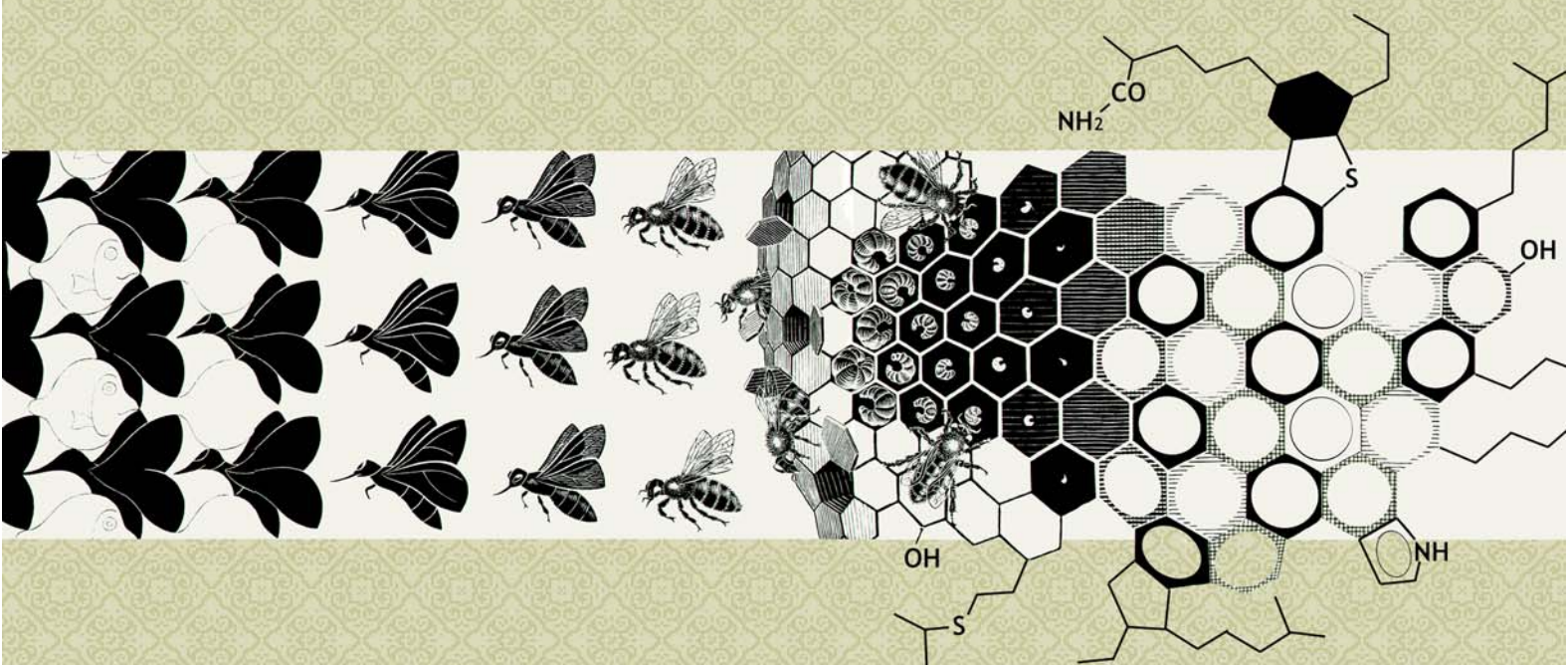


Núria Jiménez García

BIODEGRADACIÓ I BIOREMEDIACIÓ DE FUEL DEL *PRESTIGE*

CARACTERITZACIÓ QUÍMICA I
COMUNITATS MICROBIANES IMPLICADES



**BIODEGRADACIÓ I BIOREMEDIACIÓ
DE FUEL DEL *PRESTIGE***

Departament de microbiologia. Facultat de biologia.

Universitat de Barcelona

BIODEGRADACIÓ I BIOREMEDIACIÓ DE FUEL DEL *PRESTIGE*

CARACTERITZACIÓ QUÍMICA
I COMUNITATS MICROBIANES IMPLICADES

Memòria de tesi presentada per Núria Jiménez García.

Dirigida per:

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

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

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

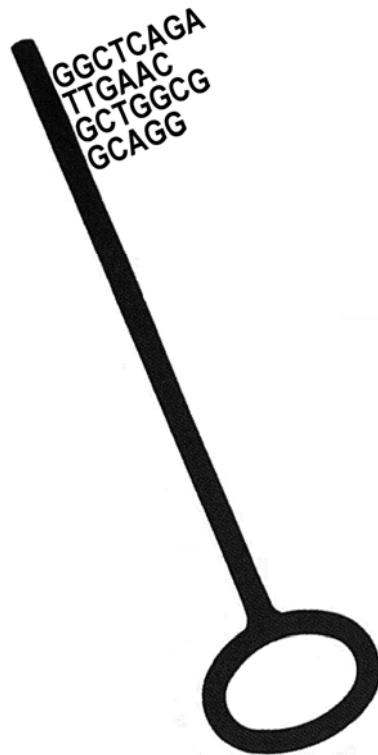
Programa de doctorat: "Microbiologia Ambiental i Biotecnologia".

Bienni 2004-2006.

Aquesta tesi ha estat finançada pel Ministerio de Educación y Ciencia a través d'una beca FPU a la doctoranda i del projecte VEM2003-20068-C05-04.

Coberta: *Metamorphenes* per G Olivé i N Jiménez (2009). A partir d'MC Escher (1940) *Metamorphose II* i l'estructura molecular per als asfaltens proposada per L Carbognani (1992).

Pàgina següent: Adaptació de J Brossa (1982) *Poema visual*.



*A la iaia, perquè d'ella vaig heretar el gust per l'escriptura...
A tota la gent que m'estimo, perquè em feu l'existència més fàcil...*

Agraïments

He pensat un munt de vegades què escriuria en uns agraïments tesístics quan s'escaigués fer-ho... Però sempre he tingut el mateix neguit: “no és ben bé això el que vull expressar”, “i si em deixo algú?”, “m’hi cap tota la *gratitud* en un parell de pàgines mecanografiades?” D'altra banda, reflexiono, tothom ha dut a terme aquesta tasca amb major o menor encert. Així que potser jo també en sóc capaç. No sé si un cop acabada em donaré per satisfeta, no sé, de fet, si satisfarà algú... Però sempre hi ha l'opció de llegir entre línies, o de passar pàgina i veure què ve a continuació. M'emparo en aquesta possibilitat per seguir escrivint.

Fets els preàmbuls, vull donar les gràcies, en primer lloc, al Joan Albaigés, per haver-me lliurat l'oportunitat de començar a fer recerca en el món del *chapapote* i haver-me sabut transmetre el seu saber fer i sobretot el seu entusiasme (després de tants anys, Joan, trobo que és digne d'elogi). He d'agrair també al Josep Maria Bayona la seva bona acollida al grup i la tasca tutorial feta al llarg de tot aquest temps. Gràcies als dos també pels múltiples consells i correccions i per la confiança que heu dipositat en mi. Amb vosaltres he anat descobrint poc a poc el món científic!

Probablement no hauria arribat a escriure mai aquest treball (de fet no sé ni si hauria començat a fer la tesi) sense el suport de l'Anna Maria Solanas: **MOLTES GRÀCIES** (i aquesta vegada aquí tens les majúscules) per tot (sensu lato), si comencés a especificar la llista no s'acabaria mai! Voldria agrair a la Maria José Prieto la constant preocupació per la meua salut física i mental i la cessió desinteressada de part del seu espai.

A la Jasmina, la Núria Salas i el Jordi Sabaté els agraeixo el guiatge inicial i al Marc Viñas, la Laura i l'Eric i, últimament, el Víctor i el Quim Vila el seu temps, la paciència i l'assessorament tècnic. Tots ells han fet que la meua ineptitud no sembli tal cosa. La col·laboració de la Rosa Mas, la Roser, la Dori, la María i la Patrícia (i algú a qui no cal que esmenti de nou) ha estat imprescindible per poder superar la mecanofòbia amb un cert èxit.

També vull agrair els professors Kenneth Timmis i Peter Golyshin i els col·laboradors del GBF (HZI) la rebuda al seu grup de recerca. Gràcies, Taras (Tapac), Olivier, Olga, Birgit Jung, Oleg, Tanya, Christoph, etc. Gràcies al Dr. Tillmann Lüders (IGOE) per la seva eficiència, resolució i simpatia. Ha estat veritablement un plaer treballar amb ell.

I ara als meus companys, amb qui ha estat una satisfacció comptar (gairebé sempre, eh!) Als del 312–320, els que ja he dit (sobretot Laura, Víctor i Eric, per moooooolts motius que no cal especificar) i els que ara vénen: gràcies! A l'Anna perquè m'hi sento reflectida, moltes vegades. A la Carmen (de Poio) per, entre d'altres coses, ensenyar-me que la marea, cabuda, sempre acaba pujant. A la María (Xirafinha) perquè jo també en sóc fan i tenir-la al laboratori ha estat *de luxe*. A la Diana per captar la ironia com ningú. Al Luís per aguantar-me (que no és poc!) A la Cristal perquè és un sol. A la Carmen per no dir-me mai qui és el dolent del

llibre... I al Pere, Carlos, Joan, Íngrid, Àlex, Hieu, Aurélie, María, Pablo, Carolina, Quentin, Gina, etc.: gràcies pels bons moments (i els no tan bons) que hem passat junts.

Als del laboratori 5 que ja no hi són: Míriam, Damir, Daniela, Alexandra, Jordi Sarrà, Maggie: gràcies. I gràcies a la Lida per la confiança que sempre ens hem tingut i pel seu sentit comú. Al Jorge perquè gràcies a ell he après a identificar el sorollet de l'Skype i sempre l'associo a bones converses! A la Cèlia per haver estat la meva nena (et trobo molt a faltar superC!) Al Quim perquè de vegades riu amb mi (i no se'n riu). Al Salva per intentar contagiar-nos la seva manera de prendre's la vida (s'agraeix, realment). I a les meves nenes actuals: Sara i Laia, perquè compartim rareses i tenim un fotimer de coses en comú. Llàstima que no haguem coincidit gaire fent experimental, hauria estat bé!

I també gràcies a un munt de gent del Dpt. de Microbiologia que he tingut la sort de conèixer, especialment: Cristina, Iulia, Óscar, Sonia, Rosa, Aitziber, Jorge, Nacho, Mário, Cristina, Unai, Nerea, Daisuke, Lluís, Natalia, Rocío, Markus, Sara, Alejandra, Xavi i un llarguíssim etcètera! (si provo de posar tots els noms segur que me'n deixo). Els motius... ben diversos: els descobriments musicals (inclòs el pop japonès), ser els veïns, tenir sempre un somriure als llavis, quedar-vos ballant fins agafar el primer tren, les converses de cervesa i shawarma, les pràctiques compartides (especialment les d'UA), els congressos, els esmorzars i dinars plegats (plegades), les DH5 α i els pBR322, les múltiples fotos, l'assessorament tècnic, les estones al laboratori 3, les pràctiques d'alemany, els interrogatoris, la complicitat...

A altra gent del HZI: Amélia, Piotr, Agata, Sagrario, Joost, Ramiro, Rui: gràcies per ajudar-me en tot el que heu pogut. A tots ells i a la Mary, Ana, Jorge, Kasha, Dorota, Audrey, Andrew, Miguel, Manuel, gràcies per fer-me sentir com a casa a Wolfenbüttel.

Felicito (crec que més que un agraïment mereixen una felicitació) la meva família: els meus pares (Amparo i Fernando) i el Santi, la Teresa, l'Empar i la Montserrat (tot i que estant tan lluny te n'has salvat força, eh!), el Marc, el Gerbert, l'Ita i el Quim per aguantar, entre d'altres coses, canvis d'humor bruscos o explicacions sobre temes intel·ligibles... i, malgrat tot, estimar-me encara.

Gràcies a tots pel suport moral rebut i per no preguntar-me constantment (només de tant en tant) "Què, Núria, com va la tesi? Quan tens pensat dipositar?"... I, posats, gràcies per preocupar-vos per mi i per alimentar-me la mar de bé! A més, gràcies als meus pares per haver-me transmès el gust per la feina ben feta. A les meves germanes per la seva confiança i complicitat (realment no em cal dir les coses perquè les entengueu tan bé com ningú altre), pels jocs de paraules, pels consells lingüístics i estètics i el suport logístic. I al Gerbert per la predisposició a ajudar, per l'entusiasme, pels enllaços, l'assessorament tècnic, informàtic i estètic, i per les aportacions energètiques en forma de pizzes o Apfelstrudel...

Per últim, dono gràcies al Marc pels manuals de geografia i perquè després de tant de temps encara veig els dies començar en camps de maduixes. I també perquè, al final, alguna cosa has après de la biodegradació del petroli i els marcadors moleculars ;) Però em despisto: jo volia fer un *reagge* i crec que això és més una tesi... I redunden aquestes paraules!

Continguts

PART I

Capítol 1. Introducció	3
1.1. Contaminació per hidrocarburs al medi marí	5
1.1.1. Antecedents de contaminació a les costes septentrionals de la Península Ibèrica	7
1.1.2. L'accident del <i>Prestige</i>	8
1.2. Origen i característiques del petroli	10
1.2.1. Característiques del petroli del <i>Prestige</i>	12
1.3. Transformacions del petroli en el medi marí	14
1.3.1. Fotooxidació	16
1.3.2. Biodegradació	17
1.4. Estructura i biodegradabilitat dels compostos	18
1.4.1. Degradació dels hidrocarburs alifàtics	19
1.4.2. Degradació dels hidrocarburs aromàtics	20
1.5. Origen i envelliment del fuel: mètodes d'anàlisi	21
1.5.1. Tècniques analítiques	22
1.5.2. Indicadors	25
1.6. Les comunitats microbianes: mètodes d'anàlisi	28
1.6.1. Metodologies independents de cultiu	29
1.7. Estratègies de bioremediació	31
1.7.1. Bioestimulació	32
1.7.2. Bioreforç	35
Capítol 2. Objectius	37
2.1. Objectius generals	39
2.2. Objectius específics	39

PART II

Capítol 3. Metodologia	43
3.1. Dissenys experimentals	45
3.1.1. Assaig de biodegradació in vitro de fuel del <i>Prestige</i> per part de dos consorcis microbians al·lòctons	45
3.1.2. Assaig de bioremediació a una platja contaminada	47
3.1.3. Obtenció d'un consorci autòcton degradador del fuel del <i>Prestige</i> i assaig de biodegradació.	48
3.1.4. Assaig de marcatge amb isòtops estables (SIP)	51
3.1.5. Avaluació de la interacció entre la fotooxidació i la biodegradació.	52
3.2. Mètodes d'anàlisi química	53
3.2.1. Determinació cromatogràfica	53
3.2.2. Determinació espectroscòpica	55
3.2.3. Quantificació	55
3.2.4. Tractament estadístic	59
3.3. Mètodes microbiològics	59
3.3.1. Medis de cultiu i reactius	59
3.3.2. Recomptes de microorganismes	60
3.3.3. Aïllament de microorganismes	60
3.3.4. Aïllament d'àcids nucleics	61
3.3.5. Amplificació per PCR	62
3.3.6. Anàlisi per DGGE	64
3.3.7. Obtenció de llibreries de clons	64
3.3.8. Detecció de DNA/RNA marcats amb isòtops estables (SIP)	66
3.3.9. PCR quantitativa	67
3.3.10. Anàlisi per T-RFLP	70
3.3.11. Seqüenciació	70

PART III (Resultats i discussió)

Capítol 4. Assaig de degradació in vitro de fuel del <i>Prestige</i> per part de dos consorcis microbians al·lòctons	75
4.1. Introducció	77
4.2. Degradació de les mostres	77
4.2.1. Degradació de les mostres control	77
4.2.2. Fracció alifàtica	79
4.2.3. Fracció aromàtica	82
4.3. Proves d'esterilitat del fuel	85
Capítol 5. Assaig de bioremediació in situ en una platja contaminada per fuel del <i>Prestige</i>	89
5.1. Anàlisi química	91
5.1.1. Fracció alifàtica	91
5.1.2. Fracció aromàtica	97
5.2. Estudi de la comunitat microbiana	102
5.2.1. Anàlisi de components principals	106
5.3. Conclusions	112
Capítol 6. Obtenció d'un consorci microbià autòcton degradador de fuel	115
6.1. Inòcul. Caracterització inicial	117
6.1.1. Anàlisi per llibreria de clons	117
6.1.2. Anàlisi per DGGE	121
6.1.3. Aïllament de soques degradadores d'hidrocarburs	122
6.1.4. Síntesi	126
6.2. Enriquiment	126
6.2.1. Caracterització química	126
6.2.2. Caracterització microbiològica	129
6.3. El consorci M81	133
6.3.1. Anàlisi per llibreria de clons	133
6.3.2. Anàlisi per DGGE	136
6.3.3. Síntesi	138
6.4. Conclusions	139

Capítol 7. Assaig de degradació in vitro de fuel del <i>Prestige</i> per part d'un consorci microbià autòcton	141
7.1. Cinètica de degradació de fuel del <i>Prestige</i>	143
7.1.1. Anàlisi de la comunitat per MPN	143
7.1.2. Anàlisi de la comunitat per DGGE	148
7.2. Anàlisi de la comunitat degradadora d'alcans per SIP	160
7.2.1. DNA	160
7.2.2. RNA	162
7.3. Conclusions	163
Capítol 8. Avaluació de la interacció entre els processos de fotooxidació i biodegradació	165
8.1. Evolució de les diverses fraccions del petroli	167
8.1.1. Efecte de la fotooxidació	167
8.1.2. Efecte de la biodegradació	168
8.2. Fracció alifàtica	169
8.2.1. Efecte de la fotooxidació	169
8.2.2. Efecte de la biodegradació	170
8.3. Fracció aromàtica	174
8.3.1. Efecte de la fotooxidació	174
8.3.2. Efecte de la biodegradació	176
8.4. Carbazols	179
8.4.1. Efecte de la fotooxidació	180
8.4.2. Efecte de la biodegradació	180
8.5. Resines	184
8.5.1. Efecte de la fotooxidació	185
8.5.2. Efecte de la biodegradació	187
8.6. Conclusions	187

PART IV

Capítol 9. Conclusions 191

9.1. Processos de degradació del fuel 193

9.2. Comunitats microbianes implicades en la degradació del fuel 193

9.3. Bioremediació del fuel: efecte de l'addició d'un fertilitzant oleofílic 194

9.4. Aspectes metodològics 194

REFERÈNCIES 195

ANNEXOS (en pdf):

AI. The *Prestige* oil spill II: Enhanced biodegradation of a heavy fuel oil under field conditions by the use of an oleophilic fertilizer.

All. The *Prestige* oil spill: Bacterial community dynamics during a field biostimulation assay.

Abreviacions

APPI: Atmospheric Pressure Photoionization (Fotoionització a pressió atmosfèrica).

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Anàlisi de restricció de gens rRNA amplificats).

BBSRC: Biotechnology and Biological Sciences Research Council.

Cedre: Centre de documentation, de recherche et d'experimentations.

CMC: Concentració micel·lar crítica.

CONCAWE: Conservation of Clean Air and Water in Europe (Associació de les companyies petroleres europees pel medi ambient, la salut i la seguretat durant el refinament i la distribució).

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant).

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Àcid desoxiribonucleic).

EI (Electron Ionization): Ionització per impacte d'electrons.

ESA: European Space Agency.

ESI: Electrospray Ionization (Ionització per electrospray).

EVOSTC: Exxon Valdez Oil Spill Trustee Council.

FD: Field Desorption (Desorció de camp).

FI: Field Ionization (Ionització de camp).

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization (Hibridació in situ fluorescent).

FT-ICR MS Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (Espectrometria de masses de ressonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier).

FT-IR: Fourier-Transformed Infra Red (Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier).

GC: Gas Chromatography (Cromatografia de gasos).

GC-FID: Gas Chromatography Flame Ionization Detection (Cromatografia de gasos amb detecció per ionització en flama).

GC-MS: Gas Chromatography Mass Spectrometry (Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses).

GCxGC: Cromatografia de gasos bidimensional.

GCxGC-ToF: Time of Flight (Cromatografia de gasos bidimensional amb detecció per temps de vol).

IDAEA: Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l'Aigua.

IIQAB: Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona.

ITOPF: International Tanker Owners Pollution Federation.

HAP: Hidrocarburs aromàtics policíclics.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida d'altra resolució).

MPN: Most Probable Number (Nombre més probable).

mRNA: Messenger RNA (RNA missatger).

NAS: National Academy Society.

NOAA: National Oceanic and Atmospheric Administration

PCA: Principal Component Analysis (Anàlisi de components principals).

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacció en cadena de la polimerasa).

PLFA: Phospholipids-derived Fatty Acids (Àcids grassos derivats de fosfolípids).

RNA: Ribonucleic Acid (Àcid ribonucleic).

rRNA: Ribosomal RNA (RNA ribosòmic).

SIP: Stable Isotope Probing (Marcatge amb isòtops estables).

SFC: Supercritical Fluid Chromatography (Cromatografia de fluids supercrítics).

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism) (Polimorfismes de conformació d'ADN de cadena simple).

TGGE: Thermal Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesi en gels de gradient tèrmic).

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografia de capa fina).

TLC-FID: Thin Layer Chromatography Flame Ionization Detection (Cromatografia de capa fina amb detecció per ionització en flama).

TPH: Total Petroleum Hydrocarbons (Hidrocarburs totals del petroli).

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfisme de longitud del fragment terminal de restricció).

USEPA: United States Environmental Protection Agency.

WGS: Whole Genome Shotgun (sequencing) (Seqüenciació aleatòria del genoma).

PART I



Capítol 1

Introducció

1.1. Contaminació per hidrocarburs al medi marí

D'entre els nombrosos contaminants que arriben al mar, el petroli és un dels que més atenció capta. Així mateix, si bé els accidents de petroliers no són la principal font de contaminació per hidrocarburs en el medi marí, són la que més interès suscita.

S'estima que anualment arriben al mar entre 470 i 8.400 quilotones d'hidrocarburs de petroli (taula 1.1). Les fonts naturals representen el 46% d'aquesta entrada, les activitats associades amb l'ús del petroli el 37%, els vessaments accidentals o les descàrregues durant el transport el 12% i els processos d'extracció el 3% (NAS, 2003).

Taula 1.1. Fonts de contaminació per hidrocarburs al medi marí. Aportacions anuals (en milers de tones).

Font	Millor estimació	Mínim	Màxim
Filtracions naturals	600	200	2.000
Extracció de petroli	38	20	62
Plataformes marines	0,9	0,3	1,4
Deposició atmosfèrica	1,3	0,4	2,6
Aigües de producció	36	19	58
Transport del petroli	150	120	260
Vessaments d'oleoductes	12	3	37
Vessaments de petroliers	100	93	130
Descàrregues operacionals (rentats)	36	18	72
Vessaments d'instal·lacions costaneres	5	2	15
Deposició atmosfèrica	0,4	0,2	1,0
Consum de petroli	480	130	6.000
Fonts terrestres (escolament i rius)	140	7	5.000
Embarcacions recreatives	-	-	-
Vessaments (no petroliers)	7,1	6,5	8,8
Descàrregues operacionals (vaixells port brut \geq 100 t)	270	90	810
Descàrregues operacionals (vaixells port brut $<$ 100 t)	-	-	-
Deposició atmosfèrica	52	23	200
Fuel alliberat pels avions en vol	8	5	22
Total	1.300	470	8.400

Nota: Els totals poden no correspondre's a la suma dels diferents apartats, ja que provenen de fonts independents. S'han estimat mitjanament amb dades de 1990 a 1999. Font: NAS, 2003.

La incertesa associada a les dades és important. En el cas de les aportacions per escolament, per exemple, el màxim estimat és 35 vegades la millor estimació. Això no obstant, pot dir-se que des de mitjan anys vuitanta les entrades han minvat progressivament. El desenvolupament de normatives referents al transport de combustibles fòssils per mar, sovint

creades en resposta a accidents de petroliers (MARPOL del *Torrey Canyon*, OPA de l'*Exxon Valdez*, paquets de mesures post-*Erika*), n'han suposat una millora, la qual cosa s'ha reflectit en l'evolució de la quantitat de producte vessat en els darrers decennis (figura 1.1).

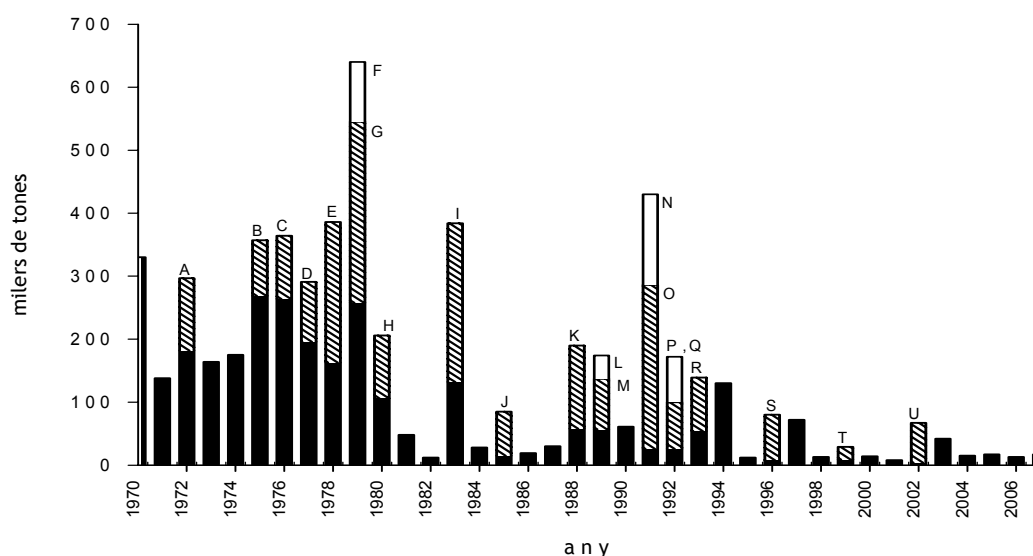


Figura 1.1. Evolució dels vessaments accidentals de petroli durant el transport. Les barres representen el sumatori de la quantitat vessada (en milers de tones). Les fraccions més clares (indicades amb lletres) representen la quantitat vessada en un sol accident i corresponen a: A) *Sea Star*; B) *Jakob Maersk*; C) *Urquiola*; D) *Hawaiian Patriot*; E) *Amoco Cadiz*; F) *Independentza*; G) *Atlantic Empress*; H) *Irene's Serenade*; I) *Castillo de Bellver*; J) *Nova*; K) *Odyssey*; L) *Exxon Valdez*; M) *Khark V*; N) *Haven*; O) *ABT Summer*; P) *Katina P*; Q) *Agean Sea*; R) *Braer*; S) *Sea Empress*; T) *Erika*, i U) *Prestige*. Adaptació d'ITOPF, 2008.

Tot i la tendència a la baixa, poden haver-hi variacions considerables d'un any a un altre, a causa de grans accidents esporàdics, explicables en part pel trànsit de petroliers (anualment es transporten de 1.500 a 1.800 milions de tones de crus de petroli i derivats) i pel mal estat de la flota: un 40% dels vaixells amb bandera de la UE, per exemple, són deficientes o infringeixen MARPOL (Rodríguez, 2007). A més, cal tenir en compte que gran part del petroli es transporta en vaixells amb bandera de conveniència de països que incompleixen la major part de normatives.

Si bé és cert que, tal com ja s'ha esmentat, aquests no són la principal via de contaminació, els impactes associats (ecològics, econòmics i socials) poden arribar a ser catastròfics, en funció de les característiques del vessament, del producte, de la zona on s'ha produït i de factors meteorològics.

L'exemple paradigmàtic d'accident amb conseqüències desastroses és el de l'*Exxon Valdez*. El petrolier s'enfonsà a Bligh Reef el març de 1989 i alliberà unes 35.500 tones de cru a les aigües de Prince William Sound (Alaska). El petroli afectà 1.990 km de costa de les penínsules de Kenai i Alaska i l'arxipèlag Kodiak.

Deixant de banda els efectes sobre el medi, l'economia o la societat, l'accident destacà per l'impacte mediàtic i per les conseqüències que se'n derivaren, com un gran nombre d'estudis científics han demostrat gràcies a l'elevat finançament proporcionat per l'*Exxon Valdez Oil*

Spill Trustee Council (EVOSTC, 2008). De totes maneres, encara avui existeix controvèrsia en relació a què va resultar afectat i què es considera recuperat. Els diversos treballs arriben a conclusions diferents i, fins i tot, contradictòries, que moltes vegades reflecteixen interessos polítics i econòmics diversos. No obstant això, tothom coincideix a afirmar que l'accident fou un fet clau per al desenvolupament de normatives ambientals relacionades.

1.1.1. Antecedents de contaminació a les costes septentrionals de la península Ibèrica

En estar situades en un lloc pel qual discorren rutes de transport marítim molt transitades i en què les condicions meteorològiques són sovint adverses, les costes septentrionals de la península Ibèrica també han patit la contaminació de vessaments accidentals de petroliers.

En el darrer terç del segle xx van produir-se diversos accidents (taula 1.2) el darrer dels quals, anterior al *Prestige*, fou el de l'*Aegean Sea*. El buc xocà contra el fons a la ria d'Ares i s'incendià. L'aire i les mareas transportaren els contaminants petro i pirogènics cap a la costa, estenent-los al llarg d'uns 200 km. Únicament es varen poder recuperar 4.000 tones de cru del buc.

Taula 1.2. Resum dels accidents esdevinguts a les costes nord-peninsulars en el darrer terç del segle xx. A partir de Bulot, 2003.

Data	Localització	Coordenades	Nau	Vessament
05/05/1970	Port de Vigo	42°14'N, 8°43'W	<i>Polycommander</i>	13.000 tones de cru Aràbia lleuger
12/05/1976	Port d'A Coruña	43°23'N, 8°22'W	<i>Urquiola</i>	100.000 tones de cru Aràbia lleuger
31/12/1978	Fisterra	43°13'N, 9°37'W	<i>Andros Patria</i>	50.000–60.000 tones de cru pesat iranià
13/12/1992	Ria de Ares	43°20'N, 8°20'W	<i>Aegean Sea</i>	70.000 tones de cru Brent

Al llarg de tots aquests anys s'han produït a l'Atlàntic nordoriental molts altres abocaments accidentals importants (figura 1.2) tant per la quantitat vessada com pels efectes que van tenir sobre el medi (*Torrey Canyon*, *Amoco Cadiz*, *Erika*, entre d'altres), etc. Avui existeixen àmplies bases de dades sobre el particular (p. ex. Cedre, Environment Canada, NOAA).

Caldria destacar el de l'*Erika*, per ser relativament recent i per la seva similitud amb el del *Prestige*. El desembre del 1999 el petrolier *Erika* es trencà en dues seccions a uns 50 km de les costes de la Bretanya i s'enfonsà. Van alliberar-se 15.000 tones de fuel pesant del tipus Bunker C, el qual començà a arribar a les costes cap a finals del mateix mes i continuà fent-ho durant setmanes després de l'enfonsament del buc. El producte (format en un 90% per un residu pesant de la destil·lació i per un 10% d'un producte més lleuger), resultà ser poc degradable (Outdot, 2000) i poc susceptible de ser tractat amb dispersants químics.

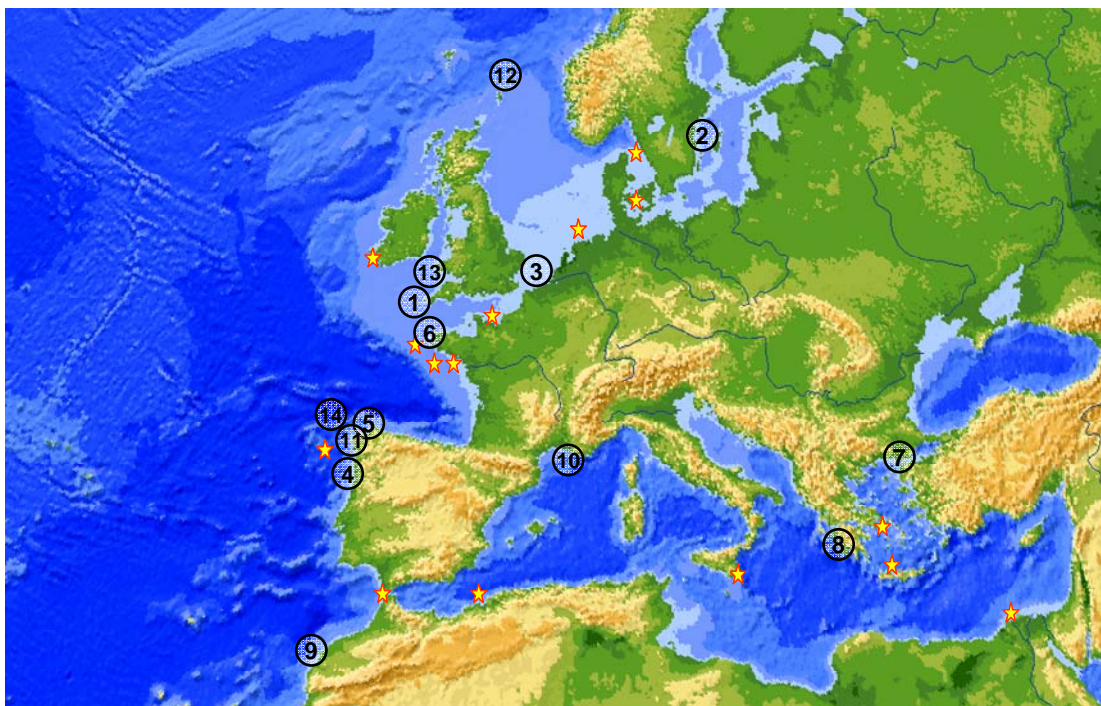


Figura 1.2. Vessaments accidentals produïts a Europa. Els de més de 70.000 tones són: 1) *Torrey Canyon*, 1967; 2) *Othello*, 1970; 3) *Texaco Denmark*, 1971; 4) *Jakob Maersk*, 1975; 5) *Urquiola*, 1976; 6) *Amoco Cadiz*, 1978; 7) *Independentza*, 1979; 8) *Irene's Serenade*, 1980; 9) *Khark V*, 1989; 10) *Haven*, 1991; 11) *Aegean Sea*, 1992; 12) *Braer*, 1993; 13) *Sea Empress*, 1996; 14) *Prestige*, 2002. Representats amb ☆ hi ha els vessaments de menys de 70.000 tones.

1.1.2. L'accident del *Prestige*

Tres anys després de la catàstrofe de l'*Erika*, es produí el darrer dels accidents de gran magnitud a les costes peninsulars, fins ara: el del *Prestige*, un buc monocasc, construït el 1976 al Japó, propietat d'una companyia grega, amb bandera de Bahames i tripulació bàsicament filipina, que transportava fuel de propietat russa.

El 13 de novembre del 2002, la nau patí una avaria i, debilitada per un fort temporal, s'esquerdà davant les costes de Galícia. Després de ser remolcada cinc dies, durant els quals la bretxa va anar creixent i va vessar-se part de la càrrega (unes 17.000 de les 77.000 tones que transportava), acabà trencant-se en dues parts (figura 1.3) i naufragà a unes 135 milles del cap Fisterra, la popa a 3.565 m de fondària (42° 10,6' N, 12° 3,6' W) i la proa a 3.830 m (42° 10,8' N, 12° 3,6' W). Aleshores s'alliberaren 46.000 tones més de fuel, en el moment de l'enfonsament i posteriorment, a través d'esclletxes presents al casc.

El fuel arribà en successives mareas negres (16 i 29 de novembre, 18 i 23 de desembre i 4 de gener) a les costes de Galícia, inicialment, i després a les de Cantàbria, Astúries i el País Basc, i afectà sobretot la costa da Morte i el Parque Nacional de las Islas Atlánticas. En total, 1.137 platges (uns 2.980 km de costa) resultaren contaminades (Bedoya i Alberti, 2004).

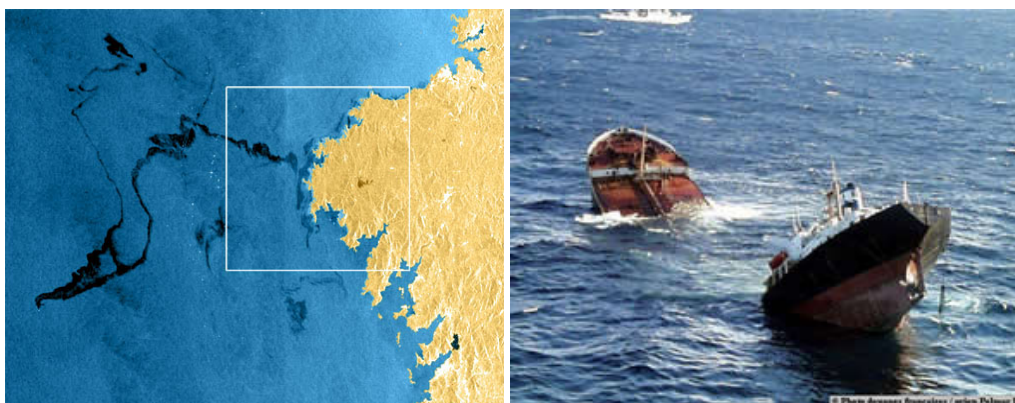


Figura 1.3. Estela deixada pel *Prestige* abans de l'enfonsament el 17/11/2002 (ESA, 2002) i petrolier enfonsant-se el 19/11/2002 (Cedre, 2002).

L'accident vingué acompanyat d'un fort impacte ambiental. Segons la Sociedad Española de Ornitología (García et al., 2003) la marea negra provocada pel petrolier és l'episodi més greu de mortalitat d'aus marines ocorregut a les costes peninsulars i el segon més gran a l'Europa atlàntica després del desastre de l'*Erika*. Es van recollir 23.181 aus petrolejades (9.348 de les quals mortes) de més de noranta espècies diferents fins l'agost del 2003. S'estima que se'n van veure afectades de 115.000 a 230.000.

A banda de la petjada del fuel en el medi ambient (exemplificada aquí per les aus marines, sovint emprades com a bioindicador), va haver-hi conseqüències en altres àmbits: Un mes després de l'accident, per exemple, les vendes de peix i marisc gallecs havien disminuït un 50% (Rodríguez, 2007).

Al litoral de Galícia es concentra un 50% de la població i un 84% de la facturació de les empreses gallegues (García et al., 2003). L'economia se sosté en l'existència d'un entramat productiu fort al voltant del complex pesca-indústria. Justament el sector pesquer genera més de 40.000 llocs de treball directes, mentre que d'altres activitats, com el marisqueig o l'aqüicultura ocupen 9.200 persones, majoritàriament dones, i 13.000, respectivament, i produeixen uns ingressos anuals que depassen els 175 milions d'euros (taula 1.3). A banda cal considerar les empreses de producció de productes enllaunats, etc.

Taula 1.3. Producció de marisc a Galícia durant el 2007. Font: IEO.

Espècie	Producció (tones)	Facturació en primera venda (milions d'€)
Musclo (<i>Mytilus sp.</i>)	160.000	160
Navalla (<i>Ensis ensis</i>)	268	3,5
Garota (<i>Paracentrotus lividus</i>)	702	1,7
Percebe (<i>Pollicipes cornucopia</i>)	416	13,4

Arran de l'accident del *Prestige*, la Unió Europea adoptà diverses mesures, entre les quals destaca la prohibició del transport de petrolis pesants en bucs monocasc. Però quines van ser les actuacions a nivell estatal per fer front a la catàstrofe? A més de les decisions d'emergència, el Ministerio de Ciencia y Tecnología endegà dues línies d'ajuts destinats a mesurar-ne els efectes a curt i llarg termini, respectivament.

El conjunt d'estudis, dins el qual s'inclou el present treball, va pretendre conèixer el destí tant del buc enfonsat com del fuel que se n'alliberà, avaluar els efectes del vessament als recursos pesquers i ecològics i proporcionar eines per millorar la gestió d'hipotètics accidents futurs (Rodríguez, 2007).

1.2. Origen i característiques del petroli

Els crus de petroli són mesclades complexes formades per diversos milers de compostos, majoritàriament hidrocarburs. Així mateix, contenen derivats heteroatòmics sulfurats, nitrogenats i oxigenats en menor mesura, i també metalls com el ferro, vanadi, níquel, en forma de complexos organometàl·lics. La seva formació, a partir de la matèria orgànica, s'esdevé en una successió de processos lents (duts a terme al llarg de milions d'anys): diagènesi, catagènesi i metagènesi (Tissot i Welte, 1978).

En un primer estadi (*diagènesi*), la matèria orgànica sedimentada a zones lacustres, marines, etc. es transforma microbiològicament: els compostos primaris es degraden i pateixen una sèrie de condensacions i desfuncionalitzacions. La major part de la matèria orgànica resultant, la composició química de la qual estarà condicionada tant per la composició de la inicial, com per la naturalesa i l'extensió de l'activitat microbiana, s'incorpora a una matriu macromolecular de materials húmics que formaran, posteriorment, l'anomenat querogen, un polímer d'elevat pes molecular insoluble en dissolvents orgànics.

En un segon estadi (*catagènesi*), la matèria orgànica s'enfonsa a les conques sedimentàries i es continuen produint condensacions i pèrdua de grups funcionals del querogen, ara a major pressió i temperatura. La seva estructura esdevé més aromàtica i compacta, quedant-ne al marge els compostos més làbils, com els hidrocarburs de baix o mitjà pes molecular. Al mateix temps, i per efecte de la temperatura, s'inicia el procés de piròlisi (*cracking*) del querogen, amb la subsegüent generació dels hidrocarburs del petroli.

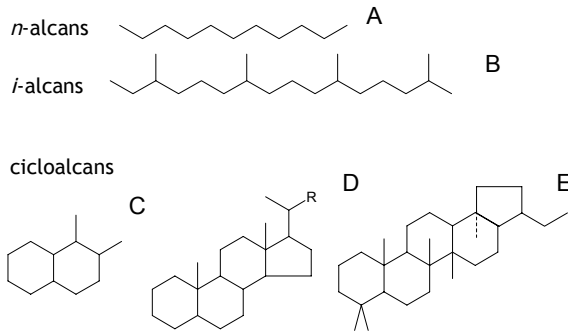
En un darrer estadi (*metagènesi*), a temperatures superiors als 180 °C, es generen gasos (principalment metà), tant a partir del querogen com dels compostos líquids formats.

La composició química de crus procedents de regions diverses pot presentar, doncs, una gran variabilitat, en funció de la naturalesa i extensió dels processos biogeoquímics soferts. Amb tot, les mateixes famílies d'hidrocarburs són presents, en major o menor mesura, a tots els crus (Speight, 1991) (figura 1.4):

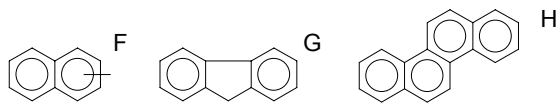
- Hidrocarburs saturats, bàsicament alcans però també cicloalcans, contenen el màxim nombre d'àtoms d'hidrogen possible.
- Hidrocarburs aromàtics, mono (amb un anell benzènic) o policíclics (amb més d'un) i amb substituents alquilats, representen d'un 1 a un 20% dels hidrocarburs totals a la majoria dels crus.

- Compostos polars (resines i asfaltens), més pesants, amb sofre, nitrogen i/o oxigen i poden contenir metalls.

Hidrocarburs saturats



Hidrocarburs aromàtics



Asfaltens

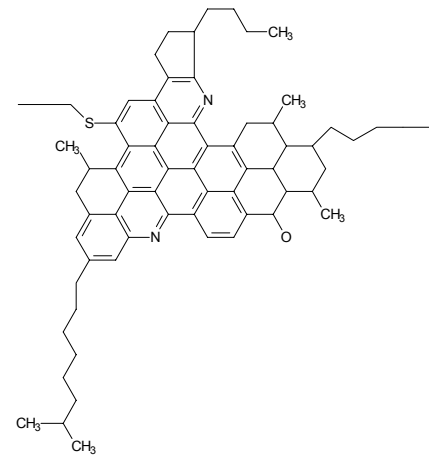


Figura 1.4. Exemple d'estructures de diversos tipus d'hidrocarburs presents en el petroli. En concret: A) *n*-undecà; B) 2,4,10,14-tetrametilhexadecà (fità); C) cicloalcans; D) esterans; E) triterpans; F) metilnaftalens; G) fluorè; H) crisè. La hipotètica estructura dels asfaltens és de Winniford i Bersohn, 1962.

El fet que existeixin diversos tipus d'hidrocarburs, possibilita la classificació dels petrolis en funció de la proporció dels mateixos (figura 1.5).

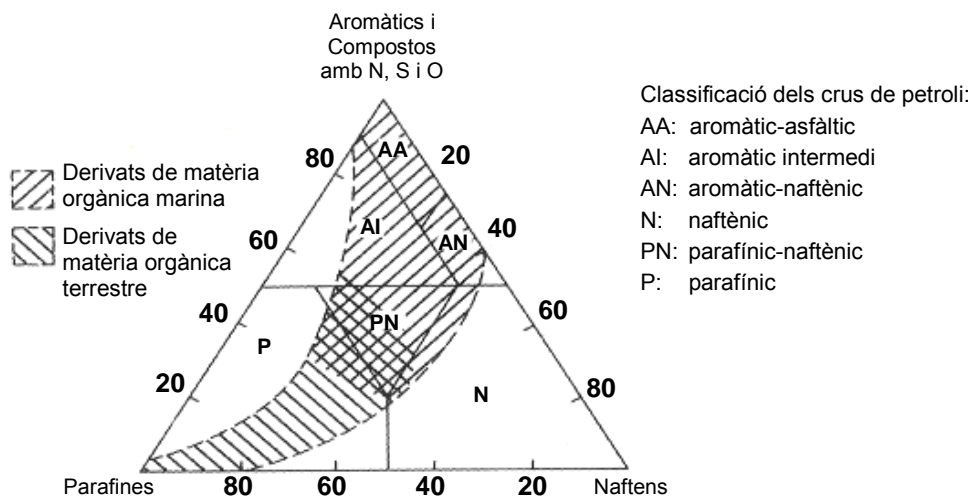


Figura 1.5. Principals tipus de crus de petroli. Font: Tissot i Welte, 1978.

En primer lloc, els petrolis parafínics són constituïts majoritàriament per hidrocarburs alifàtics acíclics i el seu contingut en sofre és inferior a l'1%. Els parafínics-naftènics també tenen un baix contingut en sofre, però es troben enriquits en cicloalcans i en alcans acíclics. Ambdós tipus de petrolis són els de major interès comercial.

Els aromàtics intermedis, per contra, generalment presenten més d'un 1% de sofre. Bàsicament estan formats per hidrocarburs aromàtics (més del 50%). Tot i que també són d'interès comercial, la seva qualitat és menor.

Els petrolis més abundants són de tipus aromàtic-naftènic i aromàtic-asfàltic. Els primers són petrolis parafínics o parafínics-naftènics (amb un contingut en sofre inferior a l'1%) enriquits en resines (més del 25%) i asfaltens. Els darrers són petrolis pesants (resines i asfaltens poden arribar al 60%) i viscosos, amb un contingut en sofre de fins al 9%.

De manera general, pot afirmar-se que els crus més antics contenen una major proporció de fraccions lleugeres (alcans i aromàtics de baix pes molecular), mentre que els més recents són de caràcter més aviat asfàltic.

1.2.1. Característiques del petroli del *Prestige*

La càrrega vessada pel *Prestige*, com en el cas de l'*Erika*, no fou un cru de petroli, sinó un fuel pesant, del tipus Bunker C (número 6 USEPA). Aquest tipus de producte és un residu resultant de la destil·lació del cru, mitjançant la qual se n'extreuen altres fraccions més lleugeres (amb punts d'ebullició per sota dels 300 °C) de major valor comercial (p. ex. gas, gasolina, querosè, gasoil).

Aquest fuel és un producte molt viscos (taula 1.4), bàsicament emprat com a combustible en instal·lacions industrials i que s'acostuma a preescalfar abans de ser utilitzat. És poc volàtil, amb un punt d'inflamació moderat, i no té tendència a dispersar-se com els crus de petroli o fuels més lleugers. En tot cas, formarà boles de quitrà (*tar balls*), agregats (*lumps*) o emulsions (USEPA, 2004).

Taula 1.4. Propietats físiques del fuel del *Prestige*. Font: Cedre, 2003.

Característiques		Font
Densitat relativa a 15 °C	0,993 g ml ⁻¹ 0,995 g ml ⁻¹	Cerficat de qualitat Saybolt-Letònia Mesures de Cedre
Viscositat a 50 °C	615 cSt	Cerficat de qualitat Saybolt-Letònia
Viscositat a 15 °C	3·10 ⁴ cSt	Mesures de Cedre
Punt de fluïdesa	6 °C	Cerficat de qualitat Saybolt-Letònia

Pel que fa a la composició química, l'anàlisi elemental permeté establir que el fuel presenta un 85,5% de carboni, un 11% d'hidrogen, un 2,28% de sofre i un 0,69% de nitrogen, així com quantitats menors de metalls (per exemple 55 mg kg⁻¹ de níquel i 170 mg kg⁻¹ de vanadi) (Albaigés i Bayona, 2003).

Si bé aquesta composició és similar a la del fuel transportat en el seu moment per l'*Erika*, el fuel del *Prestige* presenta una proporció d'hidrocarburs aromàtics policíclics menor (taula 1.5) i un contingut en sofre més elevat.

Taula 1.5. Composició del fuel del *Prestige* per famílies, en percentatge de cada fracció. Font: Cedre, 2003.

Saturats	Aromàtics	Resines	Asfaltens	Font
26,6	52,8	8,4	12,2	Musée National d'Histoire Naturelle
23	54	12,5	10,3	IFP (original)
21	54		27,7	IFP (emulsió)
21,6	50,7		34,7	IIQAB (CSIC)

El perfil cromatogràfic de la fracció d'hidrocarburs saturats (figura 1.6) mostra una distribució bimodal de la sèrie dels *n*-alcans, cosa que indica que el producte transportat pel *Prestige* era una mescla d'un de residual, enriquit en alcans de cadena llarga (C20-C40) i un de més lleuger (C10-C17), el qual serviria per disminuir-ne tant la viscositat com el contingut en sofre (Albaigés i Bayona, 2003).

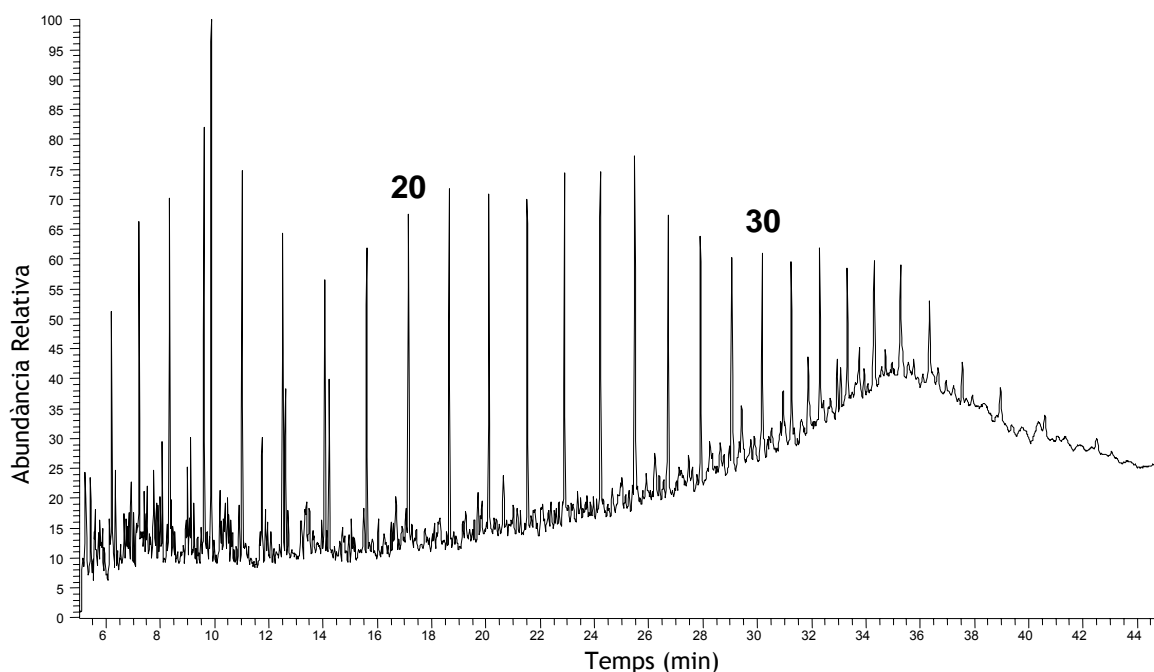


Figura 1.6. Perfil cromatogràfic (obtingut per cromatografia de gasos amb detecció de ionització en flama, GC-FID) de la fracció d'hidrocarburs saturats del fuel original del *Prestige*. 20 i 30 indiquen el nombre d'àtoms de carboni de la sèrie de *n*-alcans.

D'altra banda, els hidrocarburs aromàtics policíclics més abundants (figura 1.7) són els naftalens i els fenantrens i els seus derivats alquilats. En menor mesura, conté fluorantens, pirens, dibenzotiofens i crisens. En més baixes concentracions es troben compostos d'elevat pes molecular, la imptància dels quals rau en el fet que són carcinògens (benzo[*a*]pirè, benzo[*b*] i benzo[*k*]fluorantè, indeno[123-*cd*]pirè) (Böstrom et al., 2002).

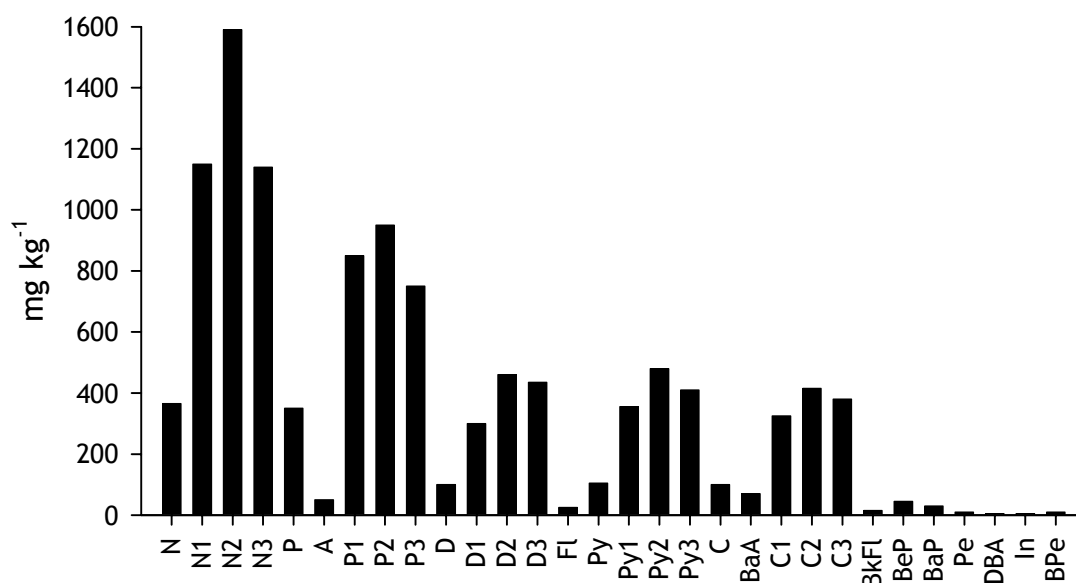


Figura 1.7. Distribució dels hidrocarburs aromàtics policíclics identificats en el fuel del *Prestige*. Corresponen a: N, naftalè; N1, metilnaftalens; N2, dimetilnaftalens; N3, trimetilnaftalens; P, Fenantrè; A, antracè; P1-P3, metil-trimetil-fenantrens; D, dibenzotiofè; D1-D3, metil-trimetil-dibenzotiofè; Fl, fluorantè; Py, pirè; Py1-Py3, metil-trimetil-fluorantens/pirens; C, crisè; BA, benzo[*a*]antracè; C1-C3, metil-trimetil-crisens; Bb+BkFl, Benzo[*b+k*]fluorantens; BeP, benzo[*e*]pirè; BaP, benzo[*a*]pirè; Pe, perilè; DBA, dibenzo[*ah*]antracè; In, indenopirè; BPe, benzo[*gh*]perilè. Font: Albaigés i Bayona, 2003.

1.3. Transformacions del petroli en el medi marí

Al mar, el producte inicial vessat pateix tot un ventall de processos, els quals s'esdevenen simultàniament o seqüencial en el temps, n'afecten les diverses fraccions i li provoquen una transformació química i física. És el que es coneix com a envelliment (*weathering*) (Floodgate, 1984). En els darrers trenta anys s'han desenvolupat models diversos per simular-los, alguns dels quals han estat recollits per French-McCay (2004).

En general, el petroli se subdivideix en pseudocomponents amb propietats fisicoquímiques representatives dels compostos que inclouen. French-McCay (2004) en proposa tres (punt d'ebullició, coeficient de partició octanol-aigua i el fet de ser aromàtic), que li permeten establir vuit pseudocomponents diferents a fi de modelitzar el destí del petroli, determinat pels processos a què he fet referència i que es detallen a continuació (figura 1.8).

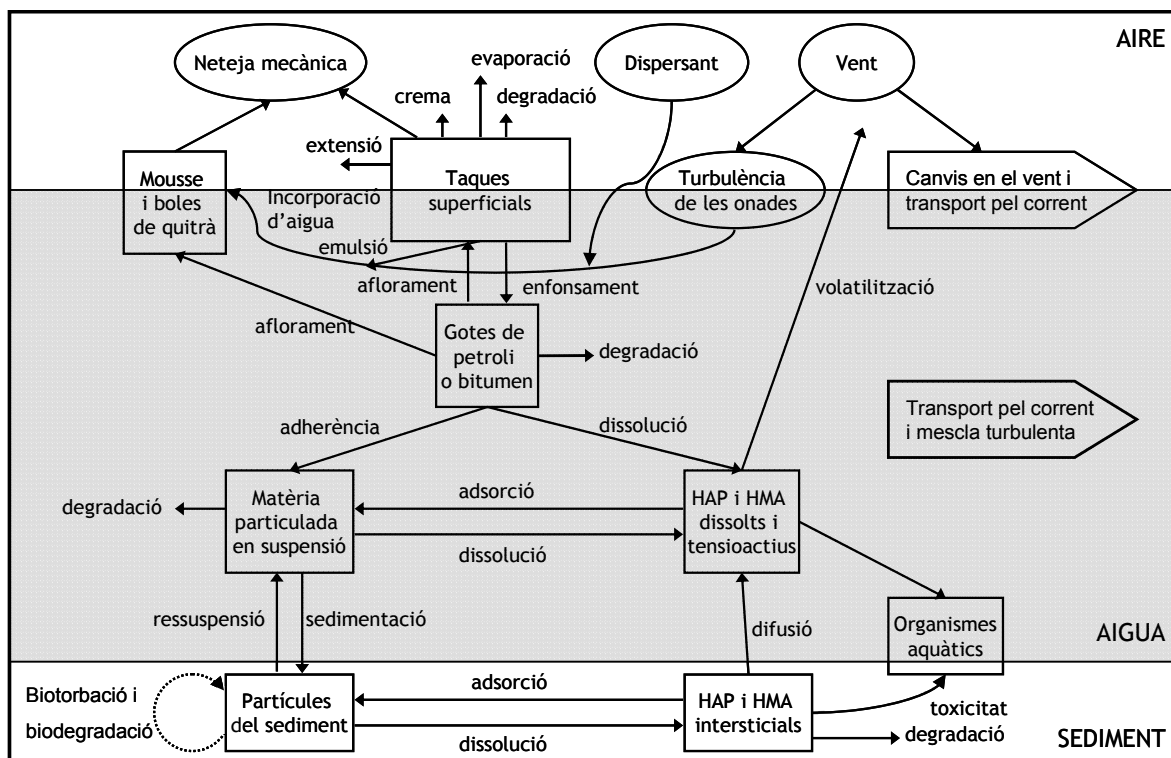


Figura 1.8. Processos simulats que afecten el petroli a mar obert. HMA: Hidrocarburs monoaromàtics. HAP: hidrocarburs aromàtics policíclics. Adaptació de French-McCay, 2004.

En primer lloc, la taca s'estén per la part superficial de la columna d'aigua. El procés depèn tant de la viscositat del producte, com de factors meteorològics (temperatura o velocitat del vent, entre d'altres).

A més, es produeix la dispersió del producte a la columna d'aigua. La dispersió és un procés de mescla causat per moviments aleatoris de les partícules. El resultat és un augment de la superfície en contacte amb l'aigua, de manera que el petroli esdevé més susceptible de ser degradat (Atlas i Bartha, 1992).

L'evaporació és el principal procés d'envelliment durant les primeres hores (o dies) posteriors al vessament. Depenent de la composició inicial del petroli, se'n pot perdre fins al 50% mitjançant aquest mecanisme. A tall d'exemple, el 40% del producte vessat en l'accident de l'*Amoco Cadiz* va perdre's en els primers tres dies (CONCAWE, 1981).

La taxa d'evaporació depèn de les propietats fisicoquímiques (per exemple pressió de vapor) dels constituents i, en menor mesura, de la saturació a la capa de frontera. També depèn de la velocitat del vent, la superfície del vessament i la temperatura. En concret, augmenta amb la temperatura i afecta, principalment, les molècules de menys de quinze àtoms de carboni (Prince et al., 2003).

La dissolució és un altre dels processos que comença a donar-se poc després del vessament. En alguns models s'assumeix que s'inicia immediatament (Hibbs et al., 1999). Tot i que la major part dels hidrocarburs del petroli són insolubles en aigua, una petita part (els compostos més lleugers, sobretot els aromàtics) es pot dissoldre. La importància d'aquest factor en l'envelliment rau en el fet que la majoria dels compostos solubles, especialment els

aromàtics de menor pes molecular, són tòxics fins i tot en concentracions baixes. Ara bé, la dissolució contribueix també a la biodisponibilitat dels hidrocarburs i, doncs, a la seva biodegradació.

Posteriorment, l'onatge pot produir l'emulsió del petroli. Les emulsions poden ser de petroli en aigua o d'aigua en petroli (*chocolate mousse*). Un producte emulsionat pot contenir d'un 60 a un 85% d'aigua, la qual cosa n'augmenta el volum i també la densitat, per sobre d' $1,03 \text{ g ml}^{-1}$, i la viscositat (NAS, 2003).

En el cas de les mousses, la degradació és lenta, ja que disminueix la superfície en relació al volum. La formació de mousse s'associa més a vessaments accidentals catastròfics que a la contaminació crònica (Floodgate, 1984). D'altra banda, les emulsions de petroli en aigua augmenten la superfície del petroli i, per tant, la seva susceptibilitat a ser degradat (Venosa i Zhu, 2003).

L'abundància i proporció de resines i asfaltens són un factor clau en la formació i estabilització d'emulsions (Fingas et al., 2000). Els asfaltens tendeixen a formar emulsions més estables que les resines soles.

Part dels hidrocarburs poden quedar adsorbits o absorbits a partícules detrítiques o al plàncton, ser transferits posteriorment a nivells tròfics més alts (organismes filtradors, peixos i mamífers) o passar a formar part dels sediments. Un cop aquí, per efecte de les tempestes o els corrents submarins poden retornar a la columna d'aigua (resuspensió).

Els residus més persistents poden anar a parar a la costa, en el cas que el vessament en sigui proper, o anar fragmentant-se en forma de boles de quitrà (*tar balls*), si es produeix a mar obert. Mentre que les boles de quitrà poden ser molt recalctrants i ser transportades a grans distàncies, el destí del petroli present a les platges dependrà de la densitat i viscositat del producte, així com de l'energia de les ones o la granulometria dels sediments costaners, entre d'altres.

Existeixen dos principals processos d'eliminació efectiva dels hidrocarburs del medi: la fotooxidació i la biodegradació, ambdós suposen l'alteració química del petroli, en funció de la seva susceptibilitat als processos d'oxidació.

1.3.1. Fotooxidació

La fotooxidació és una reacció d'oxidació catalitzada per la llum (NAS, 2003). Donat que en el mar la llum no pot penetrar a gaire fondària, aquest procés té importància en la capa més superficial, que és on s'acumula majoritàriament el petroli. Evidentment és més rellevant en les regions tropicals.

Les reaccions poden ser directes, si és el mateix reactant qui absorbeix l'energia i forma compostos intermedis menys estables, o indirectes, si altres compostos presents absorbeixen l'energia i generen productes intermedis, que poden atacar les molècules hidrocarbonades, o

transferir-los energia. En tots els casos, però, serà necessària la presència de cromòfors (parts de molècules que absorbeixen llum) i llum amb longituds d'ona inferiors a 400 nm (Floodgate, 1984).

La fotooxidació augmenta amb el nombre d'anells i el grau d'alquilació dels hidrocarburs (Guieysse i Viklund, 2005). Si bé no afecta pràcticament els saturats, la majoria dels compostos aromàtics es transformen en compostos polars (aldehids, alcohols, cetones o àcids) (Garrett et al., 1998).

El grau de fotooxidació depèn de diversos factors com són: l'espectre i la intensitat de la llum incident, la durada de l'exposició, les propietats òptiques de la superfície de l'aigua en presència de petroli, les propietats òptiques dels mateixos hidrocarburs i altres compostos i la presència de *quenchers* i *activadors*, com els àcids húmics o fúlvics, els quals, no només capten l'energia lumínica, sinó que també concentren els HAP. Els compostos organometàl·lics catalitzen aquestes reaccions, mentre que els compostos sulfurats tendeixen a inhibir-les (Clark i MacLeod, 1977).

1.3.2. Biodegradació

Tot i que, a priori, la majoria dels hidrocarburs són biodegradables (Prince et al., 2003), una única soca de microorganismes serà capaç de degradar un rang limitat de substrats. Així doncs, al medi la biodegradació es duu a terme per grups de microorganismes (principalment de bacteris i fongs) amb diferents capacitats catabòliques.

La transformació comprèn tot un seguit d'etapes que poden resultar en la mineralització dels compostos. Aquest procés pot ser dut a terme per un únic microorganisme o pot ser el resultat d'una actuació seqüencial en què un primer grup efectua un atac inicial, un segon en transforma els metabòlits i així successivament (Karrick, 1977, Alexander, 1999). Les taxes de degradació al mar poden oscil·lar de 0,001 a 60 g m⁻³ per dia (Atlas i Bartha, 1992).

La biodegradació del petroli al medi és un desafiament per als microorganismes, tant per les característiques del producte vessat, com per les variables ambientals. En relació amb la composició, els compostos de més baix pes molecular (com el benzè i els alcans de cadena curta) poden resultar tòxics, en tenir efecte de solvent a les membranes cel·lulars (Morgan i Watkinson, 1990). Per contra, els hidrocarburs més pesants (HAP, resines i asfaltens) són poc solubles en aigua, cosa que en limita la biodisponibilitat i, doncs, la biodegradabilitat. Per tant, els olis lleugers són més biodegradables que els fuels pesants.

En el medi marí, la biodegradació d'un producte determinat està condicionada per factors com la temperatura, la llum, la salinitat, la concentració d'oxigen i de nutrients nitrogenats i fosfats i també de ferro o d'altres micronutrients, etc. Alguns d'aquests factors determinen les propietats del petroli, d'altres afecten les poblacions microbianes o la seva activitat.

La temperatura afecta tant les unes com les altres. En general, la taxa de degradació creix amb la temperatura. A baixes temperatures augmenta la viscositat, minva la solubilitat (i,

doncs, biodisponibilitat) dels substrats i disminueix l'evaporació dels hidrocarburs de baix pes molecular més tòxics, de manera que es retarda la biodegradació. A més, la temperatura afecta l'activitat enzimàtica de les cèl·lules, que es dobla en cada increment de 10 °C (NAS, 2003). Això no obstant, una major evaporació implica l'enriquiment en compostos més recalcitrants del producte restant (Atlas, 1981).

Si bé la fotooxidació pot afavorir la biodegradació en generar productes més solubles, la radiació d'alta energia tendeix a inhibir el creixement bacterià i pot produir polímers més recalcitrants (Floodgate, 1984).

La superfície de contacte petroli-aigua és molt important ja que és en aquesta interfície on es produeix el creixement microbià. La dispersió o les emulsions de petroli en aigua la incrementen, de manera que el petroli esdevé més susceptible a l'atac microbià (Atlas i Bartha, 1992; Venosa i Zhu, 2003). La formació de mousses o de boles de quitrà, en canvi, la redueixen.

Tot i que pot produir-se degradació anaeròbia d'hidrocarburs del petroli, com per exemple de benzè, toluè, alquilbenzens, naftalè, fenantrè, alcans ramificats o mesclades (Van Hamme et al., 2003), les taxes de degradació solen ser molt lentes en aquestes condicions. De manera que en molts casos l'oxigen és un factor limitant per la biodegradació.

D'altra banda, la disponibilitat de nutrients, N i P, però també d'oligoelements com el ferro, imprescindibles per al creixement de la microbiota, té un efecte molt important en les taxes de degradació. El petroli és una font de carboni i energia, en canvi el seu contingut en aquests elements és pràcticament inexistent.

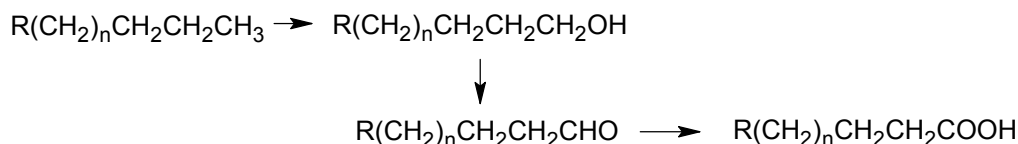
Finalment, el mateix procés de biodegradació del petroli fa que n'augmenti la viscositat i els continguts relatius en sofre, nitrogen, vanadi i níquel i que minvi la proporció de les fraccions més lleugeres (hidrocarburs saturats i aromàtics) en relació a les més pesants (resines i asfaltens), de manera que el producte resultant és més recalcitrant que l'inicial (Connan, 1984).

1.4. Estructura i biodegradabilitat dels compostos

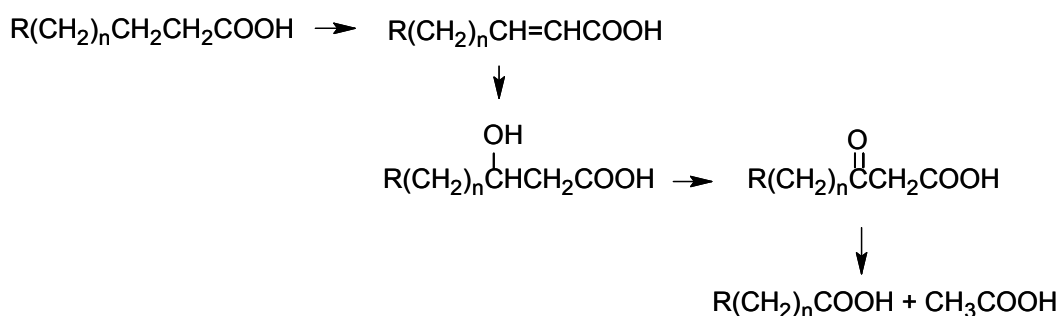
A l'apartat anterior, s'ha fet referència, de manera molt general, a la diversa biodegradabilitat del petroli en funció de la seva composició. Si bé la massa molecular juga un paper clau, altres característiques de l'estructura del compost poden influir en la seva susceptibilitat a ser degradat.

1.4.1. Degradació dels hidrocarburs alifàtics

En primer lloc, els *n*-alcans són els compostos que es degraden més ràpidament (Atlas, 1981; Zobell, 1946). La catàlisi es duu a terme per oxigenases, mitjançant un mecanisme majoritari que inclou una primera oxidació terminal a l'alcohol, una segona a l'aldehid i una última a l'àcid gras corresponent.



L'àcid resultant serà transformat posteriorment mitjançant una seqüència anomenada β -oxidació, en què es generen altres àcids grassos de cadena més curta. La seqüència es repeteix fins que s'arriba a àcid acètic o propiònic, segons el nombre de carbonis de la molècula inicial.



El primer àcid gras, doncs, tindrà dos carbonis més que el segon, el qual, al seu temps, en tindrà dos més que el tercer, etc. D'aquí se'n desprèn que la biodegradabilitat d'un alcà decreix amb el nombre de carbonis (o la longitud de la cadena). De fet, els més utilitzats són els que van del C10 (*n*-decà) al C26 (*n*-hexacosà).

Per a un mateix nombre de carbonis, els alcans ramificats com els isoprenoides presenten una biodegradabilitat inferior (Alexander, 1999). De fet, al camp, l'oxidació dels *i*-alcans pot veure's inhibida per la presència dels *n*-alcans (Pirnik et al., 1974). Els compostos β -ramificats (anteiso-) i els carbonis quaternaris són especialment recalcitrants, a causa dels seus impediments estèrics cap als enzims oxidatius (Schaeffer et al., 1979). Tot i això, s'ha descrit degradació, entre d'altres, del compost quaternari 2,2-dimetil-heptà (Singer i Finnerty, 1984). Així mateix, ha estat descrita la degradació d'un compost inicialment considerat recalcitrant com és el pristà (figura 1.9).

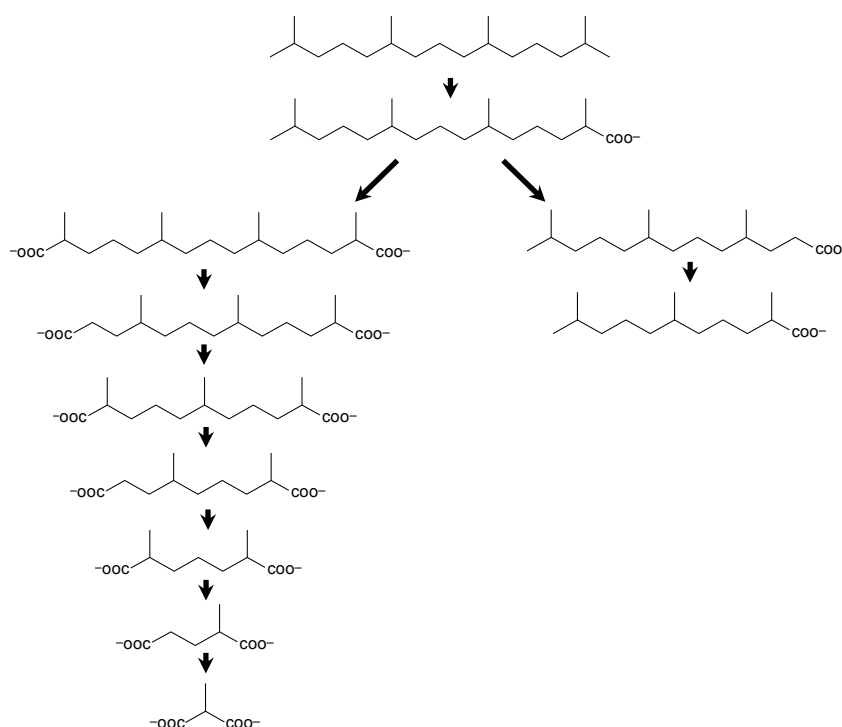


Figura 1.9. Ruta metabòlica del pristà (2,6,10,14-tetrametil-pentadecà). De Morgan i Watkinson, 1994.

Per últim, els cicloalcan són particularment resistents a la biodegradació (Venosa i Zhu, 2003). En concret, els hopans i esterans es troben entre els compostos més persistents al medi (Atlas, 1981).

1.4.2. Degradació dels hidrocarburs aromàtics

En general, els compostos aromàtics es degraden amb més dificultat, a causa de la major estabilitat dels enllaços entre carbonis respecte als compostos alifàtics. A més, com en el cas dels alcans, la biodegradabilitat decreix en augmentar el nombre de carbonis (o el nombre d'anells) (p. ex. Solanas et al., 1984; Prince et al., 2003). El mateix ocorre amb els homòlegs alquilats: els naftalens alquilats són més biodegradables que els dibenzotiofens, que al seu torn es biodegraden més que els fluorens i fenantrens alquilats. En un estudi dut a terme per Wang et al. (1998) els crisens alquilats resultaren ser els més recalcitrants.

Dins d'una mateixa família la susceptibilitat d'atac microbià decreix en augmentar el nivell d'alquilació (Elmendorf et al., 1994; Wang et al., 1998; Prince et al., 2003). S'ha descrit, així mateix, especificitat isomèrica en la degradació d'HAP, en concret de metil-dibenzotiofens i metil-fenantrens, metil-pirens i metil-crisens (Bayona et al., 1986; Wang i Fingas, 1995), si bé en alguns estudis (Prince et al., 2003) s'ha trobat que al camp no se'n produeix.

S'han descrit nombroses soques amb capacitat per degradar els més lleugers, una bona mostra de les quals es troba recopilada a Van Hamme et al. (2003). En canvi, se n'han descrit relativament poques capaces de degradar els de major pes molecular Juhasz i Naidu (2000). A banda de la baixa solubilitat, la recalcitrància dels HAP pesants pot ser deguda a la seva

toxicitat i a la condensació d'anells aromàtics caracteritzats per la seva elevada energia de ressonància (Cerniglia, 1992; Wilson i Jones, 1993).

D'altra banda, el fet que la molècula tingui substituents alquilics pot suposar un obstacle (impediment estèric) per a l'acció de les dioxigenases. A l'inici de la degradació aeròbia dels HAP (figura 1.10), per mitjà d'una dioxigenasa, els microorganismes incorporen dues molècules d'oxigen a l'anell aromàtic pel qual inicien la transformació. La presència de grups alquilats en determinades posicions pot impedir-ne la incorporació.

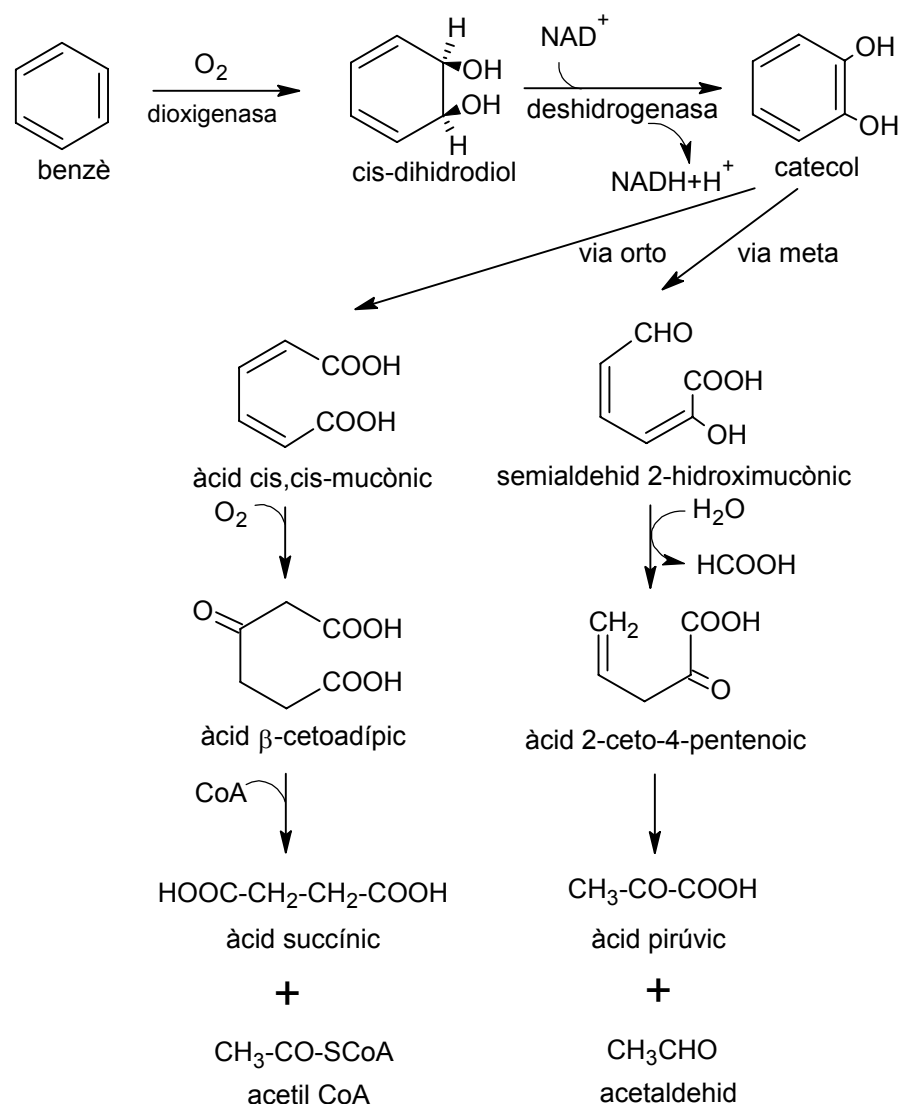


Figura 1.10. Metabolisme bacterià aeròbi de l'anell aromàtic per via orto o meta. Adaptat de Cerniglia, 1984.

1.5. Origen i envelliment del fuel: mètodes d'anàlisi

Donada la importància dels vessaments de petroli al medi, en termes d'impacte sobre els ecosistemes, sobre els recursos naturals i sobre la salut humana, s'ha fet cada cop més

necessari caracteritzar, de manera acurada i sense confusió possible, els productes vessats. La qual cosa resulta d'impotència cabdal per determinar-ne l'origen, així com per conèixer-ne el grau de degradació i la toxicitat reals i potencials. Aquesta identificació, que es fa mitjançant la definició de marcadors interns específics, servirà tant per adoptar les mesures oportunes per al seu tractament, com per poder atribuir les responsabilitats civils derivades (Bohem et al., 1997; Wang i Fingas, 2003).

1.5.1. Tècniques analítiques

En el decurs de les darreres dècades, s'han utilitzat tècniques analítiques diverses per conèixer la composició dels diferents petrolis i dels productes de la seva destil·lació. Wang et al. (1999) n'han recopilat les més importants, un resum de les quals es presenta a continuació.

Tècniques clàssiques

Existeix una gran varietat de tècniques analítiques instrumentals i no instrumentals, que poden agrupar-se, a grans trets, en mètodes específics i no específics. Dintre dels no específics trobem les determinacions gravimètriques i per infraroig (IR), l'espectroscopia de fluorescència UV, la cromatografia de capa fina (TLC), usada a bastament per caracteritzar petrolis i fraccions d'aquests; la cromatografia d'exclusió molecular, la cromatografia de fluids supercrítics (SFC) i la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

Aquestes tècniques, segons els autors, presenten una sèrie d'avantatges, com el fet de requerir una menor preparació de la mostra o tenir uns costos d'ús menors. S'han usat per mesurar els hidrocarburs totals del petroli (TPH), per determinar el tipus d'hidrocarburs presents al medi, així com per comparar qualitativament l'envelliment o la degradació. Per contra, no són suficients per poder assegurar la font de la contaminació.

La cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses (GC-MS) permet analitzar marcadors moleculars específics. Tant és així, que els sistemes d'identificació dels vessaments de petroli usats més freqüentment a l'actualitat es basen en dues tècniques analítiques: la cromatografia de gasos amb detecció de ionització en flama (GC-FID) i la GC-MS. Les dades procedents d'aquests mètodes s'usen per comparar mostres d'origen desconegut amb mostres de les possibles fonts (Faksness et al., 2002).

Darreres tendències: desenvolupament de la petroleòmica

Tot i que la cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses és la tècnica més emprada en l'anàlisi de petrolis, en els darrers anys se n'han començat a utilitzar d'altres que permeten una major resolució (com l'espectrometria de masses de ressonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier, FT-ICR MS, o la cromatografia de gasos bidimensional integrada, GCxGC), les quals han resultat ser útils en mesclades molt complexes, en què la proporció de pics resolts és baixa. Cal tenir en compte que entre els hidrocarburs no resolts (UCM) n'hi ha de molt tòxics (Rowland et al., 2001; Donkin et al., 2003).

Aquestes tècniques constitueixen l'anomenada *petroleòmica* i ja han estat aplicades en estudis de biodegradació o envelliment (p. ex. Reddy et al., 2002; Kim et al., 2005; Arey et al., 2007; Díez et al., 2007).

L'FT-ICR MS permet obtenir un elevat poder de resolució i major exactitud en la massa (p. ex. pot separar isòbars que només difereixen en 3,4 mDa, com ara el grup SH₄ enfront de C₃, ambdós amb massa nominal de 36 Da), cosa que permet assignar la composició elemental de milers de compostos en productes derivats del petroli (Rodgers i Marshall, 2007) (figura 1.11). A més, l'eficiència de detecció no depèn de la massa, a diferència dels analitzadors de temps de vol (ToF).

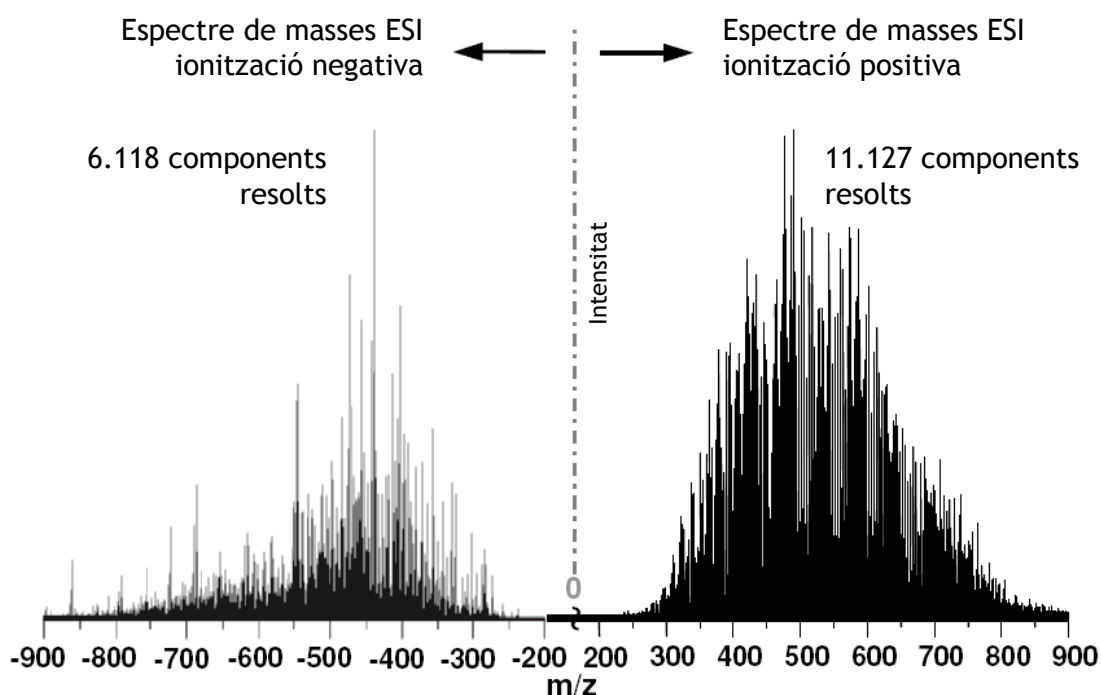


Figura 1.11. Espectre de masses d'un cru de petroli obtingut per espectrometria de masses de resonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier amb ionització per electrospai de 9,4 T combinada (positiva i negativa). Font: Rodgers i Marshall, 2007.

Poden utilitzar-se diversos modes de ionització en funció dels objectius de l'estudi:

- Ionització per electrospai (ESI): ionització selectiva de compostos heteroatòmics polars fortament àcids o bàsics que es trobin en matrius amb predominància d'hidrocarburs (Hughey et al., 2002). La ionització positiva permet determinar espècies bàsiques, moltes de les quals contenen nitrogen piridínic. La negativa, per contra, identifica les àcides, com les que contenen nitrogen pirròlic i els àcids naftènics.
- Ionització per impacte d'electrons (EI): anàlisi de compostos no polars en destil·lats lleugers o moderadament pesants. Permet identificar centenars de compostos sulfurats (com ara benzotiofens) que no poden resoldre's per ESI.

- Fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI): caracterització d'aromàtics polars o apolars. També s'ha utilitzat per estimar la distribució de masses moleculars en productes pesants (Cunico et al., 2004).
- Desorció o ionització de camp (FD/FI): ionització o desorció tèrmica de tot tipus de fraccions, fins i tot les més pesants. Permet analitzar compostos polars o apolars.

Pel que fa a la cromatografia bidimensional, tota la mostra és objecte de dues separacions en columnes cromatogràfiques amb selectivitats diferents: generalment (en configuracions anomenades ortogonals) hi ha una primera separació en funció, principalment, del punt d'ebullició en una columna apolar (primera dimensió) i una segona separació gairebé isotèrmica en funció de la polaritat (segona dimensió), de manera que compostos isovolàtils que coeluirien en una cromatografia monodimensional es poden resoldre a la segona dimensió.

La conseqüència és l'aparició en un cromatograma de milers de punts en un espai bidimensional, que es distribueixen per grups seguint patrons definits (figura 1.12).

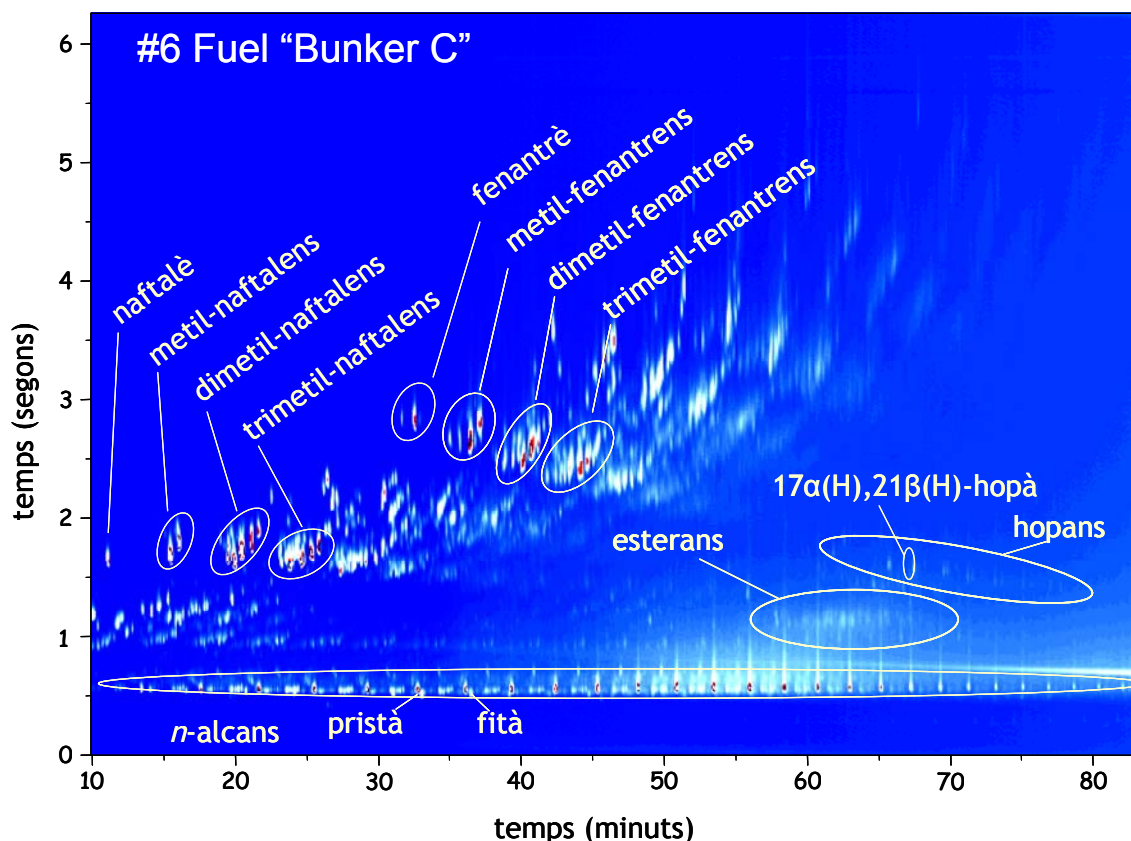


Figura 1.12. Mapa bidimensional d'un fuel pesant, Bunker C.

Si bé és cert que s'està treballant en l'obtenció d'índexs de retenció lineals bidimensionals per a la seva correcta assignació, l'ús de detectors espectromètrics és molt útil per identificar-los. Actualment, la majoria dels estudis amb cromatografia bidimensional s'han

dut a terme utilitzant detectors de temps de vol (ToF) o quadrupols de nova generació (>20 Hz d'escombrat), les principals aplicacions i avantatges i inconvenients dels quals poden trobar-se recopilats per Mondello i col·laboradors (2008).

1.5.2. Indicadors

L'ús i la millora de la GC-MS ha permès identificar i quantificar compostos individuals. Aquests compostos s'han aplicat com a marcadors específics del petroli, la qual cosa ha possibilitat l'establiment d'indicadors del seu origen o del grau d'envelliment.

Indicadors d'origen

L'envelliment que pateix el producte vessat al medi li provoca uns canvis al llarg del temps que dificulten la identificació de l'origen. S'han estudiat a bastament (al llarg del darrer quart del segle passat) i recopilat (p. ex.: Boehm et al., 1997; Wang et al., 1999; Wang i Fingas, 2003) tot un ventall de mètodes per abordar el problema.

La major part d'aquests es basen en l'ús dels anomenats marcadors moleculars o compostos específics de la font, com el $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -hopà (figura 1.13), tot i que n'hi ha d'altres. La selecció d'uns o altres compostos dependrà del tipus de producte, de l'ambient en què es troba, així com de la necessitat de tenir informació per a futures comparacions (Wang i Fingas, 2003).

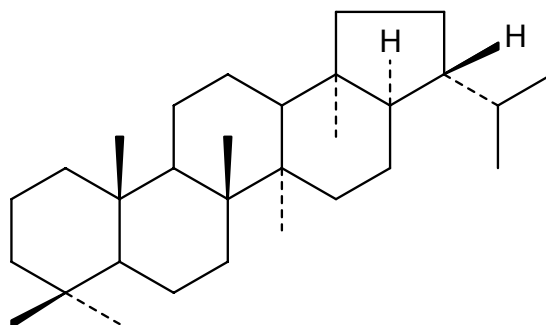


Figura 1.13. Estructura del $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -hopà, emprat comunament com a patró intern.

En primer lloc, pot usar-se la distribució dels *n*-alcans i dels isoprenoides pristà i fità. Aquesta aproximació és útil per caracteritzar productes poc envellits, ja que amb el pas del temps els compostos més lleugers es degraden o volatilitzen (figura 1.14).

També s'han caracteritzat vessaments utilitzant la distribució de compostos d'importància ambiental, com els 16 HAP prioritzats per la USEPA i, en especial, els seus homòlegs alquilats (Boehm et al., 1997, Wang i Fingas, 2003).

Això no obstant, especialment en els darrers anys, els estudis s'han centrat en la utilització dels marcadors moleculars (triterpens, esterans i diasterans), els quals romanen en petrolis envellits (figura 1.14), a diferència dels compostos anteriors. Aquests marcadors comencen

a emprar-se a les darreries dels anys 70 (Albaigés i Albrecht, 1979; Siefert i Moldowan, 1978) i el seu ús és encara vigent.

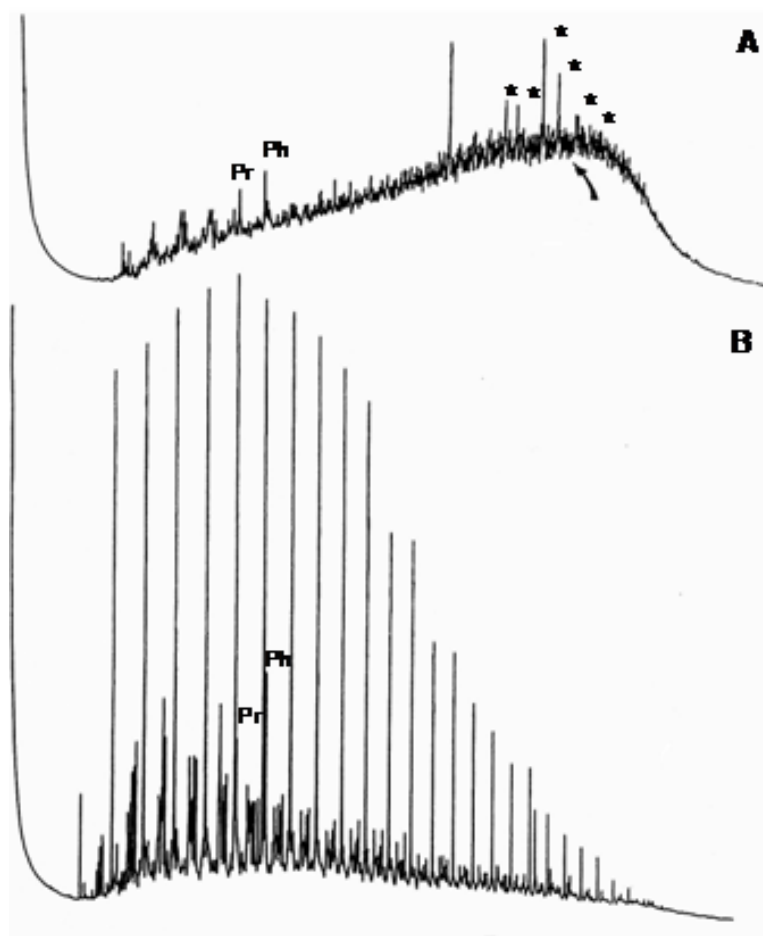


Figura 1.14. Perfil cromatogràfic de la fracció saturada de cru de petroli. A correspon a la mostra biodegradada i B a l'original. Els asteriscos indiquen els hopans. Pr és pristà i Ph fità. Els nombres indiquen el nombre de carbonis en els *n*-alcans. De Bayona et al., 1986.

Les diverses tècniques no són excloents. De fet, poden utilitzar-se de manera complementària, seqüencialment, en la identificació de la font d'una mostra de petroli (figura 1.15).

Indicadors d'envelliment

La mesura de la biodegradació al camp ha suposat durant molt de temps un repte. En general, el problema s'ha abordat relacionant la concentració dels compostos suposadament biodegradables amb la d'altres que s'han mostrat més recalcitrants. Alexander (1999) indica que podem mesurar l'activitat microbiana en funció de la pèrdua d'una substància en relació a una altra, de comportament físic i químic similar, però menys susceptible de ser biodegradada. Si la concentració de la més biodegradable decreix, hem de suposar que la causa és la degradació biològica, en estar ambdues igual d'exposades a la volatilització, etc.

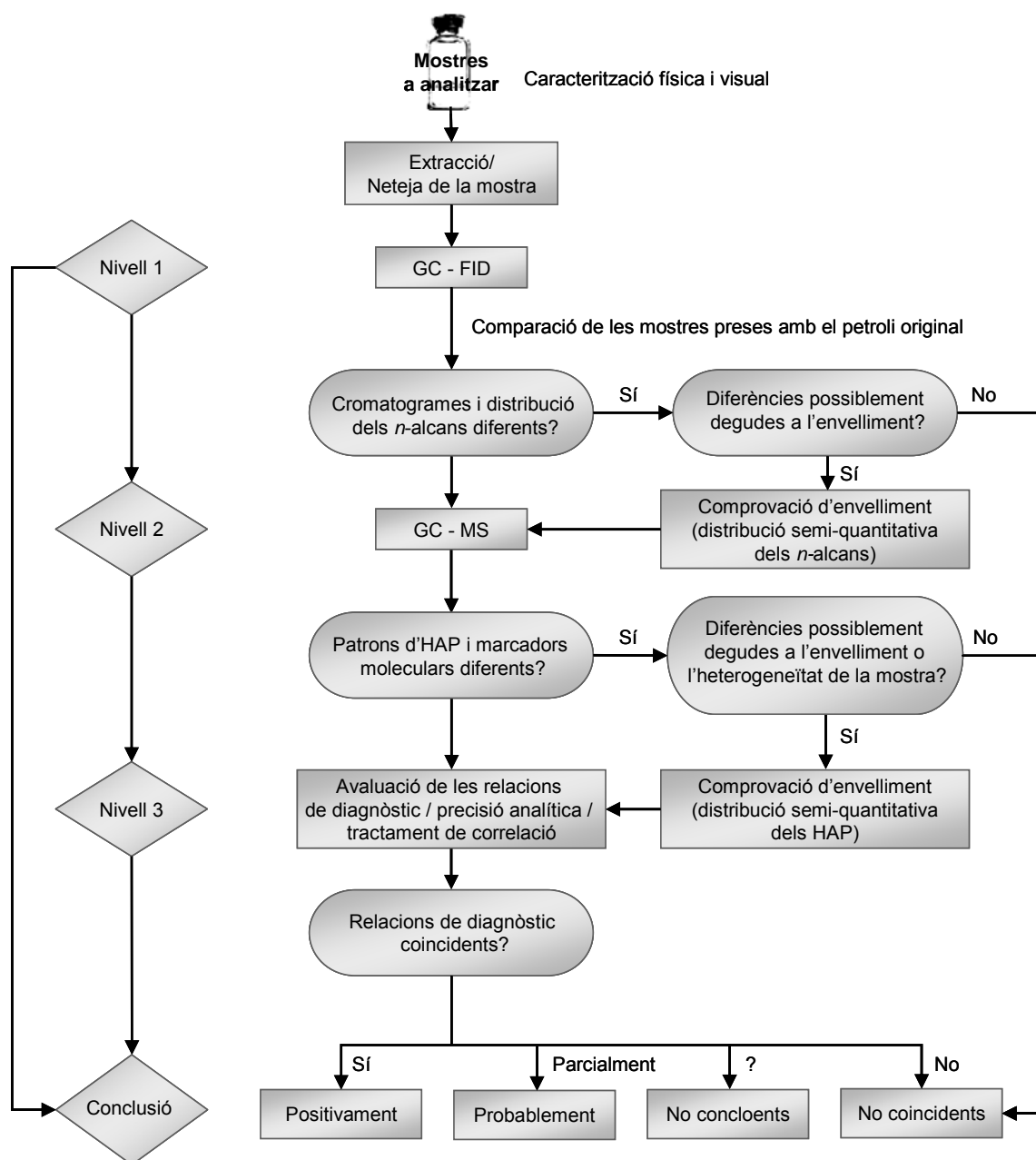


Figura 1.15. Protocol/diagrama de presa de decisions per a la identificació d'un vessament de petroli. Adaptat de Daling et al., 2002.

Un exemple serien les parelles formades pels *n*-alcans de 17 i 18 carbonis i els respectius isoprenoides (pristà i fità). Com s'ha vist, els *n*-alcans són utilitzats amb més facilitat que els isoprenoides. Per aquest motiu s'han emprat les relacions C17/pristà i C18/fità com a índex d'envelliment (Wang et al., 1998; Faksness et al., 2002).

Amb tot, a mesura que els *n*-alcans van essent degradats, els microorganismes comencen a usar els ramificats, de manera que, en última instància, també aquests desapareixen. Arribats a aquest punt, doncs, aquests indicadors deixen de ser d'utilitat, ja que es podria infravalorar la magnitud real de la biodegradació en cas que s'empressin (Wang et al., 1998). Per tant, és necessari buscar algun altre marcador intern, que serveixi per a mesurar la degradació biològica a més llarg termini.

Prince et al. (1994) proposen l'ús del $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -hopà (figura 1.13) com a patró intern, per la seva resistència a la degradació (Atlas, 1981) i pel fet que es prou abundant a pràcticament tots els petrolis. Si bé aquest indicador s'ha emprat molt extensament (Wang et al.; 1998; Maki et al., 2003), se n'han proposat d'altres amb característiques similars, com el $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -30-norhopà, el qual resultava ser més abundant en el petroli subjecte d'estudi d'Outdot et al. (1998).

Altres índex d'envelliment es basen en la degradació específica de diversos isòmers. Aquest és el cas dels HAP. Per exemple, donat que el 4-metildibenzotiofè és més resistent a la biodegradació que els isòmers 1- i 2-/3- pot usar-se la relació $(2\text{MD}+3\text{MD})/4\text{MD}$ com a índex d'envelliment (Wang i Fingas, 1995).

1.6. Les comunitats microbianes: mètodes d'anàlisi

Tot i que els organismes procariotes (dominis Archaea i Bacteria) tenen un paper predominant en els cicles biogeoquímics en què se sosté la vida al nostre planeta, únicament s'han descrit formalment unes 7.200 espècies (Euzéby, 2008) dels milions que se suposa que existeixen (Torsvik et al., 2002). De fet, l'ordre de magnitud és encara desconegut i hi ha força controvèrsia al respecte, si bé alguns estudis apunten que en un únic gram de sòl pot haver-hi de 10^4 a 10^6 espècies i que la biosfera terrestre conté uns 10^{30} individus (Whitman et al., 1998).

Segons Pedrós-Alió (2006) la biodiversitat d'un ecosistema consta de dos elements: en primer lloc, existeix un grup de tàxons que hi desenvolupen la majoria de les funcions, creixen de manera activa i pateixen grans pèrdues per lisi viral o predació. Es tracta de tàxons difícils de cultivar però que es detecten mitjançant tècniques moleculars (no dependents de cultiu). En segon lloc, hi ha tàxons poc abundants, amb creixement extremadament lent però amb baixa predació i lisi viral. Són molt difícils de detectar amb tècniques moleculars, però alguns poden créixer en cultius.

Precisament, les estimacions de la diversitat bacteriana s'han basat tradicionalment en mètodes dependents de cultiu. Les tècniques de recomptes de viables en placa o nombres més probables (MPN) s'han usat per quantificar les cèl·lules actives de mostres ambientals, tot i els biaixos i restriccions que suposen. S'ha comprovat que aquests mètodes tendeixen a subestimar la biodiversitat en comparació amb els mètodes no dependents de cultiu, ja que només entre un 0,001 i un 1% dels microorganismes viables són cultivables (Torsvik et al., 2002).

A mitjan anys 80 del segle passat, Staley i Konopka (1985) posaren nom a un fenomen ben conegut: els comptatges directes al microscopi excedeixen els recomptes de viables en diversos ordres de magnitud. El fenomen, conegut com a *gran anomalia del recompte en placa* (*great plate count anomaly*), podria ser degut a la presència de: (a) espècies per a les

quals les condicions de cultiu no són les adients o (b) espècies desconegudes o que mai s'han cultivat per manca de metodologies apropiades (Amann et al., 1995).

Malgrat les limitacions que puguin tenir, els mètodes dependents de cultiu encara s'utilitzen, ja que presenten avantatges: A banda de facilitar la detecció de tàxons poc abundants, el fet de poder disposar de cultius purs permet avaluar-ne les capacitats metabòliques i la fisiologia; és a dir, les funcions. Amb el temps, el desenvolupament de les metodologies de cultiu afavorirà que es puguin cultivar més microorganismes. Així mateix, si es té consciència de les limitacions que aquestes presenten, poden ser útils en estudis comparatius.

1.6.1. Metodologies independents de cultiu

A causa de les restriccions que presenten les tècniques dependents de cultiu, cada cop és més freqüent en l'ecologia microbiana l'ús de metodologies d'anàlisi que no requereixin cultivar els microorganismes (Amann et al., 1995; Head et al., 1998; Riesenfeld et al., 2004), les quals es basen en l'estudi de marcadors com els àcids grassos de fosfolípids (PLFA) o els àcids nucleics.

Aquestes tècniques poden usar-se amb diferents finalitats, com dur a terme estudis filogenètics o caracteritzar estructures de comunitats microbianes (*fingerprinting*), per exemple. Entre els mètodes emprats per determinar l'estructura de les comunitats microbianes, que generalment utilitzen el gen 16S rRNA, trobem:

Anàlisi dels fosfolípids de membrana (PLFA) presents en una comunitat microbiana, generalment per GC-MS: És útil per detectar canvis ràpids en l'estructura i s'ha utilitzat en estudis de biodegradació i bioremediació de petroli (p. ex. Margesin et al., 2007), però no permet assignar afiliacions filogenètiques, és per això que sovint s'utilitza aquesta anàlisi combinada amb altres metodologies (p. ex. MacNaughton et al., 1999).

Anàlisi de restricció de gens rRNA amplificats (ARDRA) (Vanechoutte et al., 1993): amplificació per PCR dels gens rRNA, seguida d'una digestió emprant diversos enzims de restricció. Els patrons obtinguts són representatius dels microorganismes analitzats, però es necessita tenir una llibreria de clons del gen amplificat, per tal de poder conèixer els patrons de restricció de cadascuna de les espècies.

Anàlisi de polimorfismes de conformació del DNA de cadena simple (SSCP) (Lee et al., 1996): separació electroforètica de productes de PCR desnaturalitzats. Les cadenes simples adopten conformacions que depenen de la seqüència nucleotídica, la qual cosa en determina la migració. Aquesta tècnica permet separar mesclades heterogènies d'amplicons procedents de mostres ambientals i també ha estat emprada per estudiar canvis en comunitats microbianes en experiments de bioremediació (p. ex. Wenderoth et al., 2003; Lin et al., 2007).

Electroforesi en gel de gradient desnaturalitzant químic (DGGE) o tèrmic (TGGE) (Muyzer, 1993): separació electroforètica de fragments de DNA de la mateixa longitud (o molt similar) però amb seqüències diferents (Fischer i Lerman, 1979), també permet separar amplicons en

mesclades heterogènies. L'ús d'aquest tipus d'electroforesi està molt estès i ha servit, com l'SSCP, per caracteritzar comunitats microbianes en processos de bioremediació de petrolis (McNaughton et al., 1999; Kasai et al., 2002; Röling et al., 2002, 2004; entre d'altres).

Polimorfisme de longitud dels fragments terminals de restricció (T-RFLP) (Liu et al., 1997): amplificació per PCR en què un dels encebadors està marcat amb una molècula fluorescent en l'extrem 5' (en cas que ambdós encebadors estiguin marcats cal que els fluorocroms siguin diferents). A diferència de les DGGE, TGGE i SSCP, també és necessari disposar d'una llibreria per tal de poder comparar els patrons de restricció.

La tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) va desenvolupar-se a finals dels anys 80 del segle passat (DeLong et al., 1989). Consisteix en la determinació de l'abundància a l'ambient de procarotes no cultivats marcant el 16S rRNA amb sondes fluorescentes. L'avantatge és que no depèn de PCR (les limitacions de la qual han estat discutides a bastament, p. ex.: Ward et al., 1990; Liesack et al., 1991; Suzuki i Giovanni, 1996; Head et al., 1998), a més pot aportar informació sobre la morfologia, el nombre i la distribució de les cèl·lules a l'ambient (Moter i Göbel, 2000). Per contra, cal assegurar la correcta permeabilitat cel·lular, optimitzar acuradament la hibridació i normalitzar la fluorescència emesa.

Totes aquestes metodologies han suposat un gran salt en l'anàlisi de la biodiversitat microbiana, ara bé, descriure la diversitat taxonòmica de les comunitats és únicament el primer pas: Actualment el repte rau a trobar la relació entre la presència als ecosistemes de tàxons específics i les funcions metabòliques que aquests desenvolupen (Gray i Head, 2001; Riesenfeld et al., 2004).

Una primera aproximació és estudiar gens que intervinguin en les rutes metabòliques d'interès. Inoue i col·laboradors (2005) avaluaren la diversitat de bacteris degradadors de carbazols estudiant el cluster de gens *car* (alguns dels quals homòlegs al *CA10* de *Pseudomonas resinovorans* i el *KA1* de *Sphingomonas* sp.). Altres autors s'han centrat en la degradació d'alcans, per mitjà d'hidroxilases (p. ex. Throne-Holst et al., 2006; van Beilen et al., 2006), o en la d'hidrocarburs aromàtics (p. ex. Ní Chadhain et al., 2006; Velázquez et al., 2006; Zhou et al., 2006; Sipilä et al., 2008).

En segon lloc, l'estudi de l'RNA missatger (mRNA) ha permès conèixer quins són els gens que s'estan expressant. Fleming i col·laboradors (1993), per exemple, trobaren una correlació entre la concentració d'mRNA del gen *nahA* (involucrat en la degradació aeròbia del naftalè) i la taxa de biodegradació d'aquest hidrocarbur.

Per últim, amb l'aparició de metodologies basades en el subministrament de substrats marcats amb isòtops estables (SIP) s'ha pogut aprofundir el coneixement de la relació entre microorganisme i funció. Consisteixen a incubar la mostra ambiental (sòl, aigua marina, etc.) en presència d'un substrat marcat amb C13 per tal d'identificar els microorganismes de la comunitat que l'han incorporat, ja sigui als fosfolípids de membrana (Boschker et al., 1998), al DNA (Radajewski, 2000) o a l'RNA (Manefield et al., 2002).

Totes tres permeten observacions directes d'assimilació de substrat en comunitats mínimament alterades. Ara bé, mentre que l'anàlisi d'àcids nucleics aporta informació filogenètica directa, l'ús dels fosfolípids de membrana com a marcadors incrementa significativament la sensibilitat de la tècnica, de manera que poden utilitzar-se substrats que no estiguin totalment marcats (Kreuzer-Martin, 2007). En estudis amb àcids nucleics, però, es requereixen compostos completament marcats, molts dels quals (els més complexos) no són disponibles comercialment ni poden sintetitzar-se per qualsevol laboratori.

Sigui com sigui, aquestes metodologies continuen depenent de la PCR, amb els inconvenients i limitacions que aquesta suposa. Per tal de resoldre el problema, en els darrers anys s'han començat a fer estudis metagenòmics. Entenem per metagenòmica l'anàlisi de DNA genòmic extret directament de les comunitats microbianes de mostres ambientals. En general, els genomes de molts microbiomes són diversos ordres de magnitud majors que el genoma humà (3 Gb) (Handelsman J, 2005). Com que la representació dels diferents tàxons pot ser molt diversa, s'han de fer grans llibreries per trobar determinades espècies, de manera que l'esforç de seqüenciació és immens. I tot i que actualment es tenen les eines necessàries aquestes tampoc no es troben a l'abast de qualsevol laboratori.

L'exemple d'un estudi dut a terme al mar dels Sargassos (Venter et al., 2004) és prou il·lustratiu: Van construir-se set llibreries independents que generaren un total de més de 1,6 Gb de seqüència de DNA. Es van trobar més de 1,2 milions de gens nous, més de 700 dels quals foren fotoreceptors semblants a rhodopsines (*rhodopsin-like*), pertanyents a 1.800 espècies genòmiques diferents, 148 de les quals eren filotipus desconeguts.

Com en el cas de l'anàlisi química, les tècniques moleculars no són excloents. Recentment, de fet, han començat a emprar-se de manera conjunta. Kalyuzhnaya i col·laboradors (2008), per exemple, duen a terme l'anàlisi de metagenomes (el que ells anomenen seqüenciació aleatòria del genoma, WGS) marcats amb isòtops estables per poder trobar microorganismes rellevants en la degradació de metà, metanol, metilamina, formaldehid o format, presents en el llac Washington (Seattle, EUA).

Malgrat la diversitat de tècniques existents, no n'hi ha cap que ens proporcioni una informació completa ni estigui exempta de limitacions. Podríem dir, doncs, que la millor aproximació a l'estudi de les comunitats microbianes serà aquella que combini, en la mesura del possible, diferents metodologies. Un exemple il·lustratiu és un estudi recent del nostre grup, en què va analitzar-se taxonòmicament un consorci microbià degradador d'HAP. Varen dur-se a terme aïllaments en diferents medis de cultiu i també anàlisis per DGGE i llibreria de clons. Amb aquestes tres tècniques es varen identificar 18 microorganismes diferents, 7 dels quals només per aïllament, 4 només per la llibreria i 2 només per DGGE (Viñas et al. 2005a).

1.7. Estratègies de bioremediació

Com s'ha vist, el petroli pateix tot un ventall de processos de transformació i envelliment, dels quals la biodegradació és el principal, si més no en la fracció no volàtil (Venosa i Zhu, 2003). A més, la biodegradació microbiana suposa, en la majoria dels casos, la transformació (mineralització) dels hidrocarburs a diòxid de carboni i aigua, que són els productes més desitjats des del punt de vista ambiental i ecotoxicològic.

Molt sovint, però, les taxes de degradació es veuen limitades pels factors ambientals. A més, part dels productes són recalcitrants. Tot plegat ha fet que en els darrers anys s'hagi vist necessari l'ús de tècniques de tractament. Inicialment, aquestes es basaven en mètodes físics i químics diversos: ús d'aigua a pressió i *skimmers*, aplicació de dispersants, recuperació mitjançant camions aspiradors o ús de catalitzadors fixats a micropartícules per augmentar la fotooxidació. Posteriorment, els biològics han anat prenent importància (Swannell et al., 1996).

Entre els darrers, cal destacar la *biorecuperació* (més coneguda com a *bioremediació*), tècnica que s'aplica sobretot en ecosistemes especialment sensibles o en llocs en què la neteja mecànica no pot dur-se a terme (Wang et al., 1998). Aquesta tècnica es donà a conèixer a nivell mundial arran de l'accident de l'*Exxon Valdez* (Bragg et al., 1994; Prince i Bragg, 1997).

Una definició plausible de *bioremediació* pot ser: "l'ús de sistemes biològics per reduir la contaminació a l'aire o a sistemes aquàtics o terrestres" (BBSRC, 2004). En general, els sistemes biològics a què es fa referència són plantes o, amb més freqüència, comunitats microbianes. Es pretendria, doncs, augmentar la taxa de degradació dels contaminants, o minimitzar-ne la concentració després del tractament, aprofitant el potencial metabòlic dels microorganismes.

Des del punt de vista de l'origen dels microorganismes, poden establir-se diverses estratègies d'aproximació al problema. En primer lloc, el *bioforç* (o també *bioaugment*) consisteix a inocular microorganismes al·lòctons com a suplement a la població existent. La *bioestimulació*, per contra, suposa l'addició de nutrients (generalment nitrogen i fòsfor) o altres co-substrats limitants i/o la modificació de l'hàbitat, per tal d'estimular el creixement de les poblacions autòctones (Venosa i Zhu 2003).

1.7.1. Bioestimulació

En moltes ocasions, l'ambient disposa de poblacions microbianes potencialment degradadores d'hidrocarburs, sobretot si hi ha hagut antecedents de contaminació (Venosa i Zhu, 2003; Medina-Bellver et al., 2005; Gallego et al., 2006; Snape et al., 2006). Habitualment, però, representen menys de l'1% de la comunitat microbiana total (Atlas, 1995). Així mateix, les condicions en què es troben poden no ser les més propícies per al seu creixement ni, doncs, per a la degradació del producte vessat (vegeu 1.3.1).

Tot i que la majoria dels crus de petroli són biodegradables en gran mesura (Prince, 1997), el seu contingut en nitrogen, fòsfor i elements traça essencials per al creixement microbià és pràcticament nul. A més, si bé alguns ambients marins poden ser més o menys rics en nutrients, la majoria són oligotròfics. Així doncs, en general la biodegradació es veu limitada per la disponibilitat de nitrogen i fòsfor (Floodgate, 1984).

Amb tot, a les platges, especialment de granulometria fina, la limitació principal acostuma a ser l'oxigen. La disponibilitat d'aquest pot veure's afectada per l'acció de les ones, el flux d'aigua, l'estat físic del fuel o la quantitat de substrat disponible (Venosa i Zhu, 2003). Algunes estratègies de bioremediació, doncs, consisteixen a proporcionar oxigen o altres compostos oxidants, com peròxids de calci o magnesi, i s'han utilitzat freqüentment en ambients terrestres (en la descontaminació d'aigües subterrànies, per exemple), no tant en ambients marins (Lee i Merlin, 1999).

En molts estudis, en canvi, s'ha pretès comprovar l'efectivitat de l'addició de nutrients en la degradació d'hidrocarburs procedents del petroli (p. ex. Swannell et al., 1996; Maki et al., 2003; Zhu et al., 2004; Fernández-Alvárez et al., 2006). Generalment, aquesta addició s'efectua en excés (Head i Swannell, 1999), però també s'ha fet calculant la quantitat de fòsfor i nitrogen a afegir en funció de la requerida per a la conversió de tot l'hidrocarbur en diòxid de carboni, o per a la maximització de la taxa de degradació, etc. (Head i Swannell, 1999).

Habitualment s'aplica entre un 1 i un 5% de N per pes de petroli, amb una relació N:P d'entre 5 i 10:1. (Swannell et al., 1996). El problema és que en els ambients costaners l'acció de les ones tendeix a dispersar els nutrients, de manera que és impossible mantenir constant aquesta proporció.

Els nutrients poden aplicar-se en diverses formes. Un bon recull pot trobar-se a Zhu et al. (2004). L'ús de sals minerals, KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , MgNH_4PO_4 i fertilitzants comercials inorgànics, en forma d'esprais o granulats, ha estat freqüent (Swannell et al., 1996; Venosa et al., 1996; Röling et al., 2004), principalment perquè són fàcils d'aconseguir i tenen un baix cost. El principal inconvenient que presenten és la solubilitat en aigua, que els fa susceptibles de perdre's fàcilment per lixiviació.

S'ha trobat que l'addició d'aquest tipus de fertilitzants pot fer augmentar les taxes de biodegradació, les quals depenen, en última instància, de les concentracions de nutrients intersticials (Bragg et al., 1994; Venosa et al., 1996). Per a solucionar els problemes de pèrdues per rentat, s'han començat a emprar fertilitzants oleofílics i d'alliberament lent de N i P (*slow-release fertilizers*).

Els d'alliberament lent són productes relativament insolubles o solubles recoberts amb materials hidrofòbics, com ara parafines (Zhu et al., 2004) que es presenten, generalment, en forma sòlida. Exemples d'aquest tipus de fertilitzants són el *Customblen*, utilitzat després de l'accident de l'*Exxon Valdez* a Prince William Sound (Swannell et al., 1996); el *Max Bac*, aplicat a la badia de Brest per degradar cru de petroli (Outdot et al., 1998), o l'*Osmocote*

(Röling et al., 2004), tot i que en els primers casos no va veure's un increment de la biodegradació.

L'avantatge que presenten és que no requereixen aplicacions tan freqüentment, per bé que un dels principals reptes és trobar la taxa òptima d'alliberament de nutrient per tal de mantenir les concentracions a l'aigua intersticial. Si aquest s'allibera amb excessiva celeritat (com sembla ser que ocorria en el cas de *Custoblen*) pot ser rentat, mentre que si ho fan amb excessiva lentitud (seria el cas del *Max Bac*), mai no s'arribarà a la concentració adequada.

Els fertilitzants oleofílics començaren a utilitzar-se per tal d'aconseguir tenir els nutrients adherits en el petroli a tractar, de manera que s'afavorís el creixement bacterià a la seva superfície durant períodes perllongats de temps (Pritchard i Costa, 1991). L'ús d'aquests fertilitzants faria que no fos tan important controlar la concentració de nutrient en l'aigua intersticial. En la majoria dels casos, es pretengueren aplicar per al tractament de taques a la superfície de l'aigua.

Els fertilitzants oleofílics han estat provats al camp i els resultats obtinguts es poden trobar a la literatura (Zhu et al., 2004). Probablement l'agent utilitzat més conegut és l'*Inipol EAP 22* (fabricat per *Elf Aquitaine* i aplicat en el tractament de costes afectades per l'accident de l'*Exxon Valdez*). Es tracta d'una microemulsió que conté urea com a font de nitrogen; lauril fosfat sòdic com a font de fòsfor, 2-butoxi-1etanol com a tensioactiu i àcid oleic per tal de confegir hidrofobicitat a la mescla. En principi aquest producte hauria d'evitar la formació d'emulsions aigua en petroli, en reduir-ne viscositat; alliberar els nutrients de manera controlada i no resultar tòxic per a la flora ni la fauna (Ladousse i Tramier, 1991).

Hi ha discrepàncies en els resultats obtinguts en estudis que avaluaven l'aplicació d'aquest tipus de nutrient. Mentre que Bragg et al. (1994) trobaren que l'addició del fertilitzant accelerava la taxa de degradació del cru de petroli procedent de l'*Exxon Valdez*, en un estudi dut a terme per Lee i Levy (1989) a Nova Escòcia no es va veure que l'*Inipol* l'estimulés. Alguns autors apunten que probablement els experiments duts a terme per Bragg et al. (1994), fallaven en el disseny experimental, la presa de les mostres i el tractament estadístic (Venosa, 1998).

Fins ara s'ha fet referència a aquells ambients amb mancança de nutrients. Però, fins i tot en localitats en què n'hi hagi en excés, la degradació es pot veure limitada per la biodisponibilitat, ja que els hidrocarburs constituents del petroli són hidrofòbics i, a més, sovint els microorganismes requereixen estar en contacte amb l'hidrocarbur per iniciar-ne la degradació (McKew et al., 2007b). Per això s'ha proposat l'ús de tensioactius (especialment d'origen biològic, com ara Rhamnolípid) per emulsionar el petroli i fer-lo més accessible a l'atac microbià (Ron i Rosenberg, 2002; Ábalos et al., 2004).

Els resultats en els experiments de bioestimulació han estat molt diversos i molt específics del lloc on s'han efectuat, de les condicions ambientals, etc. Evidentment, l'èxit dels tractaments dependrà no únicament del fertilitzant aplicat, sinó també d'altres factors com el tipus de producte vessat, el tipus de sediments presents, la disponibilitat d'oxigen de

l'ambient, la temperatura, etc. Aquests tractaments poden resultar efectius en llocs com ara Alaska, amb clara limitació de nutrients. Així mateix, un nutrient oleofilic pot ser més útil en casos de contaminació inframareal, mentre que en localitats amb contaminació supramareal, en què el rentat és menor, podrien ser més útils els hidrosolubles.

1.7.2. Bioreforç

En llocs en què no hi hagi hagut antecedents de contaminació per hidrocarburs el percentatge de degradadors d'hidrocarburs serà ínfim. Els temps de resposta per a la biodegradació, doncs, es poden allargar. Des dels passats anys 70, s'ha proposat l'addició (sembla) d'inòculs que siguin capaços de degradar hidrocarburs com a alternativa a la bioestimulació, per tal de reduir el temps en què s'inicia el procés (Forsyth et al., 1995). La majoria dels microorganismes sembrats s'obtenen per enriquiment de cultius procedents de localitats prèviament contaminades (Atlas, 1995).

S'han dut a terme experiments tant en ambients controlats com en condicions reals (Venosa i Zhu, 2003; Zhu et al., 2004; Gentili et al., 2006), en els quals s'ha constatat que, mentre que a escala experimental o en bioreactors els resultats en l'ús d'aquesta tècnica poden ser satisfactoris, al camp no suposa una millora respecte el no ús o respecte l'addició de nutrients o una adequada aeració (Atlas, 1995; Venosa et al., 1996; Sabaté et al., 2004).

Alguns estudis, en canvi, com l'efectuat per Tsutsumi et al. (2000), han pretès demostrar l'efectivitat del bioreforç al camp, basant-se en evidències visuals i tractament digital d'imatges. Amb tot, els efectes observats podrien ser causats per altres processos físics o químics, com ara l'acció tensioactiva dels productes aplicats, etc. (Swannell et al., 1996).

En general, l'obtenció dels inòculs es du a terme pel procediment d'enriquiment en medi discontinu: Una mostra de sòl o d'aigua contaminada s'afegeix a una solució que conté la mescla d'hidrocarburs (com a font de carboni i energia) i sals inorgàniques. Quan s'observa una clara desaparició dels productes químics d'interès o un creixement dels microorganismes, se subcultiva en el mateix medi. El procediment es repeteix per incrementar el nombre de microorganismes actius en el substrat d'interès.

Alexander (1999) apunta que aquest procediment afavoreix aquells microorganismes de ràpid creixement a elevades concentracions de substrat, que es multipliquen a pH neutres i en excés de nitrogen i fòsfor. Aquests organismes, en canvi, poden tenir dificultats per créixer en ecosistemes naturals o zones contaminades, en què les concentracions de N i P, i sovint les de substrat, són baixes, amb pH distants de la neutralitat i subjectes a altres condicions d'estrès ambientals (temperatures canviants, salinitat, presència de toxines, de predadors, etc.) (Goldstein et al., 1985).

Contradient aquesta teoria, recentment alguns autors recomanen l'aplicació de microorganismes considerats especialistes en la degradació de petroli en ambients marins com *Alcanivorax borkumensis* o *Thalassolituus oleivorans* (McKew et al., 2007b) com a agents de bioaugment. En un experiment dut a terme in vitro (McKew et al., 2007b) *Alcanivorax* sp.

va incrementar la degradació tant d'alcans ramificats, com dels HAP. L'augment en la degradació dels HAP podria atribuir-se bé a la producció de tensioactiu per part d'*Alcanivorax* sp. (Yakimov et al., 1998) o a la degradació de les cadenes laterals dels HAP metilats (Iwabuchi et al., 2002).

En qualsevol cas, sembla probable que la població microbiana existent no sigui el factor limitant en comparació amb els nutrients o la disponibilitat d'oxigen. A la majoria dels ambients naturals els degradadors autòctons tenen capacitat per dur a terme aquesta degradació si el nivell de nutrients o altres factors no els limiten. Estudis que comparen la bioestimulació amb el bioreforç suggereixen que, quan no existeix limitació en l'oxigen disponible, l'addició de nutrient té majors efectes en la biodegradació que la inoculació de microorganismes (Jobson et al., 1974; Venosa et al., 1996; Lee et al., 1997).

Capítol 2

Objectius

2.1. Objectius generals

Els objectius generals de la present tesi són:

- Caracteritzar els processos de degradació (biodegradació i fotooxidació) del fuel del *Prestige*, des del punt de vista químic, per tal de contribuir a conèixer-ne el destí ambiental.
- Descriure les comunitats microbianes implicades en la seva biodegradació.
- Avaluar l'efectivitat de l'ús d'un fertilitzant oleofílic com a bioestimulant.

2.1. Objectius específics

Aquests, al seu temps, es poden concretar en una sèrie d'objectius específics, com són:

- Estudiar la biodegradabilitat in vitro del fuel del *Prestige* per part de dos consorcis microbians al·lòctons i avaluar l'ús d'un fertilitzant oleofílic com a possible agent per a la bioremediació.
- Avaluar in situ els efectes de l'ús del fertilitzant oleofílic en la biodegradació del fuel i en les comunitats microbianes.
- Avaluar l'ús de marcadors moleculars com a índexs d'origen o d'envelliment del fuel.
- Obtenir un consorci autòcton degradador de fuel.
- Estudiar els canvis en una comunitat microbiana autòctona al llarg d'un procés de biodegradació de fuel del *Prestige* in vitro.
- Aprofundir el coneixement dels microorganismes que tinguin un rol important en la biodegradació del fuel.
- Avaluar l'ús de diferents tècniques clàssiques, dependents de cultiu, i moleculars, no-dependents, després de la seva aplicació a una mateixa comunitat microbiana.
- Estudiar les interaccions entre els processos de fotooxidació i biodegradació in vitro.

