigua contaminada i l'últim amb les mostres provinents dels BioSeps.

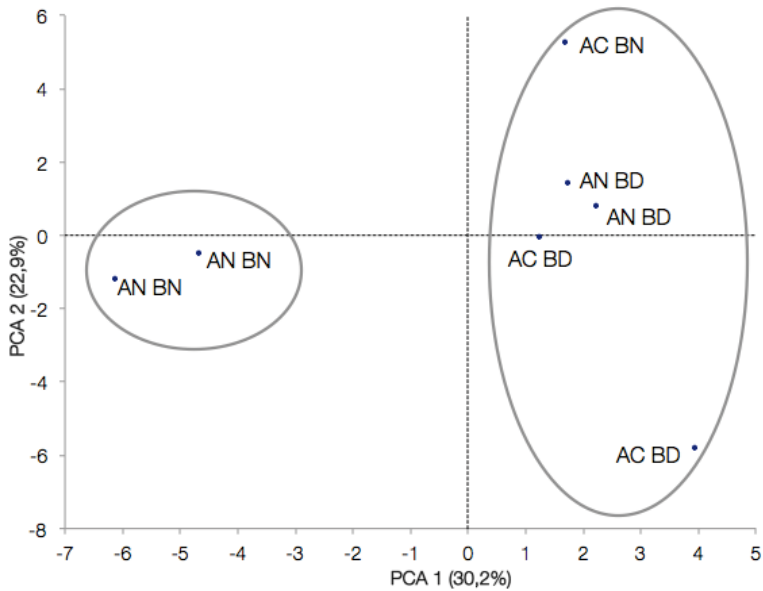


**Figura 9.7.** Anàlisi de components principals de les dues primeres variables (PC1 i PC2).

Pel que fa a la primera component (PC1), l'anàlisi de la variància ha permès detectar diferències significatives entre les mostres d'aigua neta, aigua contaminada i les mostres dels BioSeps. Aquesta component sembla estar relacionada amb les transformacions que han ocorregut en les aigües subterrànies, separant per una banda l'aigua sense LABs de la contaminada, i per l'altra diferenciant les mostres d'aigua de les de BioSep, que representen les poblacions actives.

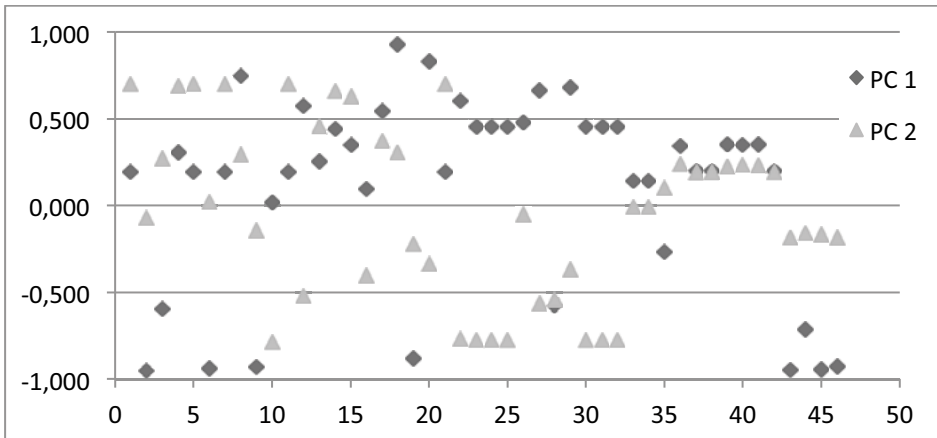
Per tal de poder apreciar les diferències entre mostres provinents dels BioSeps, s'ha dut a terme un anàlisi de components principals exclouent les mostres d'aigua. Considerant tan sols les mostres provinents de BioSeps, s'ha obtingut l'anàlisi de components principals per a la microbiota activa recollida en els BioSeps (figura 9.8.). Representant gràficament les dues primeres components, que expliquen el 30,2% i el 22,9% de la variància respectivament, s'han detectat dos clústers diferenciats. El primer, situat en valors negatius de la component 1, inclou les mostres ANBN, mentre que el segon comprèn la resta de mostres.

Per la primera component (PC1), l'anàlisi de la variància ha permès detectar diferències significatives entre les mostres en contacte i sense contacte amb els LABs. Els BioSeps que no han estat en contacte amb el contaminant, és a dir, els corresponents a BioSeps sense dopar en aigua neta es troben en valors propers a -5 per a la PCA1, mentre que les mostres relacionades amb la contaminació, és a dir, els BioSeps dopats o incubats en aigua subterrània en presència de LABs, es troben en l'interval de valors entre 0 i 5.



**Figura 9.8.** Anàlisi de components principals de les dues primeres variables (PC1 i PC2).

És important conèixer quines són les bandes que permeten explicar la variabilitat en aquesta component, ja que, en cas de contribuir-hi positivament, podrien indicar l'activitat del microorganisme en el procés de biodegradació de LABs (figura 9.9.).



**Figura 9.9.** Coeficients de cada banda en la component 1 i la component 2. La numeració de cada banda (eix X) no correspon amb la numeració de les bandes seqüenciades.

Les bandes amb més importància per a la component 1 corresponen a aquelles marcades amb una fletxa a la imatge del DGGE. Les bandes que afecten positivament a la component, és a dir, aquelles que situen el perfil de DGGE en el clúster de mostres en presència de LABs són les marcades en color verd, corresponents a bandes comunes

en els perfils d'aigua contaminada i BioSeps dopats. Entre aquestes es pot destacar la presència de B16 i B14, bandes que presenten una gran similitud amb membres dels gèneres *Methylophilus* i *Massilia*. Altres bandes que també influeixen en la PC 1, encara que en menor mesura, inclouen B4, B7 i B9, associades a un membre de la família *Methylophilaceae*, *Dechloromonas* i *Aquabacterium*, respectivament. Així doncs, els gèneres amb més significació estadística per a la component 1 son associades a gèneres descrits amb anterioritat en processos de degradació d'hidrocarburs o dels seus metabòlits.

Les bandes associades amb valors negatius de la component 1 es troben al perfil de l'aigua sense contacte amb els LABs, i inclouen les bandes B18 i B20. La seqüència de la banda B18 mostra una similitud del 98% amb un *Methylobacillus* i la seqüència de la banda B20 mostra un 98% de similitud amb una soca del gènere *Marinifilum*, un microorganisme aerobi facultatiu associat a les aigües subterrànies i sòls. Aquests gèneres es poden relacionar, en aquest cas, amb la microbiota autòctona que és desplaçada quan es produeix una contaminació per hidrocarburs. Així doncs dins de la família de les Metilofilaceae, *Methylobacillus* es trobaria relacionat amb aigües subterrània no contaminada, mentre que *Methylophilus* es pot relacionar amb ambients contaminats per LABs.

### **9.3. Anàlisi de la composició de la comunitat microbiana mitjançant piroseqüenciació**

Per tal d'obtenir informacions més precises sobre els taxons presents a les mostres, s'ha dut a terme una anàlisi mitjançant piroseqüenciació de fragments de gens 16S rRNA bacterians (regió V3-V5) tant pel que fa als taxons majoritaris com els minoritaris considerats "*rare-biodiversity*".

Després del *trimming* i filtratge de la qualitat de les lectures crues, les seqüències s'han classificat en unitats taxonòmiques operacionals (OTUs) usant un llindar de similitud del 97%. Les OTUs, d'alta qualitat i no quimèriques, representen un total de 21688 lectures, de 264 bases de mitja, distribuïdes en les cinc mostres (aigua subterrània -P12-, aigua subterrània contaminada -P15 i P16- i bioestimulació als 90 dies, tant aeròbia -AER90- com desnitrificant -DN90).

A més, s'ha elaborat anàlisis estadístics per tal d'obtenir la riquesa, diversitat i cobertura de les mostres (taula 9.4.).

#### ***Diversitat microbiana***

Les estimacions de la diversitat tipus  $\alpha$ , basades en les OTUs (definites a partir d'un 97% de similitud per a la identitat de seqüència), mostren les diferències de riquesa entre les diverses mostres. L'Índex de diversitat de Shannon i l'Índex de Chao1 mostren que s'ha reduït significativament la diversitat i la riquesa en les mostres contaminades, coherentment amb els resultats obtinguts en altres capítols. D'altra banda, tant la riquesa com la diversitat s'han reduït significativament durant la bioestimulació in vitro, mostrant valors molt per sota que les mostres obtingudes in situ (taula 9.4.).

**Taula 9.4.** Riquesa i diversitat determinades per l'estimat de Chao1 i l'índex de Shannon. NS: nombre de seqüències netes, ESC: cobertura estimada de la mostra.

Mostra	NS	OTUs	ESC	Chao1 (95% CI)	Shannon (95% CI)
P12	10183	214	0.99	3779 (3090;4969)	4,65 (4,62; 4,68)
P15	3595	292	0.96	6570 (5163; 8859)	4,53 (4,50; 4,56)
P16	3405	114	0.98	2289 (1721; 3411)	4,17 (4,14; 4,19)
AER90	477	71	0.93	1116 (879; 1685)	3,91 (3,88; 3,93)
DN 90	4028	128	0.99	1782 (1512; 2365)	3,55 (3,53; 3,57)

L'anàlisi Clúster de les llibreries obtingudes usant Mothur ha permès visualitzar les similituds i diferències entre mostres. Les OTUs s'han classificat totes dins el domini bacteria, en diversos phyla (figura 9.11).

La major part de les seqüències més abundants formen part del phyla proteobacteria, amb abundàncies relatives del 64% en l'aigua neta (P12) i entre el 84% i el 99% en l'aigua contaminada (P15 i P16) i les mostres de bioestimulació (AER i DNIT) (figura 9.10). El phylum Proteobacteria ha estat nombroses vegades identificat com el predominant en mostres de sòls i aigües subterrànies (Milton, Boucher et al. 2010, Sutton, Maphosa et al. 2013, dos Santos, Cury et al. 2011); i té un rol principal en el cicle de nutrients (Kersters, Vos et al. 2006). En altre estudis, de manera coherent amb els resultats obtinguts, s'ha detectat també l'enriquiment selectiu en proteobacteris en ambients contaminats per hidrocarburs o a continuació d'un episodi de contaminació (Juck, Charles et al. 2000, Labbé, Margesin et al. 2007, Zhang, Mörtelmaier et al. 2012), (figura 9.10). D'altra banda, s'ha detectat una correlació positiva entre el nombre de fenotips gram negatius i la contaminació dels sòls, mentre els gram positius es mantenen en quantitats similars (Margesin, Labbe et al. 2003).

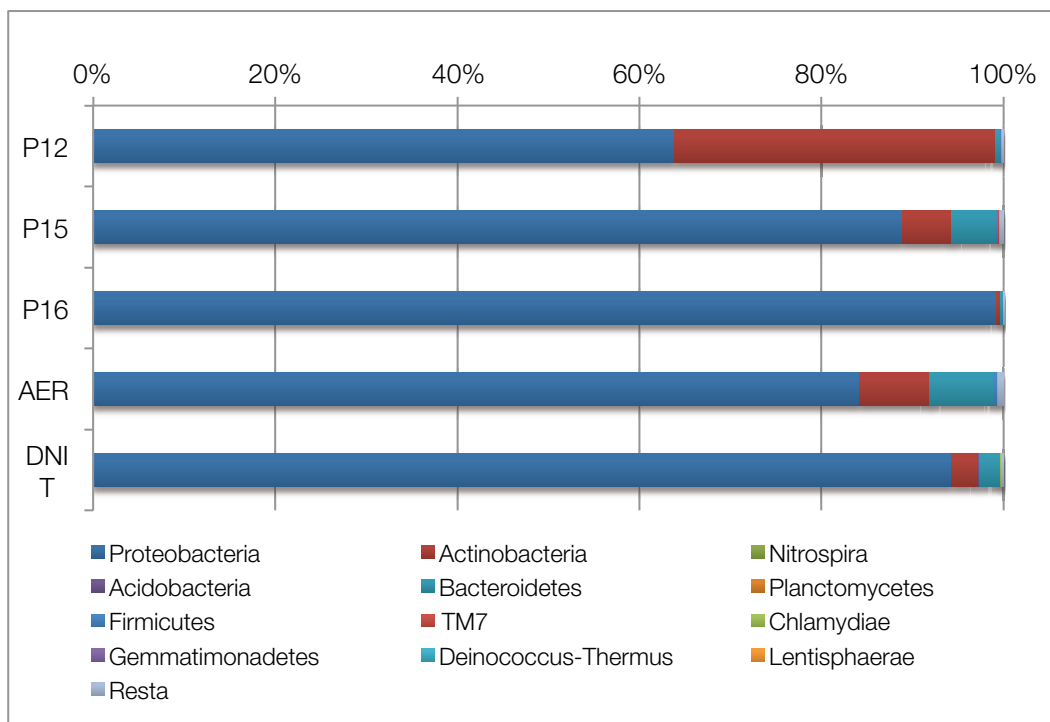
Dins el phylum proteobacteria, diversos membres de les classes  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$ -proteobacteria han estat descrits com a degradadors de compostos alifàtics i aromàtics. Els canvis en la seva abundància relativa han estat relacionats tant per la presència de contaminació per hidrocarburs com en la subseqüent bioremediació (Vinas, Sabate et al. 2005, Sutton, Maphosa et al. 2013).

En el present estudi, dins del phyla proteobacteria es troben representades les cinc classes principals de proteobacteria, principalment  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  proteobacteria (figures 9.11 i 9.12).

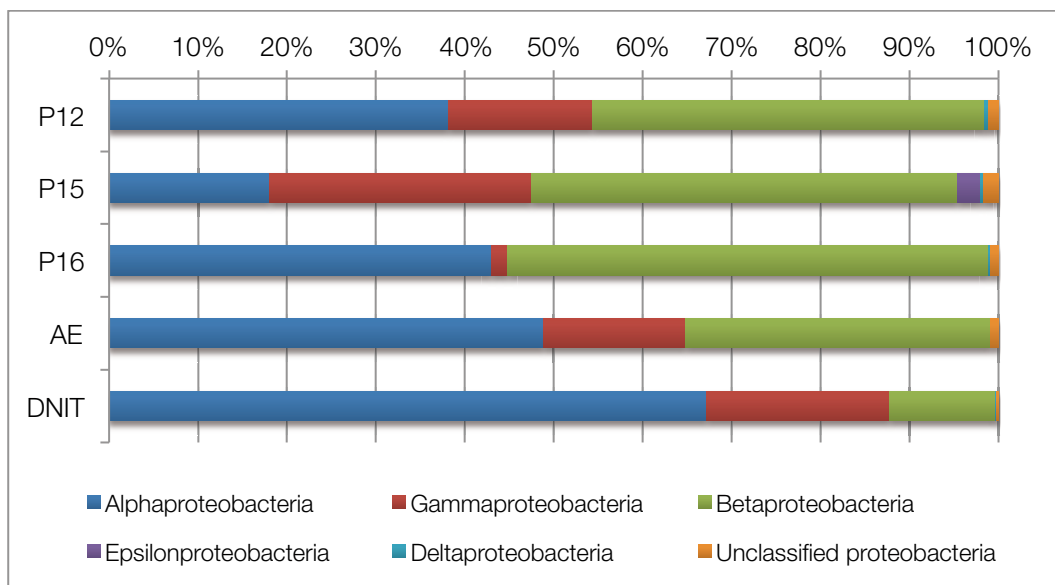
Es pot observar un increment dels  $\beta$ -proteobacteris en les mostres contaminades i de la bioestimulació, passant d'aproximadament el 65% de les seqüències de proteobacteris en la mostra P12 (corresponent a l'aigua sense contaminar) fins a més del 85% en la resta de casos.



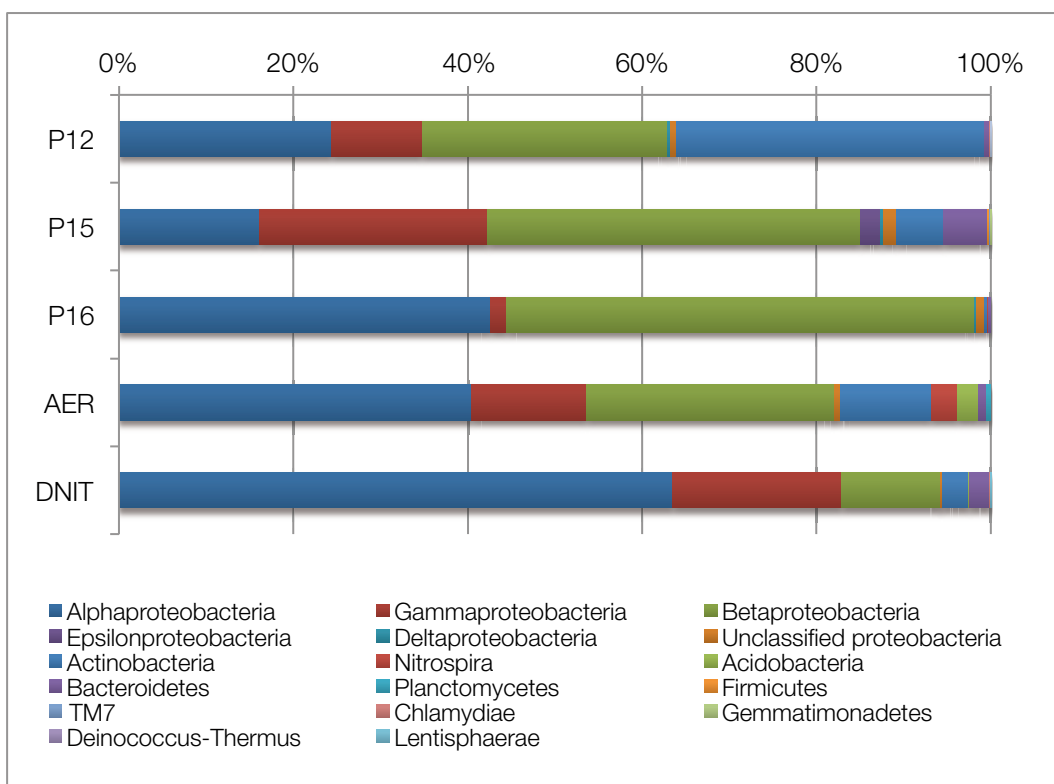
## Caracterització microbiològica



**Figura 9.10.** Abundància relativa dels phyla dominants.



**Figura 9.11.** Abundància relativa de les classes de proteobacteria



**Figura 9.12.** Abundància relativa dels phyla dominants i les classes de proteobacteria.

Tot i que una gran diversitat d'organismes han estat descrits com a degradadors d'hidrocarburs a la literatura, en el cas dels eubacteris, gairebé la totalitat de les soques degradadores descrites pertany a les classes  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$ -proteobacteria (gram negatius) i als *Actinomycetales*, un ordre de les Actinobacteria (gram positius amb alt percentatge de GC).

Les mostres P15 i P16, corresponents a l'aigua subterrània en contacte amb LABs, mostren una elevada proporció de  $\beta$ -proteobacteria (48% de mitja entre P15 i P16). La mostra P12, corresponent a l'aigua subterrània sense contacte amb els contaminants, en canvi, presenta valors similar entre  $\beta$ -proteobacteria i  $\alpha$ -proteobacteria (28% i 24% respectivament).

Totes les mostres d'aigua subterrània, especialment la P15, presenten també membres dels grups  $\delta$ -proteobacteria i  $\epsilon$ -proteobacteria, encara que de manera minoritària (2'65% a P15 i menys d'un 0'5% en les altres mostres).

Les mostres AER i DNIT, associades a processos de bioestimulació, presenten en canvi una major proporció d' $\alpha$ -proteobacteria que l'aigua subterrània, destacant el 67% d' $\alpha$ -proteobacteria trobat a la mostra DNIT, associada a una bioestimulació en condicions desnitrificants, versus el 29% de  $\alpha$ -proteobacteria detectat en la bioestimulació aeròbia.

Altres phyla destacables trobats a l'aigua subterrània, a més de proteobacteria, han estat *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*. *Actinobacteria* es pot relacionar principalment amb l'aigua neta de l'aqüífer, representant més d'un 35% de les lectures al P12. En les mostres tant d'aigua contaminada (P15 i P16) com de bioestimulació aeròbia i anaeròbia (AER i DNIT) *Actinobacteria* comparteix protagonisme amb *Bacteroidetes*, en la majoria dels casos amb una abundància d'aproximadament el 5% per a cada phylum.

El phylum *Actinobacteria* ha estat detectat examinant sòls contaminats (Saul, Aislabie et al. 2005) i no contaminats (Nacke, Thurmer et al. 2011, Roesch, Fulthorpe et al. 2007). *Bacteroidetes* s'ha identificat en estudis previs tot i que no s'ha pogut associar a contaminació per hidrocarburs (Sutton, Maphosa et al. 2013).

Els altres phyla detectats (*Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, i *Nitrospira*, principalment) són en tots els casos molt minoritaris, amb abundàncies inferiors al 0'15%.

La variació de les classes de proteobacteria entre mostres amb presència o no de LABs coincideixen amb resultats anteriors (Zhang, Mörtelmaier et al. 2012), que mostren que totes les classes de proteobacteria responen a l'input d'hidrocarburs, variant la seva distribució.

### **9.3.1. Gèneres principals**

Observant els gèneres principals en les mostres d'aigua preses *in situ* ha observat que les composicions de la microbiota són molt diferents entre pous (taula 9.5).

**Taula 9.5.** Abundància relativa dels gèneres en les diverses mostres. Es troben representats a la taula els gèneres que representen més d'un 0'1%.

(A) Mostres d'aigua subterrània

P12 (% gènere)		P15 (% gènere)		P16 (% gènere)	
Mycobacterium	17,82	Pseudomonas	7,11	Aminobacter	36,6
Nocardia	16,87	Hydrogenophaga	6,42	Hydrogenophaga	3,58
Sphingobium	16,40	Mycobacterium	4,07	Rhodobacter	1,13
Aquabacterium	9,54	Aquabacterium	3,50	Acidovorax	1,03
Pseudomonas	6,00	Acidovorax	3,22	Magnetospirillum	0,93
Hydrogenophaga	2,78	Sphingobium	3,13	Legionella	0,72
Acinetobacter	1,73	Perlucidibaca	2,74	Methylophilus	0,44
Acidovorax	1,07	Arcobacter	2,29	Sphingobium	0,36
Phenylobacterium	0,84	Novosphingobium	1,90	Pseudomonas	0,26
Chitinimonas	0,68	Acinetobacter	1,84	Herminiimonas	0,18
Variovorax	0,65	Phenylobacterium	1,75	Acinetobacter	0,18
Xanthobacter	0,63	Sulfuritalea	1,30	Mycobacterium	0,13
Devosia	0,42	Flavobacterium	1,27	Haliscomenobacter	0,13
Rheinheimera	0,42	Haliscomenobacter	1,24	Dietzia	0,10
Roseomonas	0,39	Aminobacter	1,18	Phenylobacterium	0,10
Peredibacter	0,29	Brevundimonas	1,12		
Caulobacter	0,28	Caulobacter	0,84	No classificats	53,2
Nevskia	0,25	Sphingomonas	0,66		
Brevundimonas	0,23	Buttiauxella	0,63		
Flavobacterium	0,20	Alkanindiges	0,60		
Sphingomonas	0,18	Sphingobacterium	0,57		
Sphingopyxis	0,18	Algoriphagus	0,48		
Aquicella	0,18	Methyloversatilis	0,45		
Sphingosinicella	0,17	Hyphomonas	0,45		
Pseudoxanthomonas	0,16	Rhizobium	0,42		
Aminobacter	0,15	Rheinheimera	0,42		
Cellvibrio	0,15	Rhodococcus	0,36		
Perlucidibaca	0,13	Comamonas	0,36		
Williamsia	0,12	Williamsia	0,33		
No classificats	20,19	Dietzia	0,33		
		Delftia	0,33		
		Variovorax	0,24		
		Rhodobacter	0,24		
		Arthrobacter	0,21		
		Limnobacter	0,21		
		Albidiferax	0,21		
		Undibacterium	0,21		
		Pedobacter	0,18		
		Azospira	0,18		
		Simplicispira	0,15		
		Sphingopyxis	0,15		

## Caracterització microbiològica

Legionella	0,15
Exiguobacterium	0,15
Hermiimonas	0,12
Janthinobacterium	0,12
Dechloromonas	0,12
Dongia	0,12
Aquicella	0,12
Aquimonas	0,12
No classificats	43,94

### (B) Assaigs de bioestimulació ( 90 dies)

AER (% gènere)	
Parvibaculum	11,21
Methylophilus	4,24
Mycobacterium	3,90
Pseudomonas	3,06
Dietzia	2,38
Nitrospira	2,21
Sphingosinicella	1,87
Gp3	1,53
Phenylobacterium	1,36
Methyloversatilis	1,19
Sphingobium	1,19
Novosphingobium	1,02
Rhodobacter	0,85
Hyphomonas	0,68
Tistrella	0,68
Roseomonas	0,68
Williamsia	0,51
Ohtaekwangia	0,34
Limnobacter	0,34
Hydrogenophaga	0,34
Brevundimonas	0,34
Oceanibaculum	0,34
Corynebacterium	0,17
Methylotenera	0,17
Xanthobacter	0,17
Caulobacter	0,17
Sphingomonas	0,17
Legionella	0,17
No classificats	58,74

DNIT (% gènere)	
Parvibaculum	34,35
Sphingobium	10,87
Sphingomonas	3,68
Achromobacter	3,27
Brevundimonas	2,57
Mycobacterium	2,03
Caulobacter	1,71
Thermomonas	1,31
Dokdonella	1,01
Hyphomonas	0,98
Stenotrophomonas	0,90
Tistrella	0,86
Simplicispira	0,81
Novosphingobium	0,81
Cupriavidus	0,75
Dietzia	0,51
Azoarcus	0,51
Acidovorax	0,41
Williamsia	0,32
Pseudomonas	0,24
Bradyrhizobium	0,19
Methylobacter	0,19
Shinella	0,17
Variovorax	0,15
Proteiniphilum	0,13
Sandaracinobacter	0,13
Gp3	0,13
No classificats	29,99

En primer lloc, cal destacar que proporcions relativament altes de les seqüències no s'han pogut classificar a nivell de gènere. La proporció de seqüències que no s'ha pogut classificar per sota del nivell phyla varia del 0'5% al 29% (8% de mitja) (taula 9.6).

**Taula 9.6.** Seqüències classificades a cadascun dels nivells per RDP.

	P12	P15	P16	AER 90	DN 90
Phylum	99,83%	99,64%	99,10%	71,82%	99,79%
Classe	98,96%	97,53%	99,10%	70,63%	99,49%
Família	85,85%	70,04%	55,10%	55,69%	80,16%
Gènere	79,73%	56,06%	46,83%	41,26%	70,01%

Aquests valors encaixen en els rangs obtinguts en estudis recents que apliquen la piroseqüenciació en diversos ecosistemes amb alta biodiversitat (Nacke, Thurmer et al. 2011, Sutton, Maphosa et al. 2013). Una possible explicació d'aquestes altes proporcions és que aquestes pertanyin a espècies no reconegudes o noves, i que per tant no sigui possible classificar-les.

En el pou d'aigua neta (P12) s'ha pogut observar una predominança de *Mycobacterium* (Actinobacteria), *Nocardia* (Actinobacteria), que conformen la majoria de membres del grup Actinobacteria majoritari detectat a l'aigua subterrània (figura X philums), i *Sphingobium* ( $\alpha$ - proteobacteria), en proporcions similars al voltant del 17% cadascuna, seguides per *Aquabacterium* ( $\beta$ -protobacteria), *Pseudomonas* ( $\gamma$ -proteobacteria) i *Hydrogenophaga* ( $\beta$ -proteobacteria). En menor proporció es poden observar gèneres relacionats àmpliament amb la degradació d'hidrocarburs, els quals es troben en proporcions minoritàries (<1%), com *Acidovorax*, *Variovorax*, *Xanthobacter* o *Caulobacter*, valors que serien coincidents amb la ràtio de degradadors de LABs trobat per NMP.

En els pous d'aigua contaminada amb LABs, les proporcions entre membres varien extensivament. Tot i que la major part de gèneres es troben també en aigua neta, la predominança relativa dels mateixos ha canviat completament. Al P15 es pot trobar una població balancejada, sense predominança clara de cap membre. Entre ells es troben *Pseudomonas*, *Hydrogenophaga*, *Mycobacterium*, *Aquabacterium*, *Acidovorax* i *Sphingobium*, gèneres relacionats amb la degradació d'hidrocarburs, tots per damunt del 3% i representant en conjunt un 28% de la població. Entre aquests gèneres destaca *Acidovorax*, detectat amb anterioritat en les mostres de sòl i aigua subterrània de les columnes (capítol 8), i descrit com a degradador d'hidrocarburs aromàtics (Singleton, Richardson et al. 2011).

Al P16, es pot observar una presència majoritària d'*Aminobacter* (superior al 35%). Els altres gèneres detectats al pou P15 es troben també presents, però en una menor proporció.

Les mostres procedents de la bioestimulació presenten un perfil completament diferenciat de les mostres d'aigua subterrània, mostrant que durant les incubacions in vitro s'ha produït un enriquiment selectiu de determinats gèneres. Aquest enriquiment està relacionat amb la biodegradació dels LABs.

No obstant, s'ha de considerar també la ràtio de microorganismes degradadors de LABs/ heteròtrofs totals. En el cas de la incubació en condicions aeròbies, era del 10%, mentre que en la incubació desnitrificant de l'1%.

Les dues mostres de bioestimulació presenten a més perfils ben diferenciats entre ells, fent palès l'efecte de l'acceptor d'electrons sobre la població microbiana. En ambdues mostres cal destacar la predominança del gènere *Parvibaculum*, detectat amb anterioritat (capítols 5 i 6). Mitjançant piroseqüenciació, en les mostres de bioestimulació aeròbia, *Parvibaculum* representa aproximadament l'11% de les seqüències, mentre que en condicions desnitrificants arriba a representar el 34% de les seqüències. *Parvibaculum lavamentivorans*, un d' $\alpha$ -proteobacteri de la família Rhodobiaceae (anteriorment definit com Phyllobacteriaceae), és degradador de LABs i LASs (LABs sulfonats) en condicions aeròbies (Martinez-Pascual, Jimenez et al. 2010), però no s'ha detectat degradació en condicions desnitrificants com a cultiu pur (capítol 6). No obstant, s'ha de tenir en compte que el període de temps considerat a l'assaig de biodegradació de LABs en condicions desnitrificants no hagi estat suficient (40 dies), i que la soca emprada (DSMZ13023) no és la mateixa que la detectada per tècniques moleculars (similitud del %% a la banda descrita per DGGE). *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1 és aerobi estricte (Schleheck, Weiss et al. 2011), tot i que altres membres del gènere *Parvibaculum* s'han detectat en cultius reductors de nitrat, en condicions aeròbies (Blothe, Roden 2009), i en altes proporcions, durant processos de degradació anaeròbia de nonilfenol, un compost similar als LABs (Weert, Vinas et al. 2011).

Aquesta diversitat d'ambients en que s'ha trobat seqüències de 16SrRNA properes a *Parvibaculum* indicaria que poden existir diferents soques del mateix gènere amb metabolisme aerobi estricte (Schleheck, Weiss et al. 2011) , i d'altres anaeròbies facultatives amb potencial desnitrificant, amb capacitat degradador a. Malauradament encara no s'ha aconseguit aïllat cap soca de *Parvibaculum* en cultiu pur en condicions desnitrificants, tot i que s'ha detectat mitjançant tècniques moleculars seqüències amb afiliació a aquest gènere en condicions desnitrificants (Weert, Vinas et al. 2011).

Durant la bioestimulació aeròbia s'ha detectat proporcions entre l'1% i el 4% diversos gèneres relacionats amb anterioritat amb la degradació d'hidrocarburs, com *Methylophilus*, *Novosphingobium* o *Dietzia*, així com gèneres detectats a les mostres d'aigua subterrània no contaminada, com *Mycobacterium* o *Hydrogenophaga*, aquests últims en proporcions menors.

Durant la bioestimulació desnitrificant s'han detectat, també en proporcions >1%, gèneres relacionats amb la reducció del nitrat, com per exemple *Sphingobium* (Knight, Berman et al. 2003), que es troba en una proporció del 10%, i *Achromobacter* (Coyne, Tiedje 1990), *Sphingomonas* (Liu, Zhang et al. 2009) i *Brevundimonas* (Khan, Horiba et al. 2007) que representen al voltant d'un 3% de les seqüències. S'ha de destacar que tots aquests microorganismes són aerobis facultatius, és a dir, tenen la capacitat de créixer en condicions aeròbies o desnitrificants. Aquest fet és coherent amb les condicions ambientals de l'aqüífer, ja que no es tracta d'un ambient anaerobi estricte , sinó que es troben fluctuacions en les condicions redox *in situ*. Gran part d'aquests gèneres compten amb membres amb coneguda capacitat per degradar els hidrocarburs. *Sphingomonas* s'ha reportat com a degradadors de fenol, alquilfenols i nonilfenols (Liu, Zhang et al. 2009, Van Beilen, Mourlane et al. 2003, Kolvenbach, Corvini 2012, Li, Ji et al. 2007). D'altra banda, membres del gènere *Sphingobium* han estat reportats amb freqüència com a degradadors d'hidrocarburs aromàtics (Sipilä,

Väisänen et al. 2010, Liang, Lloyd-Jones 2010); així com *Achromobacter* (Ghevariya, Bhatt et al. 2011, Bacosa, Suto et al. 2012) i *Brevundimonas* s'ha aïllat amb freqüència en mostres contaminades per hidrocarburs (Vinas, Sabate et al. 2005, Xiao, Guo et al. 2010)

La diferència de proporcions entre poblacions majoritàries (>3%) es pot observar a la figura 9.14.

Membres del grup *Acidovorax* es detecten en les mostres d'aigua subterrània, sobretot en la mostra P15, i en la bioestimulació desnitrificant.

*Mycobacterium* es detecta en les mostres d'aigua contaminada i assaigs de bioestimulació en proporcions similars (2-4%), mentre que es troba en concentracions molt més elevades en l'aigua neta (18 % en el pou P12). Aquest fet fa que es pugui associar a l'aigua subterrània no afectada per LABs, veient-se afectat per la presència de LABs i disminuint la seva distribució relativa.

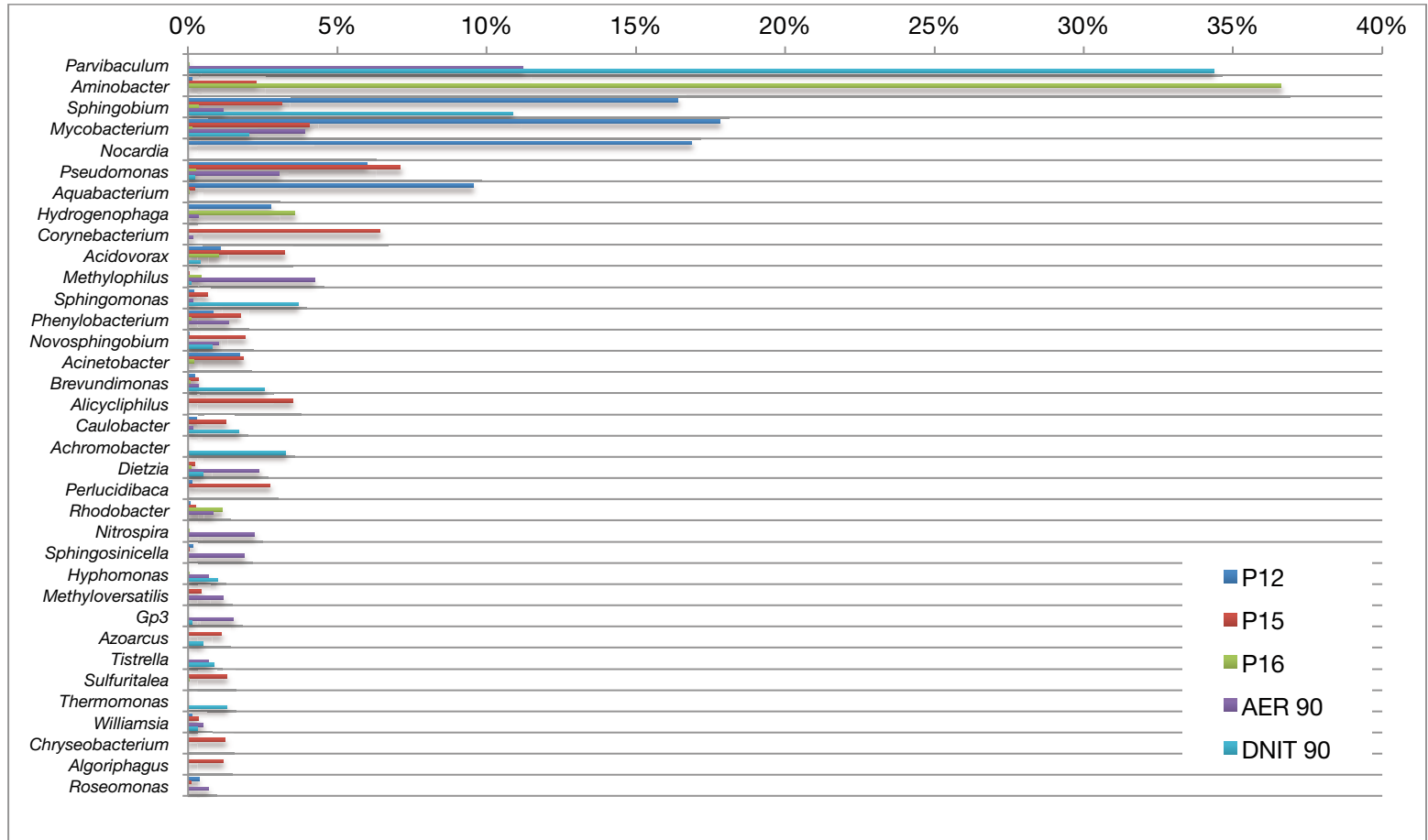
L'anàlisi multivariant fet amb clúster mitjançant el coeficient de Pearson de les llibreries obtingudes usant Mothur (coeficient de similitud de Jaccard) ha permès visualitzar les similituds i diferències entre mostres (figura 9.14).

Les mostres d'aigua s'han agrupat en un mateix clúster, separatament de les mostres corresponents a la bioestimulació, tant aeròbia com desnitrificant.



Caracterització microbiològica

**Figura 9.13.** Gèneres majoritaris (>3%) i la seva distribució a les mostres. (A) global, (B) Detall dels gèneres amb distribucions entre el 3% i el 10%.





**Figura 9.14.** Anàlisi clúster segons el coeficient de similitud de Jaccard, mostrant les relacions entre comunitats microbianes en les diferents mostres basat en les llibreries de piroseqüenciació. L'escala és la distància entre clústers en unitats de Jaccard.

#### **9.4. Avaluació dels diferents mètodes de caracterització de diversitat microbiana utilitzats**

En aquest estudi, tant les tècniques dependents (aïllaments en agar mineral amb LABs), com independents de cultiu (PCR-DGGE i piroseqüenciació de gens 16SrRNA) han mostrat el domini dels membres del phylum Proteobacteria. En profunditzar més en l'anàlisi poblacional, però, s'ha pogut observar que els resultats obtinguts amb els diversos mètodes han estat força diferents.

##### Comparativa de mètodes d'aïllament respecte a PCR-DGGE i piroseqüenciació de gen 16SrRNA

Els aïllaments s'han fet a partir de mostres d'aigua contaminada. La detecció dels gèneres obtinguts per aïllament amb les altres tècniques emprades ha estat desigual (taula 9.7.). Es pot afirmar que els aïllats no són representatius de la població total (obtinguda mitjançant la piroseqüenciació) ni de la població activa (obtinguda amb els DGGEs de les poblacions crescudes en els BioSeps incubats *in situ* en aigua contaminada).

**Taula 9.7.** Detecció pels diversos mètodes dels gèneres aïllats en placa.

Gènere aïllat en placa	Família	Grup Filogenètic	Població activa (BioSeps+ DGGE) <sup>a</sup>	Població total (piroseq.) <sup>a,b</sup>
<i>Bacillus</i>	Bacillaceae	Firmicutes	n.d.	n.d.
<i>Bosea</i>	Bradyrhizobiaceae	$\alpha$ -proteobacteria	n.d.	n.d.
<i>Brevibacterium</i>	Brevibacteriaceae	Actinobacteria	n.d.	n.d.
<i>Burkholderia</i>	Burkholderiaceae	$\beta$ -proteobacteria	AC (no a BioSeps) 14'79%	n.d.
<i>Caulobacter</i>	Caulobacteraceae	$\alpha$ -proteobacteria	n.d.	P15 (0'84%); P12 (0'28%) n.d. (si en la bioestimulació
<i>Cupriavidus</i>	Burkholderiaceae	$\beta$ -proteobacteria	n.d.	ANA, en un 0'75%)
<i>Microbacterium</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria	n.d.	n.d.
<i>Ochrobactum</i>	Brucellaceae	Actinobacteria	n.d.	n.d.
<i>Oleomonas</i>	Rhodospirillaceae	$\alpha$ -proteobacteria	n.d.	n.d.
<i>Paracoccus</i>	Rhodobacteraceae	$\alpha$ -proteobacteria	n.d.	n.d.
<i>Pseudomonas</i>	Pseudomonadaceae	$\gamma$ -proteobacteria	n.d.	P15 (7%); P16 (0'26%)
<i>Shewanella</i>	Shewanellaceae	$\gamma$ -proteobacteria	n.d.	n.d.
<i>Sphingobium</i>	Sphingomonadaceae	$\alpha$ -proteobacteria	n.d. (si en DGGE de capítols anteriors)	P15 (3%) i P16 (0'36%); P12 (16%)
<i>Williamsia</i>	Nocardiaceae	Actinobacteria	n.d.	Totes les mostres, sempre $\leq$ 0'5%

<sup>a</sup> n.d.:No detectada

<sup>b</sup> Considerades les bandes amb una proporció >0'10%.

Els resultats de piroseqüenciació i els obtinguts mitjançant DGGE presenten també perfils de seqüències predominants poc similars.

#### Comparació de tècniques de DGGE i piroseqüenciació per a l'estudi de la diversitat microbiana durant els experiments de bioestimulació en diferents condicions redox

Pel que fa a les mostres de bioestimulació, la comparativa s'ha fet amb els perfils de DGGE (capítol 6) i les mostres AER90 i DNIT90 de la piroseqüenciació.

Entre les bandes seqüenciades del DGGE per la bioestimulació aeròbia (figura 6.8, taula 6.2), s'ha trobat *Methylophilus* (B67) i *Sphingobium* (B63); gèneres detectats també en la piroseqüenciació però en proporcions molt diferents (en el DGGE fins al 30% i el 14% d'intensitat de banda, respectivament i en la piroseqüenciació, 4'24% i 1'19%, respectivament).

Entre les bandes seqüenciades provinents del DGGE durant la bioestimulació aeròbia (figura 6.9, taula 6.2), s'ha detectat *Sphingobium* i *Dokdonella*, en una intensitat

relativa màxima d'aproximadament el 14% i el 10%, respectivament. En la piroseqüenciació, *Sphingobium* s'ha detectat com a un gènere principal (10'87%), una proporció coherent amb la obtinguda per DGGE. *Dokdonella* es detecta en canvi en una proporció de l'1%, deu cops inferior a l'obtinguda per DGGE.

*Parvibaculum*, gènere predominant tant en la bioestimulació sota condicions aeròbies com sota desnitrificants segons els resultats de piroseqüenciació, no s'ha detectat a l'anàlisi per DGGE (tot i que s'ha detectat en la mostra de la bioestimulació seqüencial del dia 60, S60 (figura 6.9, taula 5.2)). Això podria ser degut a un patró de migració poc definit, i diferent a la del *Parvibaculum* detectat al punt S60 o a una amplificació dificultada per una afinitat diferent als primers utilitzats (F341-R907 per a DGGE i F341-R802 per a piroseqüenciació). Si la banda ha migrat fins a la part inferior, amb bandes poc definides, aquesta no s'ha pogut seqüenciar. No obstant, la obtinguda per DGGE no seria proporcional als percentatges trobats per piroseqüenciació.

Pel que fa a l'aigua subterrània, tant amb com sense hidrocarburs, s'ha comparat els resultats obtinguts per DGGE amb el DNA extret dels BioSeps i a partir de l'aigua subterrània directament (figura 9.6. i taula 9.3.) amb la piroseqüenciació. En aquest cas també s'observen diferències importants segons el mètode d'estudi utilitzat.

El phylum Actinobacteria, tant representat en la mostra d'aigua neta per piroseqüenciació, es detecta aquí amb dins gènere *Mycobacterium*, en mostres d'aigua i BioSeps situats en l'aigua no contaminada (ANDB, ANBN, AN i AC). Així doncs, es reforça la hipòtesi de la possibilitat d'emprar aquest phylum com a indicador de no contaminació.

En les mostres procedents dels biofilms formats als BioSeps, es detecta en els BioSeps sense dopar seqüències molt similars als gèneres *Azotobacter*, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Massilia* i *Marinifilum*. Cap d'aquests gèneres es detecten en la mostra P12 (aigua neta) amb més d'un 0'1%.

En les mostres procedents dels BioSeps s'ha detectat també *Mycobacterium*, *Hydrogenophaga* i *Aminobacter*, gèneres trobats també a l'anàlisi de piroseqüenciació. *Mycobacterium* és un dels gèneres amb més presència en la piroseqüenciació (17'82%). No obstant, la seva presència en el DGGE de BioSeps és molt menor (2'86%). *Hydrogenophaga* presenta proporcions més similars en els dos mètodes (un 4'57% de mitja entre els diversos carrils del DGGE i 2'78% en la piroseqüenciació). Finalment, el gènere *Aminobacter*, que presenta una baixa proporció en la piroseqüenciació de les aigües subterrànies sense contaminar (0'15%), i en altes proporcions a l'aigua contaminada (P16), es troba àmpliament representat en els DGGE procedents de BioSeps (B2). Aquest fet suggereix que, tot i trobar-se en baixes proporcions en l'aigua original, *Aminobacter* és un gènere que podria tenir importància i estar metabòlicament actiu en la bioremediació les aigües subterrànies en les condicions ambientals *in-situ* de l'aquífer.

En la mostra d'aigua subterrània directa, on es detecta les poblacions totals i no les poblacions metabòlicament actives, s'haurien d'obtenir resultats coherents amb la piroseqüenciació. Els gèneres detectats i sobretot les proporcions en que es troben aquests gèneres, no són idèntics. Les bandes predominants són B30, B32 i B34, corresponents a un *Flavobacteriaceae*, *Marinifilum* i un membre del grup *Desulfuromonadales*. Aquests representen un 8'71%, 3'87% i 3'41% de la intensitat relativa del carril, respectivament. Aquests gèneres no es troben de manera majoritària en l'anàlisi de piroseqüenciació, detectant-se tant sols *Flavobacterium* en un 0'20%. A

causa del gran nombre de bandes al DGGE, no s'ha pogut identificar gairebé cap banda que no entres dins les no majoritàries. Entre les poques bandes identificades es troben *Acidovorax*, *Aquabacterium*, *Methylobacillus*, *Chriseobacterium*, *Dechloromonas*, *Hydrogenophaga* i *Massilia*. D'aquests, tan sols són presents en la piroseqüenciació *Acidovorax* (1'07%), en una proporció similar a la presentada al DGGE (2'30%); i *Aquabacterium* amb una proporció del 9'54%, lleugerament superior a la intensitat relativa al DGGE (4'99%).

D'altra banda, gèneres amb gran importància en l'anàlisi de piroseqüenciació no s'han detectat en els enriquiments en BioSeps. Aquests gèneres, com *Nocardia*, *Sphingobium* i *Pseudomonas* (16'87%, 16'40% i 6'00%, respectivament), poden estar en grans quantitats en l'aigua subterrània, però no estar metabòlicament actius, o presentar problemes a l'hora de ser detectats per DGGE.

Així doncs, és destacable la no correspondència dels resultats de DGGE amb els de la piroseqüenciació; no tan sols els previsiblement diferents formats pels biofilms als BioSeps, sinó també els obtinguts amb el DGGE de mostres d'aigua subterrània directament.

La comparació entre els gèneres detectats en l'aigua subterrània contaminada s'ha dut a terme emprant els carrils ACBN, ACBD i AC (figura 9.6); i els resultats corresponents a les mostres P15 i P16 de la piroseqüenciació (taula 9.6).

Entre els gèneres detectats al DGGE, destaquen *Dechloromonas*, *Aminobacter*, *Delftia*, *Mehylovorus*, *Paucibacter* i *Aquabacterium*.

*Dechloromonas* es troba en un 0'12% en la piroseqüenciació, però la intensitat relativa al DGGE és molt més alta, formant part dels biofilms, tant dels BioSeps dopats com no dopats i submergits en aigua contaminada.

*Aminobacter*, microorganisme capaç de degradar compostos complexos com herbicides (Simonsen, Badawi et al. 2012) i estradiol (Yu, Roh et al. 2007), apareix a la piroseqüenciació en una proporció del 1'18% i un 36'61% en les mostres dels pous contaminats. La diferència entre pous pot ser deguda al mostreig. La gran presència del gènere, emprant els dos mètodes considerats, indica que és un gènere predominant i metabòlicament actiu in situ, relacionat amb la contaminació per LABs. La diferència observada entre les dades obtingudes per piroseqüenciació dels piezòmetres P15 i P16, ambdós afectats per la presència de LABs, indicaria un possible problema en el mostreig o durant la preparació de la mostra o reacció de piroseqüenciació.

Els gèneres *Delftia* (11'70% en la mostra ACBN), *Mehylovorus* (3'98% en la mostra ACBN) i *Paucibacter* (7'26% en la mostra ACBN, ACBD, ANBD), es troben en les mostres provinents dels BioSeps en presència de LABs. Són microorganismes no detectats o detectats en baixa proporció en l'anàlisi per piroseqüenciació a partir de les mostres directes de pous contaminats o dels assaigs de bioestimulació (*Delftia* 0'33% en la mostra P15, les altres no detectades). Aquests gèneres es poden associar doncs a la presència de LABs, essent indicadors de contaminació i per tant, de potencial activitat degradadora.

D'altra banda, i com ocorria en les mostres d'aigua neta, diversos microorganismes detectats com a majoritaris en l'anàlisi de piroseqüenciació no s'han identificat en el DGGE. Alguns exemples són *Pseudomonas* (7'11%), *Hydrogenophaga* (6'42%), *Mycobacterium* (4'07%) o *Sphingobium* (3'13%), tots detectats a la mostra P15 de piroseqüenciació. Tot i que es troben en proporcions molt per damunt del límit de detecció de la tècnica, podria ser que aquestes bandes s'haguessin solapat amb

altres o haguessin quedat difoses, impedit-ne la detecció. D'altra banda, la variació del percentatge d'algunes d'aquestes soques entre l'aigua neta (P12) i l'aigua contaminada (P15) fa palès que aquestes tenen més importància en absència dels LABs (*Mycobacterium* 17'82% i *Sphingobium* 16'40% al P12), i probablement no es trobin metabòlicament actives en presència del contaminant. Per tal de verificar la seva presència en els biofilms formats per BioSeps s'hauria d'optar per altres mètodes com la biblioteca de clons.

Finalment, per fer un resum de la comparació entre els diversos mètodes, s'ha comparat els gèneres detectats en la mostra d'aigua subterrània contaminada per LABs (la mostra analitzada per més mètodes) (Taula 9.8.)

Per la comparació s'ha emprat els resultats d'aïllament, els resultats del DGGE tant de l'aigua directa (AC) com dels BioSeps (ACBN i ACBD), i els resultats de P15 i P16 (piroseqüenciació).

**Taula 9.8.** Comparació de les seqüències obtingudes a partir de les mostres d'aigua contaminada amb els diversos mètodes.

Gènere	Aïllat	P15	P16	DGGE-AC	DGGE-ACBN	DGGE-ACBD
<i>Acidovorax</i>		3,22%	1,03%			
<i>Acinetobacter</i>		1,84%	0,18%			
<i>Aequorivita</i>		0,03%				
<i>Aeromicrobium</i>		0,03%				
<i>Aeromonas</i>		0,21%				
<i>Afipia</i>		0,48%				
<i>Albidiferax</i>		0,60%				
<i>Algoriphagus</i>		1,18%				
<i>Alicyclophilus</i>		3,50%				
<i>Alkanindiges</i>		0,12%				
<i>Aminobacter</i>		2,29%	36,61%	✓	✓	✓
<i>Aquabacterium</i>		0,21%	0,03%	✓		✓
<i>Aquicella</i>		0,06%	0,05%			
<i>Aquimonas</i>		0,18%	0,05%			
<i>Arcobacter</i>		0,03%				
<i>Arenimonas</i>		0,06%				
<i>Arthrobacter</i>		0,06%				
<i>Azoarcus</i>		1,12%				
<i>Azonexus</i>		0,63%	0,03%			
<i>Azospira</i>		0,03%				
<i>Azospirillum</i>		0,03%	0,03%			
<i>Bacillus</i>	✓	0,03%				
<i>Bauldia</i>		0,84%				
<i>Bdellovibrio</i>		0,09%				
<i>Bordetella</i>		0,03%	0,03%			
<i>Bosea</i>	✓	0,36%				
<i>Bradyrhizobium</i>		0,12%				
<i>Brevibacterium</i>	✓					
<i>Brevundimonas</i>		0,33%	0,08%			
<i>Brucella</i>		0,06%				
<i>Buttiauxella</i>		0,33%				
<i>Burkholderia</i>	✓					
<i>Byssovorax</i>		0,12%				
<i>Carnobacterium</i>		0,06%				
<i>Catellibacterium</i>		0,15%	0,03%			
<i>Caulobacter</i>	✓	1,27%				
<i>Cellvibrio</i>		0,03%				

## Caracterització microbiològica

<i>Chitinimonas</i>	0,06%			
<i>Chryseobacterium</i>	1,24%			
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,12%			
<i>Comamonas</i>	0,09%			
<i>Corynebacterium</i>	6,42%			
<i>Cupriavidus</i>	✓	0,03%		
<i>Dechloromonas</i>	0,45%		✓	✓
<i>Delftia</i>	0,12%	0,03%	✓	
<i>Devosia</i>	0,06%	0,08%		
<i>Diaphorobacter</i>	0,15%			
<i>Dietzia</i>	0,21%	0,10%		
<i>Dokdonella</i>	0,03%			
<i>Flavobacterium</i>		0,05%		
<i>Haliscomenobacter</i>		0,13%		
<i>Herminiimonas</i>		0,18%		
<i>Hydrogenophaga</i>		3,58%	✓	
<i>Hyphomonas</i>		0,03%		
<i>Legionella</i>		0,72%		
<i>Limnobacter</i>		0,03%		
<i>Magnetospirillum</i>	0,06%	0,93%		
<i>Massilia</i>	0,06%		✓	
<i>Marinifilum</i>			✓	
<i>Methylobacillus</i>			✓	
<i>Methylomonas</i>		0,08%		
<i>Methylophilus</i>	0,03%	0,44%		
<i>Methylosoma</i>	0,03%			
<i>Methyloversatilis</i>	0,45%			
<i>Methylovorus</i>			✓	
<i>Microbacterium</i>	✓			
<i>Mycobacterium</i>	4,07%	0,13%	✓	
<i>Nitrospira</i>		0,05%		
<i>Novispirillum</i>		0,03%		
<i>Novosphingobium</i>	1,90%			
<i>Ochrobactum</i>	✓			
<i>Ohtaekwangia</i>	0,06%	0,03%		
<i>Oleomonas</i>	✓			
<i>Pantoea</i>	0,03%			
<i>Paracoccus</i>	✓	0,03%		
<i>Parvibaculum</i>		0,05%		
<i>Paucibacter</i>			✓	✓
<i>Pedobacter</i>	0,18%			
<i>Peredibacter</i>	0,03%			
<i>Perlucidibaca</i>	2,74%			
<i>Phenylobacterium</i>	1,75%	0,10%		
<i>Piscinibacter</i>	0,06%			
<i>Polaromonas</i>	0,03%			
<i>Pseudomonas</i>	✓✓✓	7,11%	0,26%	
<i>Pseudorhodofera</i>	0,03%			
<i>Rheinheimera</i>	0,42%			
<i>Rhizobacter</i>		0,03%		
<i>Rhizobium</i>	0,42%	0,08%		
<i>Rhodobacter</i>	0,24%	1,13%		
<i>Rhodococcus</i>	0,36%	0,05%		
<i>Rickettsia</i>	0,03%			
<i>Roseomonas</i>	0,09%			
<i>Serratia</i>	0,06%			
<i>Shewanella</i>	✓			
<i>Simplicispira</i>	0,15%			

## Caracterització microbiològica

<i>Sphingobacterium</i>		0,57%	
<i>Sphingobium</i>	✓	3,13%	0,36%
<i>Sphingomonas</i>		0,66%	
<i>Sphingopyxis</i>		0,15%	
<i>Sphingosinicella</i>		0,03%	
<i>Steroidobacter</i>		0,03%	
<i>Sulfuritalea</i>		1,30%	0,03%
TM7		0,06%	
<i>Undibacterium</i>		0,21%	
<i>Variovorax</i>		0,24%	
<i>Williamsia</i>	✓	0,33%	
<i>Xanthobacter</i>		0,03%	
<i>Xenophilus</i>		0,03%	

Els aïllaments presenten una diversitat poblacional molt esbiaixada respecte la població real in situ. Una raó significativa per aquest biaix pot ser la diferència de condicions fisiològiques entre cultius de laboratori i ecosistemes naturals. Els medis usats per al cultiu de microorganismes degradadors generalment contenen concentracions molt més elevades del contaminant objectiu i de nutrients, resultant en un enriquiment de les poblacions de creixement ràpid.

D'altra banda els microorganismes usen diverses interaccions cooperatives entre diverses espècies pel seu creixement en l'ecosistema. En el cas de la bioremediació, s'ha demostrat l'existència de la interacció entre microorganismes i del creixement cooperatiu (Moller, Sternberg et al. 1998, Pelz, Tesar et al. 1999, Watanabe, Hamamura 2003). El cultiu no és capaç de reproduir els nínxols ecològics i les relacions que es donen en ambients naturals complexes, necessaris per donar suport a la diversitat microbiana total (Nocker, Burr et al. 2007). A causa d'aquestes limitacions, el càlcul de la riquesa i uniformitat obtinguts per aquests mètodes no reflecteixen acuradament la diversitat.

Per altra banda, l'anàlisi de comunitats microbianes mitjançant tècniques basades en l'amplificació de PCR presenten també biaixos coneguts, associats ja sigui a l'extracció de DNA (Feinstein, Sul et al. 2009), amb la selecció de primers (Engelbrekton, Kunin et al. 2010) i en la PCR (Polz, Cavanaugh 1998). D'altra banda, el gen 16S rRNA, emprat en la majoria d'estudis, pot trobar-se en múltiples còpies per genoma. No obstant, aquests biaixos poden ser minimitzats seleccionant els protocols adequats.

Les tècniques de *fingerprinting*, com el DGGE, presenten a més altres limitacions, com la baixa resolució i problemes de migració de les bandes. El DGGE és una tècnica econòmica, que permet l'observació de dinàmiques i canvis en la comunitat microbiana, ja sigui al llarg del temps o sota diversos tractaments. No obstant, és necessari realitzar anàlisis complementaris per tal d'assolir un coneixement exhaustiu sobre la composició de les comunitats microbianes complexes, sobretot pel que fa a la *rare biodiversity*, que tot i trobar-se en proporcions minoritàries, pot jugar un paper essencial en la transformació dels contaminants.

La piroseqüenciació és un mètode d'alta resolució, que permet seqüenciar milers de seqüències per mostra en sets de 10 a 20 mostres diferents per xip. Aquest mètode, però, es troba també sotmès als biaixos de la PCR (van Elsas, Boersma 2011).

Els mètodes basats en l'extracció directa de DNA a partir de mostres de sòl o aigües subterrànies presenten també un altre problema: el DNA extret no té per què



correspondre a les poblacions metabòlicament actives. Per a analitzar la biomassa in-situ, és essencial un mostreig representatiu de l'aqüífer. En les mostres d'aigua subterrània, existeix un biaix cap a les comunitats planctòniques (no enganxades al sòl), que es veuen afavorides en el procés de recol·lecció (Lehman, Colwell et al. 2001). Per a obtenir dades de les poblacions microbianes actives amb més precisió, s'ha demostrat la utilitat de dispositius de mostreig passiu que permeten la formació de biofilms compostos per les poblacions metabòlicament actives de la subsuperfície.

Les comunitats microbianes duen a terme multitud de processos a petita escala que sustenten moltes funcions ambientalment importants. No obstant, els rols ecològics i funcionals de cada tàxon específic resten sense determinar, ja que la major part dels microorganismes no són cultivables. Les metodologies presentades en aquest capítol han suposat un gran avanç en l'anàlisi de la biodiversitat microbiana, sobretot la piroseqüenciació. En aquest tipus d'anàlisi l'ús de bases de dades de qualitat que permetin assignacions segures de les famílies i gèneres presents a la mostra és d'importància cabdal. Els resultats de piroseqüenciació són difícils d'interpretar, i tenir seguretat en l'assignació de les OTUs és un punt clau.

No obstant, és també necessari trobar la relació entre la presència als ecosistemes de tàxons específics i les funcions metabòliques que aquests desenvolupen (Gray, Head 2001, Riesenfeld, Schloss et al. 2004). Una aproximació és estudiar gens que intervinguin en les rutes metabòliques d'interès.

### **9.5. La comunitat microbiana com a indicadora dels processos de descontaminació**

El coneixement de les comunitats microbianes i la seva evolució en emplaçaments contaminats permet comprendre millor les condicions que permeten l'ocurrència de processos de degradació.

Els resultats mostrats amb els diversos mètodes indiquen que existeixen diversos tàxons que es poden relacionar amb la degradació d'hidrocarburs en funció de la seva distribució relativa en relació a la població total i entre elles. La seva presència proporciona una primera idea del potencial per a la degradació dels contaminants. En primer lloc, és destacable el phylum Actinobacteria. La seva presència majoritària en les aigües netes i els biofilms formats en aquestes el converteix en un indicador de no-contaminació idoni, que s'expressa en aquest cas amb la presència dels gèneres *Mycobacterium* i *Nocardia*, principalment. En cas que ocorri una contaminació, la proporció del phylum proteobacteria (especialment  $\alpha$  i  $\beta$  proteobacteria) augmenta en detriment d'aquest phylum. El gènere *Dechloromonas* actua com a indicador de contaminació.

Altres gèneres que actuen com a indicadors de no-contaminació emprant les anàlisis per BioSeps són *Hydrogenophaga* i *Methylobacillus*; mentre *Paucibacter*, *Massilia*, *Aquabacterium* o *Methylophilus* actuen com a indicadors de emprant BioSeps i DGGE, però no funcionen si l'anàlisi es realitza mitjançant piroseqüenciació de les mostres d'aigua directament. Caldria analitzar per piroseqüenciació els biofilms formats a les perles de BioSep per establir-ne el comportament de manera clara.

El gènere *Parvibaculum* s'ha revelat com un indicador clar en els processos de bioestimulació: la seva presència és indicadora de l'ocurrència d'una degradació dels LABs in vitro, tant en condicions aeròbiques com en condicions desnitrificants.

És interessant destacar la reducció de diversitat en ambients contaminats i en les mostres de bioestimulació. Aquest fet permet que la població degradadora pugui ser monitoritzada més fàcilment, ja que els organismes indicadors són una part reduïda de la població total *in situ*, sense presència de contaminants.

Així mateix, s'han identificat tàxons aerobis facultatius com *Acidovorax*, *Aquabacterium*, *Brevundimonas*, *Marinifilum*, *Parvibaculum*, *Pseudomonas*, *Sphingobium* o *Sphingomonas*, entre altres, tant per DGGE com emprant els BioSeps i DGGE o en els resultats de piroseqüenciació, confirmant la idea de poblacions adaptades a les condicions fluctuants *in situ*, servint per tant com a indicadors ecològics.

Una altra manera de mesurar el potencial degradador *in situ* és detectar i quantificar gens relacionats amb la degradació dels compostos contaminants (capítols 6, 7 i 8 amb els gens *alkB*, *TOD* i *bssA*).

Aquests resultats són especialment interessants per la seva aplicabilitat en processos d'atenuació natural monitoritzada (MNA). Aquest sistema de gestió, aplicat en major mesura actualment degut a les polítiques de tractament de la contaminació basades en la gestió de risc, requereix eines per assegurar l'ocurrència de la degradació *in situ*. És necessari l'anàlisi de les comunitats microbianes, per tal d'augmentar el coneixement d'aquestes i el seu comportament i evolució durant els episodis de contaminació.

## Resultats destacats del capítol

El phylum Actinobacteria està associat a ambients no contaminats. La seva presència en concentracions elevades es pot associar a emplaçaments sense contaminar.

El phylum proteobacteria, majoritari en les aigües subterrànies, incrementa la seva concentració en ambients contaminats i bioestimulacions. Els gèneres *Dechloromonas* i *Aminobacter* actuen també com a indicadors de la contaminació.

*Parvibaculum* juga un paper principal en la degradació en les mostres de bioestimulació dels LABs, tant en condicions aeròbies com desnitrificants.

Les tècniques de seqüenciació massiva permeten una aproximació quantitativa a les poblacions microbianes presents en les diverses mostres.

L'aplicació de BioSeps per a la formació de biofilms permet obtenir informació sobre les poblacions metabòlicament actives i relacionades amb la presència o absència dels LABs *in situ*. Les diferències entre les poblacions microbianes presents als biofilms mostren les variacions de la població *in situ*.

No existeix cap metodologia idònia per estudiar l'ecologia microbiana. La combinació d'eines clàssiques i moleculars (considerant tant les tècniques de fingerprinting com les de seqüenciació massiva) és l'aproximació més encertada.

L'anàlisi i quantificació de gens funcionals permet complementar els estudis de composició de les comunitats microbianes i entendre potencials funcionalitats de les poblacions predominants.

# Capítol 10

Actuacions *in situ*



## **Aplicabilitat dels resultats per a la presa de decisions i gestió a l'emplaçament.**

La creixent preocupació pel cost de la remediació de sols ha creat la necessitat d'explorar tant les tecnologies més rendibles com eines de monitoratge alternatives (Maila 2005). En el camp de la descontaminació sovint es confia únicament en els resultats químics per valorar l'eficiència de la bioremediació, sense tenir en compte els nombrosos indicadors que brinden les tècniques biològiques per avaluar el rendiment microbià. No obstant, per determinar els resultats de la bioremediació, no és suficient mesurar la disminució de la concentració de contaminants al sòl o aqüífer contaminat, sinó que s'han de tenir en compte també els processos microbians implicats (Margesin 2000). La investigació biològica del sòl o l'aqüífer dona informació clau sobre l'impacte del contaminant en les poblacions (Schinner 1996) així com sobre la resposta d'aquestes davant el contaminant.

L'ús d'activitat biològica com a eina indicadora de l'eliminació dels contaminants ha estat emprada amb èxit variable (Maila 2005). Entre els diversos indicadors avaluats, es troben les comunitats microbianes, els enzims, i els gens funcionals implicats. Pel que fa a l'avaluació de la toxicitat, els assajos de toxicitat descrits empen diversos organismes, comunament el test Microtox® (*Vibrio fischeri*), i els lombrícids (*Eisenia foetida*).

La composició de la comunitat microbiana i la seva activitat determinen l'eficiència en la degradació d'hidrocarburs (Rittman 06). Entre els mètodes emprats per caracteritzar i quantificar la microbiota, es troben la quantificació de la biomassa microbiana, els comptatges de microorganismes, la respirometria, l'evolució de la comunitat microbiana i la presència de gens relacionats amb la degradació de contaminants.

Entre els enzims testats per monitoritzar la degradació d'hidrocarburs, s'hi troben les oxigenases, les lipases (Margesin 1999, Margesin 2000), les dehidrogenases (Van der Waarde 1995, Margesin 1997) i les catalases (Margesin 2000). S'ha de tenir en compte que aquestes tècniques han obtingut bons resultats testant-se a escala de laboratori.

La respiració microbiana, mesurada com a producció de CO<sub>2</sub>, representa la suma de totes les respiracions aeròbies al sòl (Riffaldi 06). Per tant, s'ha de tenir en compte que el CO<sub>2</sub> no procedeix forçosament de la degradació dels hidrocarburs al sòl, sinó que pot provenir també de la degradació de la matèria orgànica i la necromassa. Així mateix existeixen també embornals de CO<sub>2</sub> (Diplock 09).

L'avaluació de la toxicitat dels contaminants és també un paràmetre a considerar. Les interaccions sinèrgiques o antagòniques que es poden produir entre diversos contaminants i entre aquests i la matriu ambiental en la que es troben, determinaran els nivells de toxicitat (Maila 2005, Gandolfi 2010).

Entre tots els paràmetres considerats, els més acurats són l'activitat lipasa i la respiració microbiana (Riffaldi 05, Diplock 09).

D'altra banda, quan s'empren experiments *in vitro* per avaluar la biodegradabilitat dels productes objectiu, s'ha d'extrapolar les dades a escala de camp. Així doncs, existeix la necessitat de proporcionar un conjunt d'eines d'anàlisi que demostrin la base científica que apuntala el procés de la bioremediació als

gestors que la duen a terme. El major repte per a la bioremediació actualment és l'ús de dades obtingudes al laboratori per a la predicció *in situ*.

Un dels motius limitants per a l'adopció de la bioremediació arreu és precisament la dificultat a l'hora de predir punts finals amb seguretat. La major part de vegades, els estudis de laboratori sobreestimen significativament les taxes de degradació observades al camp (Diplock 2009), principalment a causa de les condicions òptimes al laboratori, però també degut a la heterogeneïtat de la matriu *in situ*.

És àmpliament acceptat que el potencial per a la bioremediació no pot ser monitoritzat de manera efectiva a través de la mesura d'un sol paràmetre. La probabilitat d'èxit és definida per la biodisponibilitat dels contaminant, l'abast de les restriccions i la capacitat de la microbiota indígena de degradar els contaminants objectiu (Paton 2003) i la biorespiració com a indicadora de l'estatus i potencial biodegradador (Dawson, 2007). Aquests han de ser, doncs, els paràmetres clau per a predir la possibilitat i verificar l'ocurrència de processos de biodegradació *in situ*.

### **Actuacions *in situ***

Els resultats obtinguts en els diversos experiments d'aquesta tesi s'han transmès als gestors de la contaminació de l'emplaçament objecte d'estudi, per tal d'aplicar el coneixement adquirit al laboratori a la presa de decisions en la gestió de la contaminació. Les actuacions s'han dut a terme tenint en compte tant els resultats obtinguts com experiències prèvies en el camp de la bioremediació.

En primer lloc, el gestor de l'emplaçament va eliminar la font contaminant (un antic dipòsit) excavant el sòl i bombant part de la fase lliure, per tal que no seguís actuant com a font de contaminació. Paral·lelament es va caracteritzar l'aquífer químicament i es van establir els pous de control, com es descriu al capítol 4.

Cal destacar la contribució a la identificació del tipus de contaminant. Els anàlisis químics realitzats en laboratoris comercials per part del gestor indicaven que es tractava d'un fuel d'entre 10 i 40 carbonis. Els resultats de la nostra caracterització (capítol 4) indicaren que l'aquífer estava contaminat per alquilbenzens (LABs). Tenint en compte que el fuel és una mescla complexa, contenint alguns components pesats i resistents a la biodegradació, i els LABs són una mescla d'un sol tipus de producte, amb una estructura més lleugera i simple, feia preveure la possibilitat d'aplicar amb èxit una bioremediació. Aquest fet posa de manifest la importància de realitzar les anàlisis químiques de manera acurada. Malauradament, la rapidesa i l'estalvi de costos van en detriment del seguiment d'un protocol rigorós incloent un *clean up* i una tria adequada dels patrons per a la quantificació. No s'ha d'oblidar que per tal de permetre el primer pas per a afrontar la gestió d'un emplaçament contaminat es necessita una bona identificació i caracterització dels compostos contaminants.

Els resultats obtinguts (capítol 5) posen de manifest la capacitat de la microbiota autòctona de degradar el contaminant quan són bioestimulades amb oxigen i nutrients (nitrogen i fòsfor), obtenint degradacions del 96% en 40 dies d'incubació *in vitro*.

Els resultats obtinguts al capítol 6 permeten considerar, després de la implementació d'un sistema de bioremediació amb oxigen i nutrients, la ocurrència d'un posterior procés d'atenuació natural monitoritzada, en condicions aeròbies o desnitrificants, per eliminar els possibles LABs romanents després d'aplicar una bioremediació aeròbia.

L'emplaçament, però, presenta una problemàtica molt particular a causa de la presència de fase lliure. El LNAPL és extremadament dens i viscos i la seva solubilitat és extremadament baixa. Aquesta fase lliure ha presentat dificultats a l'hora d'extreure-la emprant mètodes convencionals com ara el bombeig. L'ús de adsorbents passius limitat als piezòmetres ha permès retirar part del contaminant però es va mostrar insuficient. Per tal de millorar-ne la seva eliminació el gestor va optar per dissenyar i construir una barrera permeable formada per una sèrie de pous de 60 cm de diàmetre. Aquesta barrera intercepta i reté el front de la ploma contaminant de LNAPL. A l'interior dels pous, s'elimina l'hidrocarbur sobrenedant mitjançant materials absorbents. Alhora, s'hi duu a terme un bombament de l'aigua, a baix cabal, per assegurar el control hidràulic i sentit del flux cap a l'interior de la barrera.

Per tal d'abordar la problemàtica de la fase lliure es va plantejar la possibilitat d'avaluar l'ús de surfactants o oxidants químics. L'ús de surfactants es va descartar per la possibilitat d'un episodi de contaminació massiva de l'aquífer al facilitar la dissolució dels LABs. Per tant es va avaluar l'aplicació de diferents oxidants químics (capítol 7). Cap dels oxidants assajats va conduir a una millora en els resultats, descartant-se també aquesta metodologia.

Finalment, cal comentar el paper de les tècniques d'ecologia microbiana i biologia molecular en el context de la bioremediació. Aquestes tècniques poden servir com a indicadors tant de la possibilitat de dur a terme una bioremediació com de l'ocurrència d'aquesta *in situ*. L'anàlisi de l'efectivitat de la degradació al camp és mesurada actualment principalment mitjançant mètodes químics, però podria ser mesurada emprant tècniques biològiques. Aquestes tecnologies, cada cop més assequibles, poden ser una opció a considerar a l'hora de plantejar estratègies de bioremediació o atenuació natural.





# Capítol 11

## Conclusions



## Conclusions

En la present tesi doctoral s'ha avaluat diverses aproximacions per a la remediació d'un emplaçament real contaminat per alquilbenzens lineals; i s'ha caracteritzat les poblacions microbianes presents i la dinàmica de les poblacions enfront les diverses aproximacions considerades.

En l'avaluació de les aproximacions per a la remediació de l'emplaçament es pot concloure el següent:

- Els LABs són biodegradables en condicions aeròbies i desnitrificants per part presentant en aquest segon cas una fase de latència i una degradació més lenta. L'estratègia seqüencial de degradació ha permès aconseguir percentatges de degradació dels LABs equiparables als obtinguts amb la bioestimulació aeròbia, amb una molt menor addició d'oxigen. Durant la seva biodegradació presenten un patró de degradació preferent, en concordança amb estudis previs, essent més biodegradables els isòmers amb cadenes més curtes i anells aromàtics situats en posicions laterals.
- L'oxidació química o l'acoblament de les tecnologies d'oxidació química i biodegradació en *batch* no aconsegueixen millorar els resultats obtinguts amb la bioremediació sola. Així mateix, l'aplicació d'oxidants químics en sòl contaminat per LABs no fa incrementar la seva biodisponibilitat.
- En l'avaluació de la biodegradació i l'oxidació química en columna, el temps de reacció no ha estat prou llarg, tot i que en experiments previs en *batch* han mostrat degradació en els mateixos lapses de temps. Si que s'ha observat degradació en els assajos posteriors de biodegradació en *batch*, confirmant la capacitat degradadora de les poblacions, per una banda, i l'afectació de la biodegradació per part de les condicions ambientals.

En relació amb la caracterització i estudi de les comunitats microbianes implicades in situ i implicades en la degradació, s'ha observat el següent:

- *Parvibaculum lavamentivorans* s'ha descrit com a degradador de LABs en cultiu pur i condicions aeròbies, jugant un paper principal en la degradació de LABs o dels seus metabòlits en les mostres de bioestimulació. Aquest gènere pren especial rellevància en la bioestimulació desnitrificant.
- És interessant el possible ús d'indicadors microbiològics de la contaminació. La presència del phylum Actinobacteria en concentracions relativament elevades es pot associar a àrees de l'emplaçament sense contaminar, mentre que a les àrees amb presència de LABs incrementen els betaproteobacteris, en detriment d'aquest phylum. Els gèneres *Dechloromonas* i *Aminobacter* actuen també com a indicadors de la contaminació.
- En totes les mostres s'han identificat taxons aerobis facultatius, confirmant la idea de poblacions adaptades a les condicions fluctuants in situ.
- Emprant tecnologies de fingerprinting com el DGGE, al llarg de la biodegradació in vitro, s'observa una gradació en la predominància de les diverses classes de microorganisme. Durant les primeres fases de la biodegradació hi ha una predominança del grup of  $\beta$ -proteobacteria, i al llarg de la degradació incrementa la presència dels grups  $\alpha$ -proteobacteria i  $\gamma$ -proteobacteria en detriment del primer.
- A l'hora de caracteritzar les comunitats microbianes, tant in situ com in vitro, existeixen diferències considerables entre els resultats obtinguts per les diverses tècniques, tant pel que fa a l'estructura poblacional com pels gèneres

## Conclusions

detectats. No existeix cap tècnica idònia per caracteritzar les poblacions microbianes: la combinació d'eines clàssiques i moleculars, considerant tant les tècniques de fingerprinting com les de seqüenciació massiva, és l'aproximació més encertada.

- Les tècniques de seqüenciació massiva permeten una aproximació quantitativa i precisa a les poblacions microbianes existents. Cal però ser conscient de les limitacions que presenten i complementar-les amb altres tecnologies.

- L'aplicació de BioSeps per a la formació de biofilms permet obtenir informació sobre les poblacions microbianes metabòlicament actives. La diferenciació de poblacions i estructures microbianes entre els BioSeps dopats i no dopats reflexa les variacions poblacionals in situ relacionades amb la presència del contaminant.

- La quantificació de gens funcionals relacionats amb la degradació dels hidrocarburs permet complementar els estudis poblacionals, i donar informació sobre les capacitats i potencialitats de les poblacions microbianes existents.

# Referències



- Aburto-Medina, A., Adetutu, E. M., Aleer, S., Weber, J., Patil, S. S., Sheppard, P. J., et al. (2012). Comparison of indigenous and exogenous microbial populations during slurry phase biodegradation of long-term hydrocarbon-contaminated soil. *Biodegradation*, 23(6), 813-822.
- Agència catalana de l'aigua. Consultat Gener, 2013, URL: <http://aca-web.gencat.cat/>
- Agència Catalana de l'Aigua. Guia tècnica: Valors genèrics per a la restauració d'aigües subterrànies (projecte QUASAR) Consultat Gener, 2013, URL: <http://aca-web.gencat.cat/>
- Albaigés, J., Farrán, A., Soler, M., Gallifa, A., & Martin, P. (1987). Accumulation and distribution of biogenic and pollutant hydrocarbons, pcbs and ddt in tissues of western mediterranean fishes. *Marine Environmental Research*, 22(1), 1-18.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*. London: Academic Press.
- Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*, 34(20), 4259-4265.
- Allen, J. P., Atekwana, E. A., Atekwana, E. A., Duris, J. W., Werkema, D. D., & Rossbach, S. (2007). The microbial community structure in petroleum-contaminated sediments corresponds to geophysical signatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2860-2870.
- Almendariz, F. J., Meraz, M., Soberon, G., & Monroy, O. (2001). Degradation of lineal alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a pseudomonas aeruginosa (M113) strain. *Water Science and Technology : A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 44(4), 183-188.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Microbiol Methods*, 215, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Amund, O. O., & Higgins, I. J. (1985). The degradation of 1-phenylalkanes by an oil-degrading strain of acinetobacter lwoffii. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 51(1), 45-56.
- Andreoni, V., Bernasconi, S., Colombo, M., Van Beilen, J. B., & Cavalca, L. (2000). Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in rhodococcus sp. strain 1BN. *Environmental Microbiology*, 2(5), 572-577.
- Angelidaki, I., Torang, L., Waul, C. M., & Schmidt, J. E. (2004). Anaerobic bioprocessing of sewage sludge, focusing on degradation of linear alkylbenzene sulfonates (LAS). *Water Science and Technology : A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 49(10), 115-122.
- Angley, J.T., Brusseau, M.L., Miller, W.L., & Delfino, J.J. (1992). Nonequilibrium sorption and aerobic biodegradation of dissolved alkylbenzenes during transport in aquifer material: Column experiments and evaluation of a coupled-process model. *Environmental Science & Technology*, 26(7), 1404-1410.
- Armougom, F., & Raoult, D. (2009). Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods.
- Atlas, R. M. (1981). *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective*.
- Atlas, R. M. (1995). Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12), 178-182.
- Bacosa, H. P., Suto, K., & Inoue, C. (2012). Bacterial community dynamics during the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 74(0), 109-115.

- Bacosa, H., Suto, K., & Inoue, C. (2010). Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(8), 702-710.
- Baldwin, B. R., Nakatsu, C. H., & Nies, L. (2003). Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3350-3358.
- Bayona, J. M., Albaigés, J., Solanas, A. M., & Grifoll, M. (1986). Selective aerobic degradation of linear alkylbenzenes by pure microbial cultures. *Chemosphere*, 15(5), 595-598.
- Bayona, J. M., Albaigés, J., Solanas, A. M., Pares, R., Garrigues, P., & Ewald, M. (1986). Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial culture. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 23(4), 289-303.
- Beller, H. R., Kane, S. R., Legler, T. C., & Alvarez, P. J. (2002). A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environmental Science & Technology*, 36(18), 3977-3984.
- Beller, H. R., Kane, S. R., Legler, T. C., McKelvie, J. R., Sherwood, B., Pearson, F., et al. (2008). Comparative assessments of benzene, toluene, and xylene natural attenuation by quantitative polymerase chain reaction analysis of a catabolic gene, signature metabolites, and compound-specific isotope analysis. *Environmental Science & Technology*, 42(16), 6065-6072.
- Bento, F. M., Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96(9), 1049-1055.
- Bertilsson, S., Cavanaugh, C. M., & Polz, M. F. (2002). Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6077-6086.
- Biggerstaff, J. P., Le Puil, M., Weidow, B. L., Leblanc-Gridley, J., Jennings, E., Busch-Harris, J., et al. (2007). A novel and in situ technique for the quantitative detection of MTBE and benzene degrading bacteria in contaminated matrices. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 437-441.
- Blothe, M., & Roden, E. E. (2009). Microbial iron redox cycling in a circumneutral-pH groundwater seep. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 468-473.
- Boll, M., Fuchs, G., & Heider, J. (2002). Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(5), 604-611.
- Breedveld, G., & Sparrevik, M. (2000). Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation*, 11(6), 391-399.
- Bui, C. T., & Cotton, R. G. H. (2002). Comparative study of permanganate oxidation reactions of nucleotide bases by spectroscopy. *Bioorganic Chemistry*, 30(2), 133-137.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
- Callaghan, A. V., Tierney, M., Phelps, C. D., & Young, L. Y. (2009). Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1339-1344.
- Calvo, C., Silva-Castro, G., Uad, I., Garcia Fandiao, C., Laguna, J., & González-López, J. (2008). Efficiency of the EPS emulsifier produced by *ochrobactrum anthropi* in



- different hydrocarbon bioremediation assays. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 1493-1501.
- Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229-248.
- Capelli, M. S., Busalmen, J. P., & de Sánchez, S. R. (2001). Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47(4), 233-238.
- Cassidy, D., Northup, A., & Hampton, D. (2009). The effect of three chemical oxidants on subsequent biodegradation of 2,4-dinitrotoluene (DNT) in batch slurry reactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(6), 820-826.
- Cerniglia, C. (1984). Microbial transformation of aromatic hydrocarbons.
- Cerniglia, C. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2-3), 351-368.
- Chakraborty, R., O'Connor, S. M., Chan, E., & Coates, J. D. (2005). Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by dechloromonas strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8649-8655.
- Chaloux, N., Bayona, J. M., Venkatesan, M. I., & Albaiges, J. (1992). Distribution of surfactant markers in sediments from santa monica basin, southern california. *Marine Pollution Bulletin*, 24(8), 403-407.
- Chapelle, F. H. (1999). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: The perspectives of history and hydrology. *Ground Water*, 37(1), 122-132.
- ChemSystems. (2009). *Report abstract: Linear alkylbenzene (LAB) No. PERPR07/08S*. ChemSystems.
- Clemente, J. C., Jansson, J., & Valiente, G. (2010). Accurate taxonomic assignment of short pyrosequencing reads. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, , 3-9.
- Coates, J. D., Chakraborty, R., Lack, J. G., O'Connor, S. M., Cole, K. A., Bender, K. S., et al. (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of dechloromonas. *Nature*, 411(6841), 1039-1043.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., et al. (2005). The ribosomal database project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 33 (Database issue), D294-6.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., et al. (2009). The ribosomal database project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D141-5.
- Coyne, M. S., & Tiedje, J. M. (1990). Induction of denitrifying enzymes in oxygen-limited achromobacter cycloclastes continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*, 73(3), 263-270.
- Crimi, M. L., & Siegrist, R. L. (2003). Geochemical effects on metals following permanganate oxidation of DNAPLs. *Ground Water*, 41(4), 458-469.
- Crimi, M., & Taylor, J. (2007). Experimental evaluation of catalyzed hydrogen peroxide and sodium persulfate for destruction of BTEX contaminants. *Soil and Sediment Contamination*, 16, 29-45.
- Cuypers, C., Grotenhuis, T., Joziassse, J., & Rulkens, W. (2000). Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments. *Environmental Science & Technology*, 34(10), 2057-2063.
- Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., & Rulkens, W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere*, 46(8), 1235-1245.

- Das, N., & Chandran, P. (2011). *Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview*
- Dash, S., Patel, S., & Mishra, B. K. (2009). ChemInform abstract: Oxidation by permanganate: Synthetic and mechanistic aspects. *Cheminform*, 40(17).
- Dawson, J. J. C., Godsiffe, E. J., Thompson, I. P., Ralebitso-Senior, T. K., Killham, K. S., & Paton, G. I. (2007). Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 164-177.
- Diplock, E. E., Mardlin, D. P., Killham, K. S., & Paton, G. I. (2009). Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale. *Environmental Pollution*, 157(6), 1831-1840.
- Doi, Y., Takaya, N., & Takizawa, N. (2009). Novel denitrifying bacterium *ochrobactrum anthropi* YD50.2 tolerates high levels of reactive nitrogen oxides. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5186-5194.
- Dong, W., Eichhorn, P., Radajewski, S., Schleheck, D., Denger, K., Knepper, T. P., et al. (2004). *Parvibaculum lavamentivorans* converts linear alkylbenzenesulphonate surfactant to sulphophenylcarboxylates, alpha,beta-unsaturated sulphophenylcarboxylates and sulphophenyldicarboxylates, which are degraded in communities. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 630-640.
- dos Santos, H. F., Cury, J. C., do Carmo, F. L., dos Santos, A. L. s., Tiedje, J., van Elsas, J. D., et al. (2011). Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: Bacterial proxies for oil pollution. *Plos One*, 6(3), e16943.
- Douros, J. D., & Frankenfeld, J. W. (1968). Oxidation of alkylbenzenes by a strain of *micrococcus cerificans* growing on n-paraffins. *Applied Microbiology*, 16(3), 532-533.
- Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeegan, T., Hagevoort, R. G., et al. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*, 8, 125.
- Dutta, T. K., & Harayama, S. (2001). Analysis of long-side-chain alkylaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment. *Environmental Science & Technology*, 35(1), 102-107.
- Dutta, T. K. (2005). Origin, occurrence, and biodegradation of long-side-chain alkyl compounds in the environment: A review. *Environmental Geochemistry and Health*, 27(3), 271-284.
- Edwards, D. A., Luthy, R. G., & Liu, Z. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environmental Science & Technology*, 25(1), 127-133.
- Eganhouse, R. P. (1986). Long-chain alkylbenzenes: Their analytical chemistry, environmental occurrence and fate. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 26(3-4), 241-263.
- Eganhouse, R. P., Blumfield, D. L., & Kaplan, I. R. (1983). Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. *Environmental Science & Technology*, 17(9), 523-530.
- Engelbrekton, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., et al. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness.
- Engelbrekton, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., et al. (2010). Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *The ISME Journal*, 4(5), 642-647.
- Environmental Protection Agency. (2006). In-situ chemical oxidation. Engineering issue. (No. EPA/600/R-06/072)

- Environmental Protection Agency (2000). Remediation technologies. [citat el 20 de febrer de 2012] <http://www.epa.gov/superfund/remedytech/remed.htm>
- European Environment Agency. (2012). European waters - assessment of status and pressures (No. 978-92-9213-339-9)
- Euzéby JP. 2008. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. [citat el 20 de febrer de 2012]. <http://www.bacterio.cict.fr/number.html>
- Eweis, J. B. (1999). Principios de biorrecuperación (bioremediation): Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. Madrid etc.: McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Feinstein, L. M., Sul, W. J., & Blackwood, C. B. (2009). Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5428-5433.
- Feng, Y., Khoo, H. E., & Poh, C. L. (1999). Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from pseudomonas alcaligenes NCIB 9867 and pseudomonas putida NCIB 9869. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 946-950.
- Ferrarese, E., Andreottola, G., & Oprea, I. A. (2008). Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 128-139.
- Flathman, P. E., Jerger, D. E., & Exner, J. H. (Eds.). (1994). *Bioremediation: Field experience*. FL: Lewis publishers.
- Gamble, T. N., Betlach, M. R., & Tiedje, J. M. (1977). Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(4), 926-939.
- Gan, H. M., Shahir, S., Ibrahim, Z., & Yahya, A. (2011). Biodegradation of 4-aminobenzenesulfonate by ralstonia sp. PBA and hydrogenophaga sp. PBC isolated from textile wastewater treatment plant. *Chemosphere*, 82(4), 507-513.
- Gandolfi, I., Sicolo, M., Franzetti, A., Fontanarosa, E., Santagostino, A., & Bestetti, G. (2010). Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresource Technology*, 101(2), 568-575.
- Gentile, G., Bonasera, V., Amico, C., Giuliano, L., & Yakimov, M. M. (2003). Shewanella sp. GA-22, a psychrophilic hydrocarbonoclastic antarctic bacterium producing polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1124-1133.
- Geyer, R., Peacock, A. D., Miltner, A., Richnow, H. -, White, D. C., Sublette, K. L., et al. (2005). In situ assessment of biodegradation potential using biotrap amended with <sup>13</sup>C-labeled benzene or toluene. *Environmental Science & Technology*, 39(13), 4983-4989.
- Ghevariya, C. M., Bhatt, J. K., & Dave, B. P. (2011). Enhanced chrysene degradation by halotolerant achromobacter xylooxidans using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 102(20), 9668-9674.
- Ginige, M. P., Hugenholtz, P., Daims, H., Wagner, M., Keller, J., & Blackall, L. L. (2004). Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 588-596.
- Giovannoni, S.J., & Stingl, Ulrich. Molecular diversity and ecology of microbial plankton.
- Giovannoni, S. J., & Stingl, U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature*, 437(7057), 343-348.

## Referències

- Gledhill, W. E., Saeger, V. W., & Trehy, M. L. (1991). An aquatic environmental safety assessment of linear alkylbenzene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(2), 169-178.
- Gogotov, I. N., & Khodakov, R. S. (2008). Surfactant production by the rhodococcus erythropolis sH-5 bacterium grown on various carbon sources. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 186-191.
- Goi, A., Kulik, N., & Trapido, M. (2006). Combined chemical and biological treatment of oil contaminated soil. *Chemosphere*, 63(10), 1754-1763.
- Gordon, L., & Dobson, A. W. (2001). Fluoranthene degradation in pseudomonas alcaligenes PA-10. *Biodegradation*, 12(6), 393-400.
- Gray, N. D., & Head, I. M. (2001). Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environmental Microbiology*, 3(8), 481-492.
- Greene, E. A., Kay, J. G., Jaber, K., Stehmeier, L. G., & Voordouw, G. (2000). Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5282-5289.
- Griebler, C., & Lueders, T. (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 54(4), 649-677.
- Grimberg, S. J., Stringfellow, W. T., & Aitken, M. D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by pseudomonas stutzeri P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2387-2392.
- Grishchenkov, V. G., Townsend, R. T., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Bonner, J. S., & Boronin, A. M. (2000). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 35(9), 889-896.
- Grotenhuis, T., & Rijnaarts, H. (2011). In situ remediation technologies. In F. A. Swartjes (Ed.), (pp. 949-977) Springer Netherlands.
- Guerin, W. F., & Boyd, S. A. (1995). Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in pseudomonas putida and an alcaligenes sp. under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 4061-4068.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., et al. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21(3), 494-504.
- Haigler, B. E., Pettigrew, C. A., & Spain, J. C. (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by pseudomonas sp. strain JS150. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2237-2244.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hareland, W. A., Crawford, R. L., Chapman, P. J., & Dagley, S. (1975). Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from pseudomonas acidovorans. *Journal of Bacteriology*, 121(1), 272-285.
- Haselow, J. S., Siegrist, R. L., Crimi, M., & Jarosch, T. (2003). Estimating the total oxidant demand for in situ chemical oxidation design. *Remediation Journal*, 13(4), 5-16.
- Hess, A., Zarda, B., Hahn, D., Haner, A., Stax, D., Hohener, P., et al. (1997). In situ analysis of denitrifying toluene- and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2136-2141.
- Heylen, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., et al. (2006). The incidence of nirS and nirK and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 8(11), 2012-2021.

- Holliger, C., & Zehnder, A. (1996). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(3), 326-330.
- Huddleston, R., & Allred, R. (1963). Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes. *Dev. Ind. Microbiol*, 4, 24-38.
- Huling, S. G., & Pivetz, B. E. (2006). *In-Situ Chemical Oxidation*.
- Hund, K., & Traunspurger, W. (1994). Ecotox-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere*, 29(2), 371-390.
- Imlay, J., & Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240 (4857), 1302-1309.
- Ishiwatari, R., Uzaki, M., & Yamada, K. (1994). Carbon isotope composition of individual n-alkanes in recent sediments. *Organic Geochemistry*, 21(6-7), 801-808.
- Ivanova, A. E., Borzenkov, I. A., Strelkova, E. A., Hoai, N., Lan, D., Belyaev, S. S., et al. (2012). Taxonomic diversity of aerobic organotrophic bacteria from clean vietnamese soils and their capacity for oxidation of petroleum hydrocarbons. *Microbiology*, 81(2), 233-243.
- Iwai, S., Johnson, T. A., Chai, B., Hashsham, S. A., & Tiedje, J. M. (2011). Comparison of the specificities and efficacies of primers for aromatic dioxygenase gene analysis of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3551-3557.
- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: Analysis of acatalasaemic saccharomyces cerevisiae. *The Biochemical Journal*, 320 ( Pt 1)(Pt 1), 61-67.
- Jimbo, Y., Okano, K., Shimizu, K., Maseda, H., Fujimoto, N., Utsumi, M., et al. (2010). Quantification of microcystin-degrading bacteria in a biofilm from a practical biological treatment facility by real-time PCR. *Journal of Water and Environment Technology*, 8(3), 193-201.
- Jiménez-García, N. (2010). *Biodegradació i bioremediació de fuel del prestige: Caracterització química i comunitats microbianes implicades*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1), 71-84.
- Johnsen, K., Andersen, S., & Jacobsen, C. S. (1996). Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent pseudomonas biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3818-3825.
- Johnson, S. J. (2003). *Microbial degradation of linear alkylbenzene cable oil in soil and aqueous culture under aerobic and anaerobic conditions*. Unpublished The Institute for Infrastructure and Environment, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Johnson, S. J., Barry, D. A., Christofi, N., & Patel, D. (2001). Potential for anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene cable oils: Literature review and preliminary investigation. *Land Contamination & Reclamation*, 9(3), 279.
- Johnson, S. J., Barry, D. A., & Christofi, N. (2007). Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene: Isomeric ratio as a monitoring tool. *Land Contamination & Reclamation*, 15(2), 235.
- Johnson, S. J., Castan, M., Proudfoot, L., Barry, D. A., & Christofi, N. (2007). Acute toxicity of linear alkylbenzene to caenorhabditis elegans maupas, 1900 in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(1), 41-44.
- Juck, D., Charles, T., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(3), 241-249.

## Referències

- Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1-2), 57-88.
- Junca, H., & Pieper, D., H. (2010). Functional marker gene assays for hydrocarbon degrading microbial communities: Aerobic. (pp. 4289-4312)
- Jung, H., Ahn, Y., Choi, H., & Kim, I. S. (2005). Effects of in-situ ozonation on indigenous microorganisms in diesel contaminated soil: Survival and regrowth. *Chemosphere*, 61(7), 923-932.
- Kabelitz, N., Machackova, J., Imfeld, G., Brennerova, M., Pieper, D. H., Heipieper, H. J., et al. (2009). Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 565-577.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J., & Szewzyk, U. (1999). *Aquabacterium* gen. nov., with description of *aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *aquabacterium parvum* sp. nov. and *aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the berlin drinking water system. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 2, 769-777.
- Kanally, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tscherko, D., Bru, D., & Philippot, L. (2006). Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957-5962.
- Kang, Y. W., & Hwang, K. Y. (2000). Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the fenton process. *Water Research*, 34(10), 2786-2790.
- Kao, C. M., Huang, K. D., Wang, J. Y., Chen, T. Y., & Chien, H. Y. (2008). Application of potassium permanganate as an oxidant for in situ oxidation of trichloroethylene-contaminated groundwater: A laboratory and kinetics study. *Journal of Hazardous Materials*, 153(3), 919-927.
- Kao, C. M., & Wu, M. J. (2000). Enhanced TCDD degradation by fenton's reagent preoxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 74(3), 197-211.
- Kaplan, C. W., & Kitts, C. L. (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1777-1786.
- Karrick, N. L. (1977). Alteration in petroleum resulting from physical-chemical and microbiological factors. A: Ed. effects of petroleum on arctic and subarctic environments and organisms. In Malins DC (Ed.), *Nature and fate of petroleum vol 1. new york:Academic press, inc.* ()
- Kasai, Y., Takahata, Y., Hoaki, T., & Watanabe, K. (2005). Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. *Environmental Microbiology*, 7(6), 806-818.
- Kazy, S., Monier, A., & Alvarez, P. (2010). Assessing the correlation between anaerobic toluene degradation activity and *bssA* concentrations in hydrocarbon-contaminated aquifer material. *Biodegradation*, (5), 793-800.
- Kerstens, K., Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the proteobacteria. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds.), (pp. 3-37) Springer New York.
- Khan, S. T., Horiba, Y., Takahashi, N., & Hiraishi, A. (2007). Activity and community composition of denitrifying bacteria in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-using solid-phase denitrification processes. *Microbes and Environments*, 22(1), 20-31.

- Kim, D., Kim, Y. S., Kim, S. K., Kim, S. W., Zylstra, G. J., Kim, Y. M., et al. (2002). Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by rhodococcus sp. strain DK17. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3270-3278.
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 81-87.
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 49-63.
- Klein, J. (2001). Possibilities, limits and future developments of soil bioremediation. *Biotechnology set* (pp. 465-476) Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Klein, J. (2001; 2008). Possibilities, limits and future developments of soil bioremediation. *Biotechnology set* (pp. 465-476) Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Kloos, K., Munch, J. C., & Schloter, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 486-496.
- Knight, V. K., Berman, M. H., & Häggblom, M. M. (2003). Biotransformation of 3,5-dibromo-4-hydroxybenzotrile under denitrifying, Fe(III)-reducing, sulfidogenic, and methanogenic conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(3), 540-544.
- Kolton, M., Meller Harel, Y., Pasternak, Z., Graber, E. R., Elad, Y., & Cytryn, E. (2011). Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4924-4930.
- Kolvenbach, B. A., & Corvini, P. F. -. (2012). The degradation of alkylphenols by sphingomonas sp. strain TTNP3 – a review on seven years of research. *New Biotechnology*, 30(1), 88-95.
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., et al. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962-7974.
- Koukkou, A. (2011). *Microbial bioremediation of non-metals :Current research*. Norfolk: Caister Academic.
- Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., & Tuhkanen, T. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 78(4), 382-391.
- Labbé, D., Margesin, R., Schinner, F., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2007). Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated alpine soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 466-475.
- Lambo, A. J., & Patel, T. R. (2006). Cometabolic degradation of polychlorinated biphenyls at low temperature by psychrotolerant bacterium hydrogenophaga sp. IA3-A. *Current Microbiology*, 53(1), 48-52.
- Lee, B. D., & Hosomi, M. (2001). A hybrid fenton oxidation–microbial treatment for soil highly contaminated with benz(a)anthracene. *Chemosphere*, 43(8), 1127-1132.
- Lehman, R. M., Colwell, F. S., & Bala, G. A. (2001). Attached and unattached microbial communities in a simulated basalt aquifer under fracture- and porous-flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2799-2809.
- Leutwein, C., & Heider, J. (1999). Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying thauera aromatica: Activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology (Reading, England)*, 145 ( Pt 11)(Pt 11), 3265-3271.

- Lewis, J., & Sjostrom, J. (2010). Optimizing the experimental design of soil columns in saturated and unsaturated transport experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, 115(1-4), 1-13.
- Li, C., Ji, R., Vinken, R., Hommes, G., Bertmer, M., Schäffer, A., et al. (2007). Role of dissolved humic acids in the biodegradation of a single isomer of nonylphenol by sphingomonas sp. *Chemosphere*, 68(11), 2172-2180.
- Li, W., Wang, L. Y., Duan, R. Y., Liu, J. F., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2012). Microbial community characteristics of petroleum reservoir production water amended with n-alkanes and incubated under nitrate-, sulfate-reducing and methanogenic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 69(0), 87-96.
- Liang, C., Huang, C. F., Mohanty, N., & Kurakalva, R. M. (2008). A rapid spectrophotometric determination of persulfate anion in ISCO. *Chemosphere*, 73(9), 1540-1543.
- Liang, Q., & Lloyd-Jones, G. (2010). Sphingobium scionense sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 2), 413-416.
- Liang, Y., Nostrand, J. D., Wang, J., Zhang, X., Zhou, J., & Li, G. (2009). Microarray-based functional gene analysis of soil microbial communities during ozonation and biodegradation of crude oil. *Chemosphere*, 75(2), 193-199. 10.1016/j.chemosphere.2008.12.007
- Lindstrom, J. E., Barry, R. P., & Braddock, J. F. (1999). Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(12), 1677-1689.
- Liu, Y. J., Zhang, A. N., & Wang, X. C. (2009). Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of acinetobacter sp. XA05 and sphingomonas sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2-3), 187-192.
- Liu, Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research*, 36(18), e120.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., & Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(18), e120.
- Liu, Z. P., Wang, B. J., Liu, Y. H., & Liu, S. J. (2005). Novosphingobium taihuense sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from taihu lake, china. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 3), 1229-1232.
- Lobner, T., Torang, L., Batstone, D. J., Schmidt, J. E., & Angelidaki, I. (2005). Effects of process stability on anaerobic biodegradation of LAS in UASB reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(7), 759-765.
- Lu, M., Zhang, Z., Qiao, W., Wei, X., Guan, Y., Ma, Q., et al. (2010). Remediation of petroleum-contaminated soil after composting by sequential treatment with fenton-like oxidation and biodegradation. *Bioresource Technology*, 101(7), 2106-2113.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Jr, Saxman, P. R., Stredwick, J. M., et al. (2000). The RDP (ribosomal database project) continues. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 173-174.
- Maier, R. M., & Soberon-Chavez, G. (2000). Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 625-633.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics : TIG*, 24(3), 133-141.



- Margesin, R., Hammerle, M., & Tscherko, D. (2007). Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, 53(2), 259-269.
- Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3085-3092.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40(4), 339-346.
- Martinez-Pascual, E., Jimenez, N., Vidal-Gavilan, G., Vinas, M., & Solanas, A. M. (2010). Chemical and microbial community analysis during aerobic biostimulation assays of non-sulfonated alkyl-benzene-contaminated groundwater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 985-995.
- Massias, D., Grossi, V., & Bertrand, J. C. (2003). In situ anaerobic degradation of petroleum alkanes in marine sediments: Preliminary results. *Comptes Rendus Geoscience*, 335(5), 435-439.
- Meckenstock, R. U., & Mouttaki, H. (2011). Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 406-414.
- Mesarch, M. B., Nakatsu, C. H., & Nies, L. (2000). Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 678-683.
- Mikkonen, A., Lappi, K., Wallenius, K., Lindström, K., & Suominen, L. (2011). Ecological inference on bacterial succession using curve-based community fingerprint data analysis, demonstrated with rhizoremediation experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(3), 604-616.
- Milton, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., et al. (2010). Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 669-681.
- Mogensen, A. S., & Ahring, B. K. (2002). Formation of metabolites during biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in an upflow anaerobic sludge bed reactor under thermophilic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(5), 483-488.
- Moller, S., Sternberg, C., Andersen, J. B., Christensen, B. B., Ramos, J. L., Givskov, M., et al. (1998). In situ gene expression in mixed-culture biofilms: Evidence of metabolic interactions between community members. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 721-732.
- Mori, H., Maruyama, F., & Kurokawa, K. (2010). VITCOMIC: Visualization tool for taxonomic compositions of microbial communities based on 16S rRNA gene sequences. *BMC Bioinformatics*, 11, 332.
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141.
- Nam, K., & Kukor, J. J. (2000). Combined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biodegradation*, 11(1), 1-9.
- Nam, K., Rodriguez, W., & Kukor, J. J. (2001). Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified fenton reaction. *Chemosphere*, 45(1), 11-20.

- Ndjou'ou, A. C., Bou-Nasr, J., & Cassidy, D. (2006). Effect of fenton reagent dose on coexisting chemical and microbial oxidation in soil. *Environmental Science & Technology*, 40(8), 2778-2783.
- Nocker, A., Burr, M., & Camper, A. K. (2007). Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54(2), 276-289.
- Ogino, A., Koshikawa, H., Nakahara, T., & Uchiyama, H. (2001). Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 625-635.
- Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. A. (2011). Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination— A review. *Science of the Total Environment*, 409(20), 4141-4166.
- Owsianiak, M., Chrzanowski, L., Szulc, A., Staniewski, J., Olszanowski, A., Olejnik-Schmidt, A. K., et al. (2009). Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresource Technology*, 100(3), 1497-1500.
- Palmroth, M. R., Langwaldt, J. H., Aunola, T. A., Goi, A., Munster, U., Puhakka, J. A., et al. (2006). Effect of modified fenton's reaction on microbial activity and removal of PAHs in creosote oil contaminated soil. *Biodegradation*, 17(2), 131-141.
- Palmroth, M. R., Langwaldt, J. H., Aunola, T. A., Goi, A., Munster, U., Puhakka, J. A., et al. (2006). Treatment of PAH-contaminated soil by combination of fenton's reaction and biodegradation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(4), 598-607.
- Pandey, A., Singh, P., & Iyengar, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(2), 73-84.
- Pandey, J., Chauhan, A., & Jain, R. K. (2009). Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 324-375.
- Pansu, M., & Gautheyrou, J. (2006). In Springer B., Germany. (Ed.), *Handbook of soil analysis: Mineralogical, organic and inorganic methods*
- Paton, G. I., Viventsova, E., Kumpene, J., Wilson, M. J., Weitz, H. J., & Dawson, J. J. C. (2006). An ecotoxicity assessment of contaminated forest soils from the kola peninsula. *Science of the Total Environment*, 355(1-3), 106-117.
- Peacock, A. D., Chang, Y. J., Istok, J. D., Krumholz, L., Geyer, R., Kinsall, B., et al. (2004). Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. *Microbial Ecology*, 47(3), 284-292.
- Pelz, O., Tesar, M., Wittich, R. M., Moore, E. R. B., Timmis, K. N., & Abraham, W. R. (1999). Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: Unravelling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environmental Microbiology*, 1(2), 167-174.
- Pérez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D. H., & González, B. (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 736-794.
- Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55(5), 856-866.
- Philippot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1577(3), 355-376.
- Pirnik, M. P., Atlas, R. M., & Bartha, R. (1974). Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: Normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology*, 119(3), 868-878.

- Powell, S. M., Ferguson, S. H., Bowman, J. P., & Snape, I. (2006). Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology*, *52*(3), 523-532.
- Prince, R. C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology*, *19*(4), 217-240.
- Prince, R. C., Garrett, R. M., Bare, R. E., Grossman, M. J., Townsend, T., Suflita, J. M., et al. (2003). The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. *Spill Science & Technology Bulletin*, *8*(2), 145-156.
- Quantin, C., Joner, E. J., Portal, J. M., & Berthelin, J. (2005). PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, *134*(2), 315-322.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., Riela, S., & Puglia, A. M. (2008). Isolation of gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated mediterranean shoreline. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(1), 251-259.
- Rabus, R., & Heider, J. (1998). Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, (5), 377-384.
- Rahman, K. S. M., & Gakpe, E. (2008). Production, characterisation and applications of biosurfactants - review. *Biotechnology*, *7*(2), 360-370.
- Rakowska, M. I., Kupryianchyk, D., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H. H. M., & Koelmans, A. A. (2013). Extraction of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons with granular activated carbon. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(2), 304-311.
- Rapala, J., Berg, K. A., Lyra, C., Niemi, R. M., Manz, W., Suomalainen, S., et al. (2005). *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(Pt 4), 1563-1568.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). METAGENOMICS: Genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, *38*(1), 525-552.
- Rittmann, B. E., Hausner, M., Löffler, F., Love, N. G., Muyzer, G., Okabe, S., et al. (2006). A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. *Environmental Science & Technology*, *40*(4), 1096-1103.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., et al. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, *1*(4), 283-290.
- Roh, S. W., Abell, G. C., Kim, K. H., Nam, Y. D., & Bae, J. W. (2010). Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends in Biotechnology*, *28*(6), 291-299.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, *11*(10), 2477-2490.
- Roling, W. F., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J., et al. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(11), 5537-5548.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(3), 249-252.
- Royo, J. L., Hidalgo, M., & Ruiz, A. (2007). Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping. *Nature Protocols*, *2*(7), 1734-1739.
- Ruggeri, C., Franzetti, A., Bestetti, G., Caredda, P., La Colla, P., Pintus, M., et al. (2009). Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria

- from hydrocarbon-contaminated environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(7), 936-942.
- Rusansky, S., Avigad, R., Michaeli, S., & Gutnick, D. L. (1987). Involvement of a plasmid in growth on and dispersion of crude oil by acinetobacter calcoaceticus RA57. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(8), 1918-1923.
- Sabate, J., Vinas, M., Bayona, J. M., & Solanas, A. M. (2003). Isolation and taxonomic and catabolic characterization of a 3,6-dimethylphenanthrene-utilizing strain of sphingomonas sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(2), 120-129.
- Sahl, J., & Munakata-Marr, J. (2006). The effects of in situ chemical oxidation on microbiological processes: A review. *Remediation Journal*, 16(3), 57-70.
- Saitoh, S., Iwasaki, K., & Yagi, O. (2003). Development of a most-probable-number method for enumerating denitrifying bacteria by using 96-well microtiter plates and an anaerobic culture System. *Microbes and Environments*, 18(4), 210.
- Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation [Abstract]. *Trends in Biotechnology*, 20(6) 243-248.
- Sariaslani, F. S., Harper, D. B., & Higgins, I. J. (1974). Microbial degradation of hydrocarbons. catabolism of 1-phenylalkanes by nocardia salmonicolor. *The Biochemical Journal*, 140(1), 31-45.
- Saul, D. J., Aislabie, J. M., Brown, C. E., Harris, L., & Foght, J. M. (2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around scott base, antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 141-155.
- Saviozzi, A., Cardelli, R., & Cozzolino, M. (2009). *Bioremediation with compost of a diesel contaminated soil : Monitoring by dehydrogenase activity and basal respiration*. Emmaus, PA, ETATS-UNIS: JG Press.
- Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R. (1995). *Methods in soil biology*.
- Schleheck, D., & Cook, A. M. (2005). Omega-oxygenation of the alkyl sidechain of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) surfactant in parvibaculum lavamentivorans(T). *Archives of Microbiology*, 183(6), 369-377.
- Schleheck, D., Knepper, T. P., Eichhorn, P., & Cook, A. M. (2007). Parvibaculum lavamentivorans DS-1T degrades centrally substituted congeners of commercial linear alkylbenzenesulfonate to sulfophenyl carboxylates and sulfophenyl dicarboxylates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4725-4732.
- Schleheck, D., Knepper, T. P., Fischer, K., & Cook, A. M. (2004). Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate by defined pairs of heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4053-4063.
- Schleheck, D., Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., & Cook, A. M. (2004). Parvibaculum lavamentivorans gen. nov., sp. nov., a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzenesulfonate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1489-1497.
- Schleheck, D., Weiss, M., Pitluck, S., Bruce, D., Land, M. L., Han, S., et al. (2011). Complete genome sequence of parvibaculum lavamentivorans type strain (DS-1(T)). *Standards in Genomic Sciences*, 5(3), 298-310.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F., & Tebbe, C. C. (2001). Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3557-3563.

- Selvaraj, P. T., Little, M. H., & Kaufman, E. N. (1997). Biodesulfurization of flue gases and other Sulfate/Sulfite waste streams using immobilized mixed sulfate-reducing bacteria. *Biotechnology Progress*, 13(5), 583-589.
- Shah, V., Shah, S., Kambhampati, M. S., Ambrose, J., Smith, N., Dowd, S. E., et al. (2011). Bacterial and archaea community present in the pine barrens forest of long island, NY: Unusually high percentage of ammonia oxidizing bacteria. *PLoS One*, 6(10), e26263.
- Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Mrkonjic Fuka, M., Engel, M., et al. (2007). Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 445-452.
- Shen, Z., Zhou, Y., Hu, J., & Wang, J. (2013). Denitrification performance and microbial diversity in a packed-bed bioreactor using biodegradable polymer as carbon source and biofilm support. *Journal of Hazardous Materials*, 250-251(0), 431-438.
- Sherblom, P. M., Gschwend, P. M., & Eganhouse, R. P. (1992). Aqueous solubilities, vapor pressures, and 1-octanol-water partition coefficients for C9-C14 linear alkylbenzenes. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 37(4), 394-399.
- Silva, D. N., Zagatto, P. J. P., Guardani, R., & Nascimento, C. A. O. (2005). Remediation of polluted soils contaminated with linear alkyl benzenes using fenton's reagent. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(spe), 257-265.
- Simonsen, A., Badawi, N., Anskjar, G. G., Albers, C. N., Sorensen, S. R., Sorensen, J., et al. (2012). Intermediate accumulation of metabolites results in a bottleneck for mineralisation of the herbicide metabolite 2,6-dichlorobenzamide (BAM) by aminobacter spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(1), 237-245.
- Singer, V. L., Jones, L. J., Yue, S. T., & Haugland, R. P. (1997). Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry*, 249(2), 228-238.
- Singh, A. American oils chemists' society. the future of LAB. Retrieved January, 2013, from <http://www.aocs.org/>
- Singh, A., & Ward, O. P. (2004). In Varma A. (Ed.), *Biodegradation and bioremediation* (Springer ed.). Berlin, Germany:
- Singleton, D. R., Ramirez, L. G., & Aitken, M. D. (2009). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading acidovorax strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2613-2620.
- Singleton, D. R., Richardson, S. D., & Aitken, M. D. (2011). Pyrosequencing analysis of bacterial communities in aerobic bioreactors treating polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Biodegradation*, 22(6), 1061-1073.
- Sipilä, T. P., Väisänen, P., Paulin, L., & Yrjälä, K. (2010). *Sphingobium* sp. HV3 degrades both herbicides and polyaromatic hydrocarbons using ortho- and meta-pathways with differential expression shown by RT-PCR. *Biodegradation*, 21(5), 771-784.
- Sivaganesan, M., Seifring, S., Varma, M., Haugland, R. A., & Shanks, O. C. (2008). A bayesian method for calculating real-time quantitative PCR calibration curves using absolute plasmid DNA standards. *BMC Bioinformatics*, 9, 120.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6-20.
- Smith, M. R. (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, 1(2-3), 191-206.
- Smith, M. R., & Ratledge, C. (1989). Catabolism of alkylbenzenes by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 68-75.

- Sohn, J. H., Kwon, K. K., Kang, J. H., Jung, H. B., & Kim, S. J. (2004). *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1483-1487.
- Spormann, A. M., & Widdel, F. (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 11(2-3), 85-105.
- Spring, S., Jackel, U., Wagner, M., & Kampfer, P. (2004). *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N<sub>2</sub>O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *aquaspirillum gracile* to *hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 1), 99-106.
- Srinandan, C. S., Shah, M., Patel, B., & Nerurkar, A. S. (2011). Assessment of denitrifying bacterial composition in activated sludge. *Bioresource Technology*, 102(20), 9481-9489.
- Stoffels, M., Amann, R., Ludwig, W., Hekmat, D., & Schleifer, K. H. (1998). Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 930-939.
- Sublette, K., Peacock, A., White, D., Davis, G., Ogles, D., Cook, D., et al. (2006). Monitoring subsurface microbial ecology in a sulfate-amended, gasoline-contaminated aquifer. *Ground Water Monitoring & Remediation*, 26(2), 70-78.
- Sublette, K. L., Plato, A., Woolsey, M., Yates, R. G., Camp, C., & Bair, T. (1996). Immobilization of a sulfide-oxidizing bacterium in a novel adsorbent biocatalyst support. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58(1), 1013-1019.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., & Harayama, S. (1997). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science & Technology*, 31(1), 45-51.
- Sutton, N. B., Gaans, P. e., Langenhoff, A. A. M., Maphosa, F., Smidt, H., Grotenhuis, T., et al. (2012). Biodegradation of aged diesel in diverse soil matrixes: Impact of environmental conditions and bioavailability on microbial remediation capacity. *Biodegradation*, , 1-12.
- Sutton, N. B., Grotenhuis, J. T., Langenhoff, A. A. M., & Rijnaarts, H. H. M. (2011). Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: A review of optimization strategies. *Journal of Soils and Sediments*, 11(1), 129-140.
- Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A. A., Grotenhuis, T., et al. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 619-630.
- Swisher, R. D., Kaelble, E. F., & Liu, S. K. (1961). Capillary gas chromatography of phenyldodecane alkylation and isomerization Mixtures1. *The Journal of Organic Chemistry*, 26(10), 4066-4069.
- Szoboszlai, S., Atzel, B., Kukolya, J., Toth, E. M., Marialigeti, K., Schumann, P., et al. (2008). *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 12), 2748-2754.
- Takada, H., & Ishiwatari, R. (1987). Linear alkylbenzenes in urban riverine environments in tokyo: Distribution, source, and behavior. *Environmental Science & Technology*, 21(9), 875-883.
- Takada, H., & Ishiwatari, R. (1990). Biodegradation experiments of linear alkylbenzenes (LABs): Isomeric composition of C<sub>12</sub> LABs as an indicator of the degree of LAB degradation in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 24(1), 86-91.

- Takada, H., Ishiwatari, R., & Ogura, N. (1992). Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in Tokyo bay sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 35(2), 141-156.
- Takeuchi, M., Hamana, K., & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus sphingomonas sensu stricto and three new genera, sphingobium, novosphingobium and sphingopyxis, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 4), 1405-1417.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Throckback, I. N., Enwall, K., Jarvis, A., & Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), 401-417.
- Torsvik, V., Ovreas, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570), 1064-1066.
- Tsai, T., Kao, C., Yeh, T., Liang, S., & Chien, H. (2008). Remediation of fuel oil-contaminated soils by a three-stage treatment system. *Environmental Engineering Science*, 26(3), 651.
- Tsitonaki, A., Petri, B., Crimi, M., Mosback, H., Siegrist, R. L., & Bkerg, P. L. (2010). In situ chemical oxidation of contaminated soil and groundwater using persulfate: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(1), 55-91.
- Tsitonaki, A., Smets, B. F., & Bjerg, P. L. (2008). Effects of heat-activated persulfate oxidation on soil microorganisms. *Water Research*, 42(4-5), 1013-1022.
- Ulrici, W. (2000). Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. *Biotechnology* (pp. 5-41) Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Ulrici, W. (2008). Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. *Biotechnology set* (pp. 5-41) Wiley-VCH Verlag GmbH.
- UpSoil project*. <http://www.upsoil.eu/>
- Urich, T., Lanzén, A., Qi, J., Huson, D. H., Schleper, C., & Schuster, S. C. (2008). *Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome*. PLoS One: Public Library of Science.
- Valderrama, C., Alessandri, R., Aunola, T., Cortina, J. L., Gamisans, X., & Tuhkanen, T. (2009). Oxidation by fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 594-602.
- van Beilen, J. B., & Witholt, B. (2003). Diversity, function, and biocatalytic applications of alkane oxygenases. . In B. Ollivier, & M. Magot (Eds.), *Petroleum microbiology* (American Society for Microbiology Press ed., ). Washington DC (USA): ASM Press.
- van Beilen, J. B., & Funhoff, E. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (1), 13-21.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., et al. (2006). Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 59-65.

- van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Rothlisberger, M., & Witholt, B. (2001). Analysis of pseudomonas putida alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: Evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 6), 1621-1630.
- van Elsas, J. D., & Boersma, F. G. H. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 77-87.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 67(4), 503-549.
- Venosa, A. D. (1998). Oil spill bioremediation on coastal shorelines: A critique. A: Sikdar SK, Irvine RI eds. bioremediation: Principles and practice. *Bioremediation technologies, vol. III*. (pp. 259-301) Lancaster PA: Technomic.
- Venosa, A. D., & Zhu, X. (2003). Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(2), 163-178.
- Verbaendert, I., Boon, N., De Vos, P., & Heylen, K. (2011). Denitrification is a common feature among members of the genus bacillus. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(5), 385-391.
- Vidal-Gavilan, G., & Orejudo, E. (2008). In Agència Catalana de l'Aigua (Ed.), *Guia d'atenuació natural monitoritzada d'aigües subterrànies contaminades per hidrocarburs derivats del petroli*
- Vidal-Gavilan, G., & Orejudo, E. (2008). In Agència Catalana de l'Aigua (Ed.), *Guia de bioremediació*
- Vilchez-Vargas, R., Junca, H., & Pieper, D. H. (2010). Metabolic networks, microbial ecology and omics technologies: Towards understanding in situ biodegradation processes. *Environmental Microbiology*, 12(12), 3089-3104.
- Viñas, M., Grifoll, M., Sabaté, J., & Solanas, A. M. (2002). Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 252-260.
- Vinas, M., Grifoll, M., Sabate, J., & Solanas, A. M. (2002). Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(5), 252-260.
- Volkering, F., Breure, A. M., & Rulkens, W. H. (1997). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8(6), 401-417.
- Waldemer, R. H., & Tratnyek, P. G. (2006). Kinetics of contaminant degradation by permanganate. *Environmental Science & Technology*, 40(3), 1055-1061.
- Wang, W., Wang, L., & Shao, Z. (2010). Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the subtropical seawater of xiamen island. *Microbial Ecology*, 60(2), 429-439.
- Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, 4(10), e7401.
- Watanabe, K., & Hamamura, N. (2003). Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 289-295.
- Watkinson, R. J., & Morgan, P. (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, 1(2-3), 79-92.
- Weert, J. P. A., Vinas, M., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2011). Degradation of 4-n-nonylphenol under nitrate reducing conditions. *Biodegradation*, 22(1), 175-187.



- Wentzel, A., Ellingsen, T., Kotlar, H. K., Zotchev, S., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *6*(6), 1209-1221.
- White, D. C., Gouffon, J. S., Peacock, A. D., Geyer, R., Biernacki, A., Davis, G. A., et al. (2003). Forensic analysis by comprehensive rapid detection of pathogens and contamination concentrated in biofilms in drinking water systems for water resource protection and management. *Environmental Forensics*, *4*(1), 63-74.
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, *12*(3), 259-276.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S., & Di Giovanni, G. D. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(7), 2545-2553.
- Wilhelms, A., Larter, S. R., Head, I., Farrimond, P., di-Primio, R., & Zwach, C. (2001). Biodegradation of oil in uplifted basins prevented by deep-burial sterilization. *Nature*, *411*(6841), 1034-1037.
- Wilkes, H., Rabus, R., Fischer, T., Armstroff, A., Behrends, A., & Widdel, F. (2002). Anaerobic degradation of *n*-hexane in a denitrifying bacterium: Further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via C-skeleton rearrangement. *Archives of Microbiology*, *177*(3), 235-243.
- Winderl, C., Schaefer, S., & Lueders, T. (2007). Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (*bssA*) genes as a functional marker. *Environmental Microbiology*, *9*(4), 1035-1046.
- Wrenn, B. A., & Venosa, A. D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, *42*(3), 252-258.
- Wu, G. D., Lewis, J. D., Hoffmann, C., Chen, Y. Y., Knight, R., Bittinger, K., et al. (2010). Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiology*, *10*, 206.
- Xiao, J., Guo, L., Wang, S., & Lu, Y. (2010). Comparative impact of cadmium on two phenanthrene-degrading bacteria isolated from cadmium and phenanthrene co-contaminated soil in china. *Journal of Hazardous Materials*, *174*(1-3), 818-823.
- Xie, G., & Barcelona, M. J. (2003). Sequential chemical oxidation and aerobic biodegradation of equivalent carbon number-based hydrocarbon fractions in jet fuel. *Environmental Science & Technology*, *37*(20), 4751-4760.
- Xu, J., Pancras, T., & Grotenhuis, T. (2011). Chemical oxidation of cable insulating oil contaminated soil. *Chemosphere*, *84*(2), 272-277.
- Yen, C. H., Chen, K. F., Kao, C. M., Liang, S. H., & Chen, T. Y. (2011). Application of persulfate to remediate petroleum hydrocarbon-contaminated soil: Feasibility and comparison with common oxidants. *Journal of Hazardous Materials*, *186*(2-3), 2097-2102.
- Yoon, S., Sanford, R., & Löffler, F. E. (2013). *Shewanella* spp. use acetate as electron donor for denitrification but not ferric iron or fumarate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*,
- Yu, C. P., Roh, H., & Chu, K. H. (2007). 17 $\beta$ -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. *Environmental Science & Technology*, *41*(2), 486-492.
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(8), 4800-4806.

## Referències

- Yuste, L., Corbella, M. E., Turiégano, M. J., Karlson, U., Puyet, A., & Rojo, F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(1), 69-75.
- Zhang, D. C., Mörtelmaier, C., & Margesin, R. (2012). Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 421-422(0), 184-196.
- Zhang, D., Mörtelmaier, C., & Margesin, R. (2012). Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 421-422(0), 184-196.
- Zhang, S. Y., Wang, Q. F., Wan, R., & Xie, S. G. (2011). Changes in bacterial community of anthracene bioremediation in municipal solid waste composting soil. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 12(9), 760-768.
- Zhao, B., Yeo, C. C., & Poh, C. L. (2005). Proteome investigation of the global regulatory role of ?54 in response to gentisate induction in pseudomonas alcaligenes NCIMB 9867. *Proteomics*, 5(7), 1868-1876.
- Zucchi, M., Angiolini, L., Borin, S., Brusetti, L., Dietrich, N., Gigliotti, C., et al. (2003). Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil\*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 248-257.