

Eliminación de naftaleno
en aguas marinas contaminadas
por vertidos de petróleo
mediante inmovilización
de bacterias degradadoras

Memoria final

*Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia de la USC
y dirigido por el Profesor Tomás González Villa.*

INTRODUCCIÓN

1. ACCIDENTES MARÍTIMOS	3
2. HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO	
3. TOXICIDAD DE LOS HIDROCARBUROS PARA LOS ORGANISMOS	6
4. BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	8
5. FACTORES QUE AFECTAN A LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS	11
5.1. Nutrientes	11
5.2. Variables ambientales	12
5.2.1. Oxígeno	12
5.2.2. Salinidad	13
5.2.3. Temperatura	13
5.2.4. pH	14
5.2.5. Concentración de sustancias contaminantes	14
6. INMOVILIZACIÓN	14
6.1. Alginato	16

OBJETIVOS	20
------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO	21
2. MÉTODOS ANALÍTICOS	21
4. MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN	22
5. CONDICIONES DE CULTIVO	23
6. VIABILIDAD CELULAR	24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RECTA PATRÓN	25
2. EXTRACCIÓN DEL NAFTALENO DE LAS MUESTRAS	25
3. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE <i>PSEUDOMONAS STUTZERI</i> 19SMN4 INMOVILIZADAS.	27
4. DEGRADACIÓN DE NAFTALENO EN AGUA DE MAR.	27
4.1. Efecto del suplemento de nutrientes sobre la degradación del naftaleno.	28
4.2. Efecto de la temperatura sobre la degradación.	30
4.3. Efecto de la concentración inicial de naftaleno.	32
4.4. Efecto de la viscosidad del alginato.	35
5. ESQUEMA DEL BIOFILTRO CONTENIENDO LAS BACTERIAS INMOVILIZADAS	37

CONCLUSIONES	39
---------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	40
---------------------	----

INTRODUCCIÓN

1. ACCIDENTES MARÍTIMOS

En la actualidad, uno de los problemas medioambientales más preocupantes son los vertidos de petróleo en el mar con la consecuente contaminación de la costa. Éstos se producen como consecuencia de una combinación de diferentes acciones y circunstancias. En primer lugar están las operaciones que, de forma rutinaria, se llevan a cabo en los buques, tales como las operaciones de carga, descarga y almacenamiento del fuel. No obstante, el mayor impacto ocurre cuando se producen accidentes: fallos en el casco, encallado de los buques, incendios o colisiones. En estos casos, los derrames aumentan dramáticamente hasta cientos de miles de toneladas, produciéndose las mareas negras y los desastres ecológicos, culturales y económicos tanto en el mar como en las zonas costeras que quedan arrasadas Exxon Valdez (1989), Nakhodka (1997), Prestige (2002).

La reciente marea negra provocada por el accidente del buque Prestige ha puesto de manifiesto las limitaciones con las que contamos a nivel español y europeo para dar respuesta rápida y eficaz a situaciones de potencial crisis alimentaria. Pero al mismo tiempo, y a pesar de la confrontación social y política que esta catástrofe ha supuesto, puede representar una oportunidad de aprendizaje de la que se deberían derivar una serie de herramientas que permitan afrontar futuras crisis en mejores condiciones (Fernández L. y Freire J.,2005).

2. HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

El petróleo está compuesto por una mezcla de hidrocarburos que pueden agruparse en cuatro clases: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Colwell y Walker, 1977).

Tabla 1. Características de los componentes de los derivados del petróleo (Iniesta y Blanco, 2005)

Grupo	Subgrupo	Características	Proporción en los combustibles (%)
Saturados	1.Alcanos (hidrocarburos alifáticos): n-alcanos lineales (parafinas); isoalcanos ramificados. 2.Cicloalcanos: anillos saturados. 3.Ceras: compuestos saturados de gran tamaño.	Alta degradación microbiana hasta 22 carbonos Baja solubilidad en agua (excepto <C16) Baja toxicidad	Gasolina: 50-60 Diesel: 65-95 Crudo ligero: 55-90 Crudo pesado: 25-80 Fuel oil pesado: 20-30
Aromáticos	1.Monoaromáticos (BTEX): anillos sencillos de benceno 2.Poliaromáticos: 2-6 anillos de benceno	Baja tasa de biodegradación Alta (BTEX) o moderada-baja (PAH) solubilidad en agua Alta toxicidad	Gasolina: 25-40 Diesel: 5-25 Crudo ligero: 10-35 Crudo pesado: 15-40 Fuel oil pesado: 30-50
Compuestos polares	1.Resinas: tienen S, N ó O. 2.Asfaltenos: compuestos de gran tamaño	Muy baja degradación Muy baja solubilidad en agua y toxicidad	Gasolina: 0 Diesel: 0-2 Crudo ligero: 1-15 Crudo pesado: 5-40 Fuel oil pesado: 10-30

La disolución es la transferencia de compuestos hidrosolubles del fuel al agua y empieza a ocurrir inmediatamente después de producirse el vertido. Su importancia reside en que es el mecanismo por el que se transfiere la toxicidad del fuel al agua, pues hace biodisponibles los compuestos más tóxicos e hidrosolubles del petróleo, los hidrocarburos aromáticos, en especial los de bajo peso molecular (benceno, tolueno, naftaleno y fenantreno) para los organismos marinos (Iniesta y Blanco, 2005).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) están formados por al menos dos anillos aromáticos de benceno (fig.1). Su solubilidad en agua es muy reducida y disminuye con el aumento del peso molecular y número de sustituciones. Su volatilidad es también muy baja. Son los hidrocarburos más tóxicos del petróleo y tienen una elevada persistencia y gran afinidad por los tejidos grasos, lo que favorece su bioacumulación.

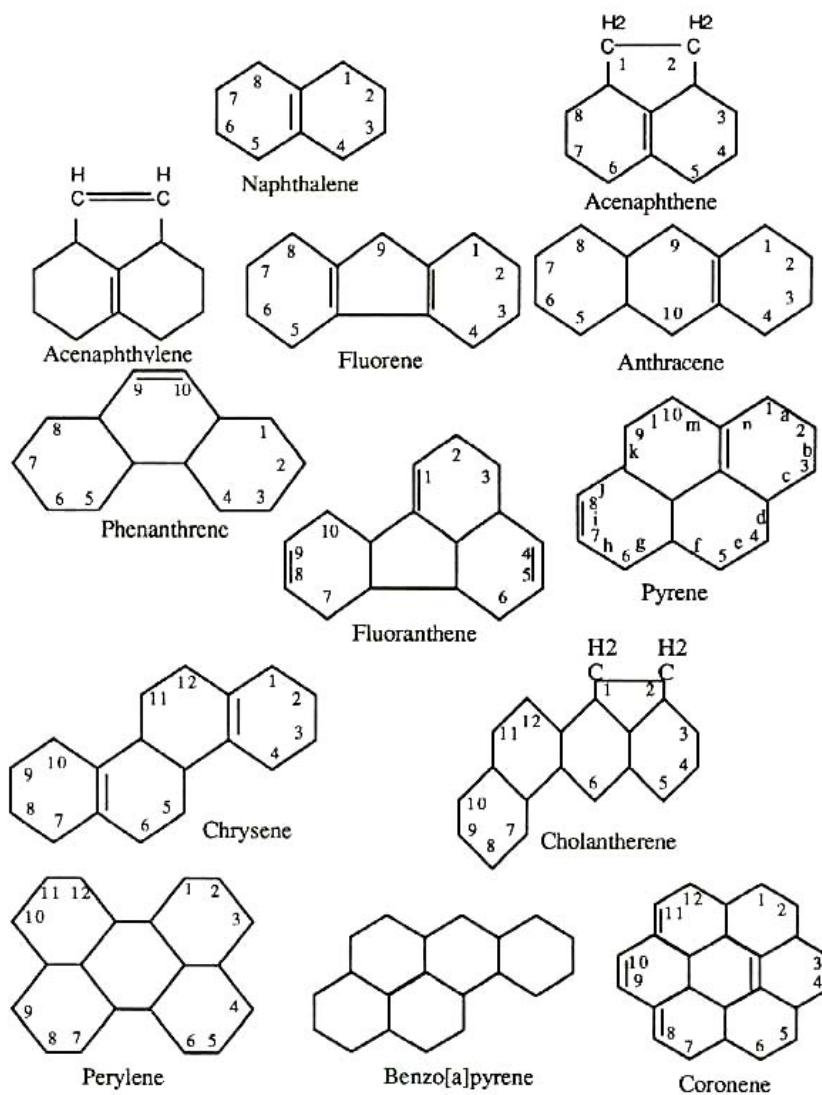


Fig.1. Estructura química de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

El naftaleno es el hidrocarburo aromático policíclico de menor tamaño y mayor solubilidad. Se trata de un hidrocarburo aromático de bajo peso molecular con dos anillos bencénicos.

Es moderadamente volátil con un punto de ebullición de 218 °C y una solubilidad en agua de 31,7 mg/L a 25°C. (Preuss et al., 2003).

El naftaleno y sus derivados metilados (metilnaftalenos) suelen ser los

HAPs dominantes en la mayoría de los fueles y crudos, y también los que antes se pierden por disolución.

Las pruebas de solubilidad realizadas con el fuel del Prestige mostraron que, tras exponer el fuel durante 5 días al agua de mar, el compuesto disuelto más abundante fue el naftaleno (Iniesta y Blanco, 2005) (Tabla 2)

Tabla 2. Concentración de hidrocarburos en agua de mar tras 5 días de contacto con el fuel del Prestige.

Hidrocarburo	Concentración (µg/L)	
	Fuel puro	Fuel emulsionado
Benceno	38	9
Tolueno	62	17
Etilbenceno	15.3	5.7
Meta-xileno	28	11
Para-xileno	11.3	4.4
Orto-xileno	30	12
1-metil-3-etilbenceno	9.0	4.4
1-metil-4-etilbenceno	4.0	1.92
1,3,5-trimetilbenceno	4.5	2.4
1-metil-2-etilbenceno	7.4	3.6
1,2,4-trimetilbenceno	22	12
1,2,3-trimetilbenceno	11.3	6.7
1,2,4,5-tetrametilbenceno	5.0	3.5
1,2,3,4-tetrametilbenceno	7.5	5.3
Naftaleno	78	73
Acenaftileno	1.4	1.5
Acenafteno	48	54
Fluoreno	1.8	1.8
Fenantreno	2.6	2.7
Antraceno	0.2	0.1
Fluoranteno	0.7	0.3

3. TOXICIDAD DE LOS HIDROCARBUROS PARA LOS ORGANISMOS

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, Lyon) clasifica los fueles pesados como compuestos de potencial cancerígeno 2B. Ello quiere decir que se dispone de evidencia suficiente de su actividad carcinogénica a partir de estudios con animales de experimentación pero que las pruebas sobre la actividad carcinogénica en humanos son insuficientes (Agencia Española de Seguridad Alimentaria, 2003).

En general, dicho potencial cancerígeno se atribuye a los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en las fracciones de petróleo. Entre ellos destacan los 16 compuestos incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA) : naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[ah]antraceno, benzo[ghi]perileno y indeno[1,2,3-cd]pireno. (EPA, 1986)

Desde la año 2000, en el cual la US National Toxicology Program encontró claras evidencias de la actividad carcinogénica del naftaleno en ratas, las agencias internacionales: International Agency for Research on Cancer (IARC), la US Environmental Protection Agency (US EPA), y la Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) han reclasificado el naftaleno como un posible carcinogénico humano (Preuss et al., 2003).

Se ha demostrado que la exposición sistemática al naftaleno y sus derivados causa enfermedades y perturbaciones en el metabolismo humano (Agency for Toxic Substances and Disease Registry , 1990)

La exposición al naftaleno se ha relacionado con la anemia hemolítica en personas con deficiencia en glucosa-6- fosfato deshidrogenasa y en niños recién nacidos (Manohar y Karegoudar ,1998) e inhibe el consumo de oxígeno en varios organismos. Estudios experimentales en animales han demostrado que los HAPs pueden presentar otros efectos (hematológicos, inmunológicos o sobre la reproducción). Sin embargo, estos efectos aparecen en dosis muy superiores a las que pueden encontrarse en los alimentos.

El riesgo para el consumidor se produce por la integración de los HAPs en la cadena alimentaria. La inmensa mayoría de sustancias carcinogénicas no ilustran casos de toxicidad aguda en el medio alimentario. En este caso, el peligro esencial es la toxicidad crónica, es decir el consumo habitual de productos contaminados, que puede producir efectos sobre la salud a largo plazo (Agencia Española de Seguridad Alimentaria, 2003; Fernández y Freire, 2005).

Se ha demostrado que el naftaleno y 2-metilnaftaleno se concentran en organismos marinos, tanto en vertebrados como en invertebrados (Sharanagouda y Karegoudar, 2001).

Los peces incorporan del agua los hidrocarburos más solubles, como los compuestos monoaromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), los alcanos de cadena corta y los HAPs de bajo peso molecular como el naftaleno (Roubal et al., 1978)

Al problema del consumo por el hombre de estos productos contaminados con hidrocarburos se suman los diferentes problemas fisiológicos y bioquímicos en los organismos marinos afectados, que van a tener consecuencias sobre su viabilidad y éxito reproductivo, y pueden provocar alteraciones genéticas.

4. BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar o transformar compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de la utilización de los contaminantes como fuente de alimento y energía. Para que esto ocurra, es necesario favorecer las condiciones para el crecimiento y la biodegradación (Van Deuren et al., 1997).

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados es una opción que presenta ventajas con respecto a métodos físicos y químicos: (i) son efectivas y ambientalmente seguras; (ii) los contaminantes se destruyen o transforman; (iii) se pueden aplicar in situ (iv) generalmente no se requieren tratamientos adicionales; (v) suelen presentar ventajas económicas. En contrapartida suele tratarse de procesos lentos, que involucran muchas etapas y que se realizan bajo condiciones ambientales complejas y no modificables.

Desde los estudios pioneros de ZoBell (1946) en ambientes marinos, se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos.

En ambientes acuáticos los principales géneros de bacterias y hongos con esta capacidad son, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*,

Nocardia, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*. (Atlas, 1981)

No todos los hidrocarburos se degradan con la misma facilidad. En general las tasas de biodegradación disminuyen con el aumento del peso molecular y complejidad de los hidrocarburos. Las tasas de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos son inversamente proporcionales al número de anillos y de sustituciones. (Leahy y Colwell, 1990; Atlas, 1981)

La degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de 2 y 3 anillos aromáticos (naftaleno, fluoreno y fenantreno) con un consorcio de microorganismos o mediante cepas puras ha sido objeto de numerosas publicaciones (Sepic et al., 1997). Se han aislado un gran número de especies de *Pseudomonas* con capacidad de utilizar hidrocarburos del petróleo (Atlas, 1981).

La capacidad para degradar naftaleno por parte de microorganismos pertenecientes a la especie *Pseudomonas putida* ha sido previamente descrita (Park et al. 2004; Dorn et al., 2003; Ahn et al., 1998; Guerin y Boyd, 1995)

En las últimas dos décadas se ha estudiado extensamente la ruta biodegradativa de este compuesto en bacterias pertenecientes a este género. En estos organismos, los genes degradativos (a menudo denominados genes *nah*) se encuentran localizados en dos operones: la vía degradativa superior codifica para la conversión de naftaleno a salicilato, y la vía degradativa inferior codifica para la transformación de salicilato a metabolitos centrales vía catecol (fig.2) (Yen and Serdar, 1988). Generalmente la información genética para la degradación de hidrocarburos en las especies de *Pseudomonas* se encuentra en plásmidos (Habe and Omori, 2003)

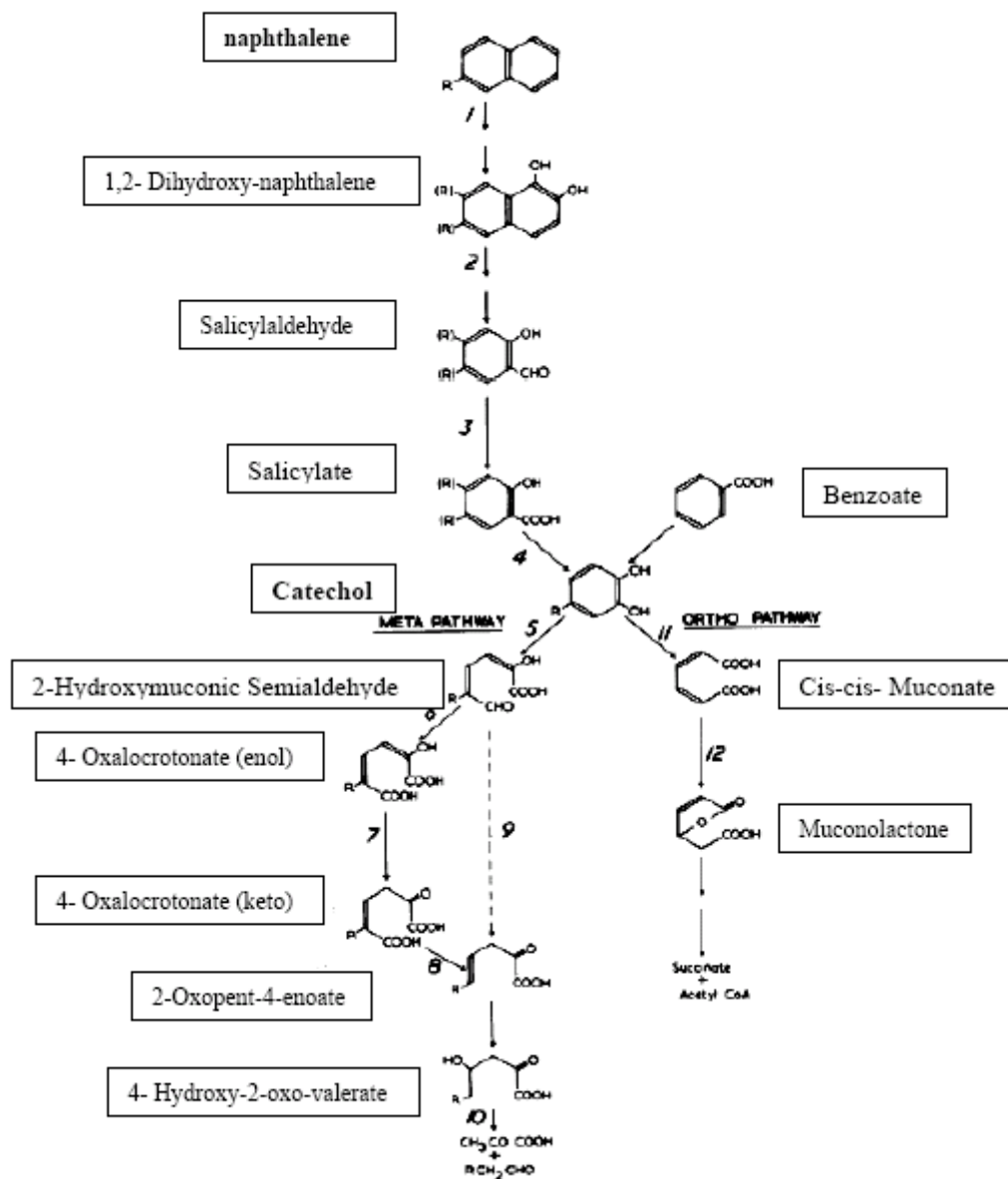


Fig.2 Metabolismo de compuestos aromáticos por *Pseudomonas P₆*. Para el naftaleno, R = H; para el 2- metilnaftaleno, R= CH₃ .R entre paréntesis representa posibles alternativas equivalentes.Los números corresponden a las enzimas: 1, naphthalene oxigenase; 2, 1,2-dihydroxynaphthalene oxygenase; 3, salicylaldehyde dehydrogenase;4, salicylate hydroxylase; 5, catechol 2,3- oxygenase; 6, 2-hydroxymuconic semialdheyde dehydrogenase 7, 4-oxalocrotonate tautomerase; 8, 4-oxalocrotonate decarboxylase; 9, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase; 10, 4-hydroxy—2-oxovalerate aldolase;11, catechol 1,2-oxygenase; 12, cis cis-muconate lactonizing enzyme.. (Williams et al.,1975)

Cerniglia y Heitkamp (1989) han sugerido los siguientes principios aplicados a la degradación de los HAPs:

- 1) Una gran variedad de bacterias, hongos y algas tienen la habilidad de degradarlos.
- 2) La hidroxilación de los HAPs implica la incorporación de oxígeno molecular.
- 3) Los microorganismos procariotas metabolizan los HAPs con un ataque inicial de una dioxigenasa para dar cis,dihidrodiol que además es oxidado para formar dihidróxidos.
- 4) HAPs con más de 3 anillos de benceno no sirven como sustrato para el crecimiento bacteriano lo que hace que este deba estar sujeto a una transformación co-metabólica.
- 5) Muchos de los genes son codificados por plásmidos.
- 6) HAPs de bajos pesos moleculares como el naftaleno son degradados rápidamente mientras que aquellos de alto peso como el antraceno o el benzopireno son más resistentes a la degradación.
- 7) La biodegradación ocurre con mayor eficiencia en la interfase sedimento/agua.
- 8) La adaptación microbiana puede ocurrir por continuas exposiciones a los HAPs.

5. FACTORES QUE AFECTAN A LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS

5.1. Nutrientes.

Los microorganismos dependen de diversos nutrientes para su supervivencia. A pesar de que los requerimientos son diferentes en función del tipo de microorganismo de que se trate, todos necesitan nitrógeno, fósforo y carbono.

En la descomposición del fuel, la fuente de carbono no representa ninguna limitación ya que proviene de las propias moléculas orgánicas.

Existe cierta confusión y conflicto cuando se analiza la limitación de la biodegradación de petróleo debido a la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en agua de mar. Mientras que un gran número de investigadores han afirmado que se trata de nutrientes limitantes (Ahn et al., 1998; Head and Swannell,

1999); aunque con distintas conclusiones a cerca de la proporción C/N, C/P necesaria, otros han llegado a la conclusión opuesta, debido a que cuando se consideran hidrocarburos solubles la solubilidad de estos es tan baja que imposibilita que se dé un ratio C/N o C/P desfavorable (Atlas, 1981)

Según Ahn et al. (1998) el naftaleno podría ser tóxico para *Pseudomonas putida* cuando no existe una fuente de nitrógeno y/o oxígeno. Estos dos elementos son claves en la biodegradación del naftaleno y probablemente de otros HAPs, no solamente para el mantenimiento del metabolismo que conduce a la degradación, sino para la supresión de la toxicidad que podría ocurrir si el naftaleno no es metabolizado y se acumula hasta niveles tóxicos.

La fuente de nitrógeno podría influir en los productos finales o intermediarios del metabolismo del naftaleno. Diferentes fuentes de nitrógeno durante la oxidación del naftaleno pueden dar lugar a diferencias en la morfología celular, acumulación de ácido salicílico, evolución de CO₂ y producción de un color amarillo en el medio (Aranha and Brown, 1981)

5.2. Variables ambientales.

Además de estos factores nutricionales existen varias **variables ambientales** que influyen en la degradación de los contaminantes orgánicos, tanto en sistemas terrestres como acuáticos. Estas variables incluyen la temperatura, pH, salinidad y, en particular la disponibilidad de oxígeno (Bauer and Capone, 1985). A continuación se comentan algunas de las condiciones ambientales que pueden afectar al crecimiento y, por tanto, a la efectividad del proceso de biodegradación de los hidrocarburos:

5.2.1. Oxígeno.

Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias implican la oxidación del sustrato mediante oxigenasas, las cuales requieren oxígeno molecular. Normalmente no existen condiciones limitantes en la superficie de la columna de agua o en las capas superficiales de los ecosistemas bentónicos marinos.

Tradicionalmente, se ha considerado que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos tiene lugar a tasas despreciables, y que, por lo tanto, la

importancia ecológica es limitada. No obstante, posteriores investigaciones han puesto de manifiesto la trascendencia de las rutas catabólicas anaeróbicas en la biorremediación. (Leahy and Colwell, 1990)

En el caso concreto de la degradación del naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 se ha demostrado que la carencia de oxígeno provocaba la muerte de la misma en la presencia de naftaleno. (Ahn et al., 1998)

5.2.2. Salinidad

Cuando la concentración de sal en las zonas afectadas por un vertido son elevadas, la eliminación de contaminantes con métodos de biorremediación convencionales resulta difícil. Concentraciones de sal elevadas provocan alteraciones en las membranas de las células, pueden desnaturalizar los enzimas implicados en el proceso o provocar la desecación osmótica de las células provocándoles su muerte (Kargi and Dincer, 2000). El número de estudios que analiza el efecto de la salinidad en la degradación microbiológica de fueles es escaso, aunque su efecto perjudicial sobre la actividad microbiana sí ha sido descrito (Diaz et al., 2000). No obstante, se han obtenido diversos microorganismos capaces de vivir y mantener las tasas de biodegradación en condiciones de salinidad elevadas (Diaz et al., 2000).

5.2.3. Temperatura

La temperatura es un parámetro fundamental a considerar en la biorremediación *in situ*, ya que tanto la biodisponibilidad como la solubilidad de los compuestos más hidrofóbicos dependen de este parámetro. Un incremento de temperatura provoca un descenso de la viscosidad y, por tanto, afecta al grado de dispersión y al aumento de las tasas de difusión de los compuestos orgánicos.

Temperaturas altas incrementan la metabolización de los hidrocarburos normalmente hasta un máximo entorno a los 30 - 40°C, por encima de la cual la toxicidad de los hidrocarburos aumenta para la membrana celular. (Leahy and Colwell, 1990)

En comparación con los ecosistemas mesofílicos, hay pocos ejemplos de biorremediación de lugares contaminados sometidos a bajas temperaturas. Se han caracterizado diversos microorganismos adaptados a las bajas

temperaturas, capaces de degradar hidrocarburos. El umbral para una degradación significativa es de 0°C (Siron et al., 1995). De la misma manera, a temperaturas elevadas, como por ejemplo en las zonas litorales de regiones semiáridas, también se han encontrado microorganismos termófilos, que poseen un determinado potencial para la conversión de hidrocarburos.

En general la tasa de degradación decrece cuando baja la temperatura, lo cual se cree que está relacionado con la disminución de la actividad enzimática como consecuencia del efecto "Q10". (Leahy and Colwell, 1990)

Además la solubilidad del oxígeno depende de la temperatura y este como ya se ha comentado, es un factor fundamental en la biodegradación aeróbica.

5.2.4. pH

Afecta a la solubilidad de muchos compuestos y, por tanto, a la disponibilidad de productos que pueden afectar a la actividad biológica.

El pH óptimo para la actividad del sistema enzimático naftaleno dioxigenasa(fig.2) ,que cataliza el primer paso de la ruta catabólica del naftaleno es 7. Según Dorn et al. 2003 el catabolismo del naftaleno está influenciado por el pH.

5.2.5. Concentración de sustancias contaminantes

En aquellos casos en los que la concentración de hidrocarburos es demasiado elevada se produce una reducción en la cantidad de oxígeno y nutrientes disponibles. Esto crea una situación de estrés para los microorganismos que puede reducir su capacidad para degradar el fuel.

6. INMOVILIZACIÓN

Una aproximación efectiva para encontrar una solución práctica a la contaminación es concentrar los biodegradadores inmovilizándolos por medio de soportes naturales o sintéticos con alta porosidad que permitan su uso en diferentes tipos de reactor, o biofiltros a través de los cuales se haga pasar el agua contaminada.

La inmovilización de macromoléculas, células y enzimas ha sido extensivamente estudiada durante los últimos 20 años debido a su gran potencial en un amplio rango de campos, incluidos la medicina, alimentación, agroquímica, medio ambiente, almacenamiento celular, catálisis de reacciones químicas y otros.

Pese a ello existen muy pocas publicaciones de su aplicación directa en biorremediación de áreas contaminadas (Rahman et al., 2006)

La biodegradación de compuestos orgánicos como el fenol, ácido dicloroacético, piridina o acetofenona se ha visto muy favorecida por la inmovilización de los microorganismos en fibras o micropartículas elaboradas con distintos polímeros naturales y/o sintéticos. Los polímeros protegen a los microorganismo de la toxicidad del xenobiótico y/o mejoran las velocidades de degradación (Cassidy et al., 1997; Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; Gardin y Pauss ,2001)

La biorremediación de compuestos tóxicos usando la tecnología de inmovilización de microorganismos ha sido estudiada empleando diferentes transportadores que incluyen poliacrilamida (Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; White y Thomas ,1990), alginato (Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; Weir et al., 1995), o κ -carragenina (Cassidy et al., 1997; Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001;Gardin y Pauss ,2001)

Las principales ventajas de la inmovilización son: (i) estabilidad, (ii)elevada densidad celular,(iii) elevadas tasas de conversión, (iv) limitación de la inhibición por sustrato y toxicidad debido a límites difusionales (Abou Seoud y Maachi, 2003) y (v) uso en reactores continuos (Manohar y Karegoudar,2001) .

La inmovilización de las bacterias aumenta significativamente la biodegradación de crudo en comparación con células libres en un amplio rango de salinidad (Diaz et al., 2002)

La degradación de naftaleno por células de *Pseudomonas* spp inmovilizadas en alginato, agar y poliacrilamida ya ha sido estudiada, demostrándose la efectividad de esta frente al uso de células libres. Esto podría ser debido a un tipo de estabilización de membrana, que protegería las células mejorando las tasas de degradación en las células inmovilizadas.

6.1. Alginato

Los alginatos son las sales del ácido algínico, polisacárido natural, no tóxico, que se obtiene de algunas “algas marrones” como *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* y *Laminaria hyperborea*.

Está compuesto de dos unidades monoméricas, el ácido- β -D-manurónico (M) y el α -L-gulurónico (G). El contenido relativo de cada uno de estos bloques depende del tipo de alga, de su grado de desarrollo y en menor medida, de las condiciones de su crecimiento. La presencia mayoritaria de uno u otro monómero repercute ostensiblemente en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de gelificación de los alginatos (Serp et al. ,2000). Este hecho, unido a la gran variedad de alginatos existentes, ha suscitado un debate acerca de la composición más adecuada para la elaboración de las cápsulas

Estos monómeros se unen como bloques formando una cadena. La cadena polimérica que constituye el ácido algínico y sus sales se compone de tres tipos de regiones o bloques. Los bloques G contienen sólo unidades derivadas del ácido L-gulurónico, los M se basan enteramente en ácido D-manurónico y las regiones MG, que consisten en unidades alternadas de ambos ácidos (fig.3)

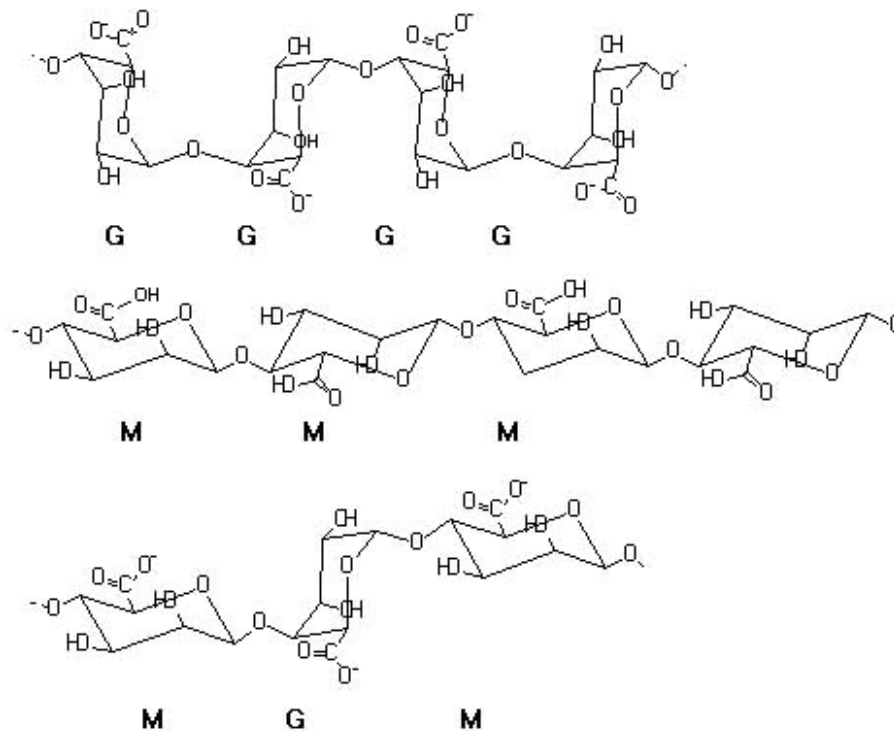


Fig.3. Bloques G (ácido L-gulurónico); bloques M (ácido D-manurónico) y regiones MG.

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica.

El alginato forma geles insolubles como consecuencia de su unión a cationes multivalentes como el calcio (Albarghouthi et al 2000). El calcio es el ión divalente de mayor uso en la formación de geles de alginato debido a que sus sales son económicas, de fácil disponibilidad y no tóxicas. Las más usadas son el carbonato de calcio, sulfato, cloruro, fosfato o tartrato.

El modelo que explica la formación de los geles de alginato con sales cálcicas se denomina "egg-box" (fig.4) y se basa en la formación de una unidad dimérica entre los iones calcio y las cadenas del polímero en forma de bucles (regiones de bloques GG) (Grant et al., 1973).

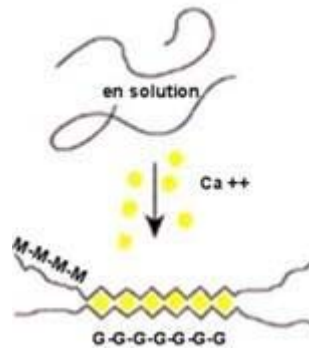


Fig. 4. Representación gráfica del modelo “Egg-box” .

La secuencia de residuos de ácido gúlrónico se cree que es la responsable de las propiedades gelificantes del alginato con cationes divalentes, mientras que las de manurónico son las de interacción preferente con el agua. Por lo tanto, un alginato con elevados niveles de secuencias G presentará una mayor afinidad por agentes de entrecruzamiento (cationes polivalentes) que un alginato con bajo contenido en G .

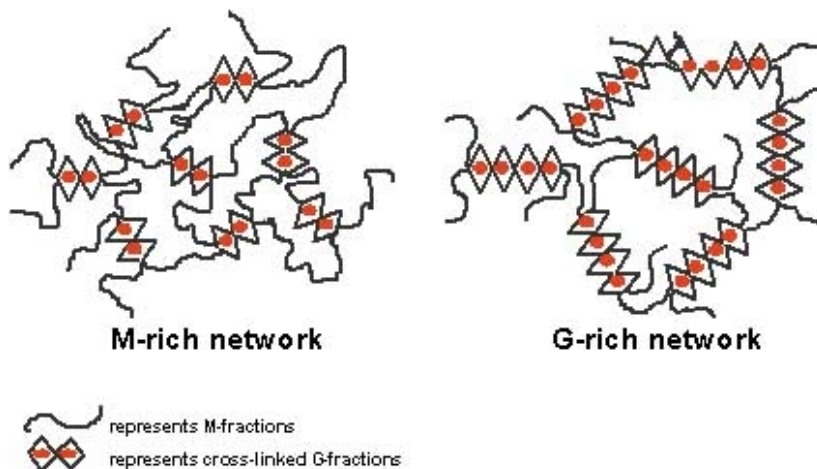


Fig.5. Redes de alginato.

El uso del alginato como matriz destinada a la inmovilización presenta una serie de ventajas, como son: una elevada porosidad y estabilidad química junto con un método de inmovilización rápido, simple y de bajo coste (Abou Seoud y Maachi, 2003). Además la inmovilización de las bacterias en alginato permite que estas se puedan reutilizar después de la biodegradación sobre crudo, sin que se vea comprometida su capacidad degradativa y evita que las

células sean “lavadas” en sistemas de aguas “abiertas” con lo cual se reduce el coste.(Rahman, 2006; Quek et al, 2006; Manohar y Karegoudar,2001)

La principal desventaja que presenta es la desestabilización que sufre en presencia de agentes quelantes de Ca^{+2} o cationes monovalentes (Serp et al. ,2000) así como su inestabilidad cuando entra en contacto con elevadas concentraciones de aniones fosfato, citrato y lactato, los cuales tienen afinidad por los iones calcio. (Albarghouthi et al. ,2000)

OBJETIVOS

El objetivo del presente proyecto es el desarrollo de un biofiltro elaborado con bacterias con capacidad de degradar el naftaleno con el fin de eliminar este contaminante del agua marina empleada en el cultivo de peces y mariscos por las empresas de acuicultura instaladas en Galicia. En base a ello se formulan los siguientes objetivos concretos:

1. Determinación de la capacidad degradativa de naftaleno de los cultivos puros de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 .
2. Diseño de un método de inmovilización.
3. Medición de la eficacia degradativa de las células inmovilizadas en agua de mar.
4. Estudio de los requerimientos nutricionales de las células inmovilizadas en agua de mar.
5. Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de las células inmovilizadas.
6. Diseño de un biofiltro conteniendo los microorganismos inmovilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.

La cepa utilizada en este estudio fue *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 (sin. *Pseudomonas putida* 195mn4).

El medio utilizado para el precultivo de la bacteria contenía (por litro): 12,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl, 1 g de NH_4Cl , 0,246 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0,147 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El pH del medio se ajustó a 7 y se esterilizó a 121°C durante 15 min. El medio esterilizado fue suplementado con 15mg/l de Tween 80 y naftaleno (0,1% w/v)(Fluka, pureza>99%).

En los estudios de degradación del naftaleno se utilizó agua de mar estéril, recogida en la costa de Bueu (Pontevedra), su pH era de 8.20 y la salinidad de 33 ppm. Cuando fue necesario se suplementó con una fuente de fósforo en forma de K_2HPO_4 en una relación C/P de 30:1, y de nitrógeno NH_4NO_3 en una relación C/N de 10:1 (Ahn et al., 1998) . Se añadió naftaleno a una concentración final de 25 mM o 10 mM.

El naftaleno se añadió a partir de un stock (80g/l) disuelto en hexano a los recipientes esterilizados (121 °C, 15 min).Una vez evaporado el disolvente, se añadió el medio de cultivo estéril y se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. Las muestras se incubaron en oscuridad para evitar la fotooxidación del naftaleno (McConkey et al.,2002).

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

El naftaleno fue extraído del medio de cultivo mediante la adición de un volumen de hexano (Panreac; PAI)(Aranha y Brown,1981), la mezcla se agitó mediante vórtex durante 5 minutos para conseguir que el naftaleno pasase a la fase orgánica. Se transfirió a un tubo Corex y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Beckman J2-MC con el fin de separar la fase acuosa de la fase orgánica, de la cual se extrajo 1 mL. La cuantificación del naftaleno se llevó a cabo mediante HPLC (model Waters).La columna utilizada fue una Rexchrom phenyl 5 μm , 100Å, (25 cmx4 x 4.6 mm); la fase móvil fue 73% acetonitrilo - 23 %agua a un flujo de 1mL/min (Regis Technologies, INC.)

El volumen de inyección fue de 10 μ l. La detección se realizó mediante un detector Photodiode array waters (longitud de onda 254 nm).

La recta patrón se construyó a partir de diferentes concentraciones de naftaleno disuelto en hexano (1, 5, 10, 15, 20, 25,30 mM) realizándose cada medición por triplicado.

3. MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN

La inmovilización se realizó mediante el método de Bettermann y Rehm , (1984) con modificaciones .

Las células de *P. stutzeri* 19SMN4 fueron obtenidas por centrifugación (10.000 g, 10 min) desde el medio de precultivo en fase estacionaria temprana (72h) y lavadas dos veces con una solución 0,9% de NaCl.

Se utilizaron tres tipos de alginato: Aldrich 180947 (viscosidad 31,40 cP); Sigma A0682 (viscosidad baja 240 cP) y A2033 (viscosidad media 3600 cP) .

El alginato (2% w/vol) fue disuelto en 0,9% NaCl durante toda la noche y esterilizado en autoclave (121°C,15min) .Se preparó una suspensión de 50 mL conteniendo 2 g de células (peso húmedo) en 48 mL de solución de alginato, que se resuspendió en 50 mL de solución de alginato mediante un agitador magnético hasta su completa homogenización.

La mezcla se extruyó a través de una aguja hipodérmica (0,9 x 25; 20G1) gota a gota sobre una solución fría y estéril de CaCl_2 (0,2M) (Sigma Aldrich) y NaCl 0,9% .Las esferas así formadas se mantuvieron en esta solución a temperatura ambiente y agitación suave durante una hora para conseguir el endurecimiento de las esferas. Finalmente las esferas se sometieron a varios lavados con una solución NaCl al 0,9% para eliminar el exceso de iones y las células no atrapadas en la matriz de alginato.

Las esferas formadas, de un tamaño aproximado de 1,6mm (fig.6), fueron almacenadas a 4°C en tubos de polipropileno conteniendo cada tubo 2 gramos de esferas.



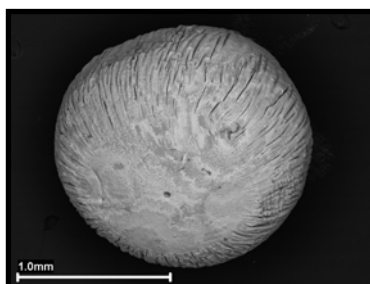


Fig.6. Micrografía electrónica de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 inmovilizada por atrapamiento en matriz de alginato.

También se realizaron esferas sin añadir inóculo bacteriano para ser utilizadas como blancos y determinar la pérdida abiótica de naftaleno.

4. CONDICIONES DE CULTIVO

El preinóculo se cultivó a una temperatura de 30 °C y 180 rpm.

Para los estudios de degradación se utilizaron botellas de 125 mL a las que se añadió agua del mar (suplementada con nitrógeno y fósforo cuando fue necesario) hasta un volumen final de 10 mL. El inóculo utilizado fue:

- Estudio con las células inmovilizadas: 2 g de células inmovilizadas; como control negativo se utilizaron esferas de alginato sin células.

- Estudio con las células libres: 1 mL de células libres; como control negativo se utilizó agua de mar sin inóculo.

Todas las muestras se suplementaron con naftaleno a una concentración final de 10mM o 25 mM de la manera indicada en el apartado “Cepas y medios de cultivo”.

Las muestras se incubaron a 30°C o 16 °C con agitación (150 rpm).

Las muestras fueron retiradas a diversos intervalos de tiempo y su contenido completo fue utilizado para determinar la degradación de naftaleno. Las muestras se almacenaron a -20 °C y fueron procesadas todas juntas e inmediatamente antes de ser analizadas mediante HPLC, para evitar así errores motivados por la evaporación del naftaleno durante su almacenamiento.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

5. VIABILIDAD CELULAR

Esferas de alginato conteniendo las células inmovilizadas fueron lavadas dos veces con una solución de NaCl al 0,9% y resuspendidas en una solución de citrato sódico (Panreac) al 1% y pH 6 (Serp et al., 2000). Se mantuvieron en un agitador vórtex hasta la completa disolución del alginato. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas en medio LB.

Las placas se incubaron a 30°C y el recuento de las colonias se realizó tras 48 horas de incubación.

RESULTADOS

1. RECTA PATRÓN

Para la determinación cuantitativa del naftaleno se elaboró una recta patrón a partir de soluciones de naftaleno en hexano a unas concentraciones de: 1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM y 30mM.

Tabla 3. Resultados HPLC.

Concentración naftaleno (mM)	Absorbancia
1	0,0164422
5	0,06403593
10	0,13363236
15	0,20165259
20	0,27165346
25	0,329859
30	0,39539895

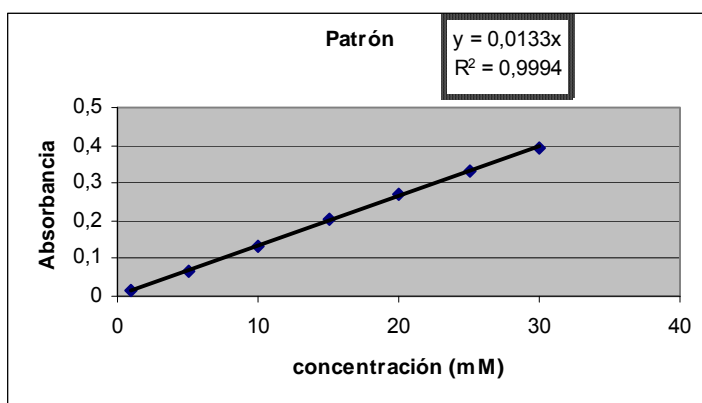


Fig.7. Recta Patrón

La ecuación de la recta a partir de la cual se han interpolado los datos de este trabajo fue:

$y = 0.0133 x$, siendo x la concentración de naftaleno expresada en milimoles e y la absorbancia obtenida al someter las muestras a HPLC .

2. EXTRACCIÓN DEL NAFTALENO DE LAS MUESTRAS

El hexano es un compuesto completamente inmiscible en agua, menos denso que esta, muy volátil y en el que se disuelve el naftaleno con facilidad. Mediante el método de extracción elegido el naftaleno existente en el medio de cultivo (fase acuosa), tras un periodo de agitación pasaba a la fase orgánica (hexano). Tras la centrifugación se forman dos fases perfectamente diferenciables: la fase inferior que contiene el medio de cultivo y las células (inmovilizadas o libres) y la fase superior con el naftaleno disuelto en el hexano.

Se comprobó la fiabilidad del método mediante su aplicación a muestras de agua de mar con una concentración conocida de naftaleno (26mM /10mM /1mM) a la que se le añadió para cada una de las concentraciones testadas 2 gramos de células inmovilizadas o 1ml de células libres.

Las muestras se analizaron inmediatamente después de haber sido preparadas, de manera que el naftaleno no pudiese comenzar a ser consumido por la bacteria.

En vista de los resultados (tabla 4) se puede afirmar que la pérdida de naftaleno durante el procesado de las muestras es despreciable a las concentraciones de trabajo y que el método de extracción es eficaz. Este método es válido tanto para las células inmovilizadas como libres.

Tabla. 4. Comprobación de la fiabilidad del método de extracción

	Media áreas	Concentración naftaleno (mM)
26mM inmov.	0,339207	25,504289
26mM libres	0,3355705	25,230866
10mM inmov.	0,1324567	9,9591519
10mM libres	0,1334516	10,033956
1mM inmov.	0,0117423	0,8828805
1mM inmov.	0,0095554	0,7184541

3. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE *PSEUDOMONAS STUTZERI* 19SMN4 INMOVILIZADAS.

Las células inmovilizadas se almacenaron a 4°C y -20°C, en tubos conteniendo 2 gramos de esferas. Se extrajeron muestras transcurridos 15 y 33 días y se realizó un análisis de la viabilidad celular de las esferas.

El recuento de UFC realizado a las esferas recién formadas y tras 15 y 33 días almacenadas a 4 y -20 °C se muestran en la tabla 5.

Se observa que las células inmovilizadas pueden permanecer al menos un mes almacenadas a 4°C sin que se produzca una pérdida de viabilidad considerable, mientras que su almacenamiento a una temperatura de -20°C no es recomendable. El mismo estudio fue llevado a cabo con los 3 tipos de alginato conduciendo a los mismos resultados.

Tabla 5 . Efecto del almacenamiento a 4°C y a -20°C sobre la viabilidad de las células inmovilizadas en alginato (viscosidad 31,4 cP)

Tiempo (días)	Viabilidad (UFC 2g ⁻¹)	Viabilidad (UFC 2g ⁻¹) -
	4°C	20°C
1	3,0 x 10 ⁹	
15	1,5 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁶
33	1,9 x 10 ⁹	4,8 x 10 ⁵

4. DEGRADACIÓN DE NAFTALENO EN AGUA DE MAR

Se investigó el efecto que diversos factores tienen sobre la degradación del naftaleno en agua de mar. Los resultados de la biodegradación mediante células libres e inmovilizadas en alginato son presentados como el ratio de la concentración residual y la inicial (C/C_0^{-1}) frente al tiempo.

Las esferas formadas con los tres tipos de alginato y sin inóculo bacteriano para evaluar la pérdida abiótica del naftaleno se utilizaron para realizar las correcciones de los resultados obtenidos y evitar así que las pérdidas de naftaleno debidas a la evaporación o a la adsorción a las esferas fuesen atribuidas a la degradación realizada por las bacterias.

4.1. Efecto del suplemento de nutrientes sobre la degradación del naftaleno

Para determinar si la disponibilidad de nitrógeno y fósforo limitaba el consumo de naftaleno se investigó la degradación de este hidrocarburo mediante células libres en agua de mar con y sin suplemento de nutrientes (fig.8, tabla 6).

Los resultados a una temperatura de 30°C muestran como una concentración inicial de naftaleno (25 mM) era prácticamente degradada (93%) dentro de los 6 primeros días de incubación en aquellas muestras en las que el agua de mar se había suplementado con nitrógeno y fósforo, mientras que en las que no lo fueron únicamente un 42% del naftaleno fue degradado transcurrido ese tiempo.

Cuando la temperatura fue de 16°C y con una concentración inicial de naftaleno 10 mM (condiciones más próximas a las existentes en el medio marino) se comprobó que la presencia de nutrientes también afectaba a la degradación aunque en menor medida.

Estos resultados demuestran la importancia de suplementar el agua de mar con nutrientes para obtener una mejor tasa de biodegradación. Por lo tanto todos los experimentos de biodegradación siguientes fueron desarrollados suplementando el agua de mar con fuentes de nitrógeno y fósforo.

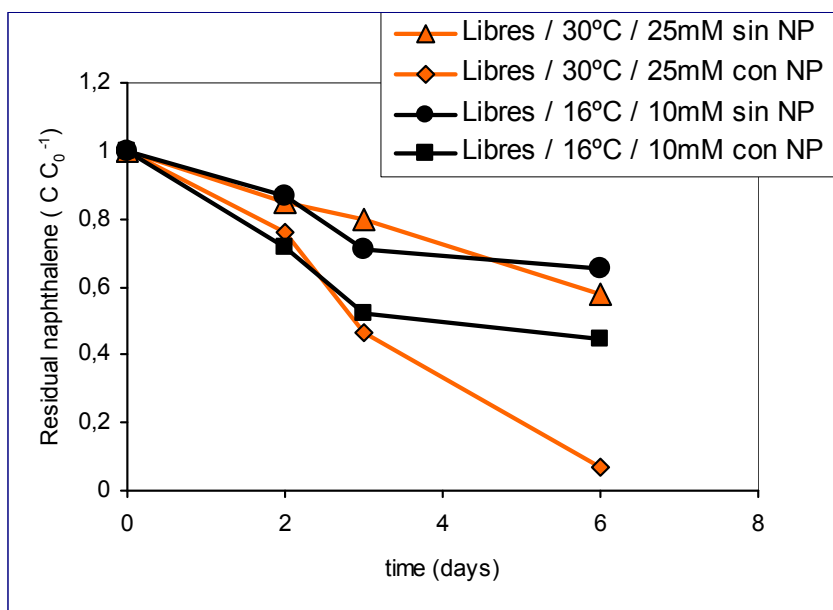


Fig.8. Degradación de naftaleno mediante células libres en agua de mar a 30°C y una concentración inicial 25 mM de naftaleno con (◆) y sin suplemento de nutrientes (▲), y a 16 °C y una concentración 10 mM de naftaleno con (■) y sin (●) suplemento de nutrientes.

Tabla 6. Valores absolutos de la degradación naftaleno correspondientes a la figura 8.

Células libres C ₀ =25mM T ^a =30°C Suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	25
2	19,02
3	11,59
6	1,65
Células libres C ₀ =10mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	9,60
2	6,85
3	5,01
6	4,30

Células libres C ₀ =25mM T ^a =30°C Sin suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	26,50
2	22,46
3	21,06
6	15,36
Células libres C ₀ =10mM T ^a =16°C Sin suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	9,60
2	8,29
3	6,84
6	6,25

4.2. Efecto de la temperatura sobre la degradación.

Se analizó la biodegradación de naftaleno a 30 y 16 °C para determinar la influencia de la temperatura en el proceso. Las temperaturas seleccionadas corresponden respectivamente a las condiciones óptimas de crecimiento de *Pseudomonas* y a la temperatura media del agua de mar registrada en las costas de Galicia.

Los resultados muestran que cuando la temperatura de incubación fue de 30°C tanto en el caso de células libres como inmovilizadas la degradación era prácticamente completa transcurridos 6 días, mientras que cuando la temperatura fue de 16°C únicamente el 22% era degradado en el caso de las células libres y el 33% en el caso de las células inmovilizadas (fig. 9, tabla7).

El hecho de que en las mismas condiciones las células inmovilizadas tengan una tasa de degradación mayor que las células libres puede ser motivado porque los límites difusionales establecidos por el alginato protegen a la bacteria de la inhibición por sustrato (Abou Seoud and Maachi, 2003).

Se observa como la degradación es mucho más lenta a 16°C que la realizada a una temperatura de 30°C. La disminución en la velocidad de degradación a 16 °C puede ser motivado por la solubilidad y por lo tanto biodisponibilidad del naftaleno y la tasa metabólica, la cual decrece cuando se incrementa la temperatura (Shiu and Mackay, 2006; Bossert and Bartha,1984).

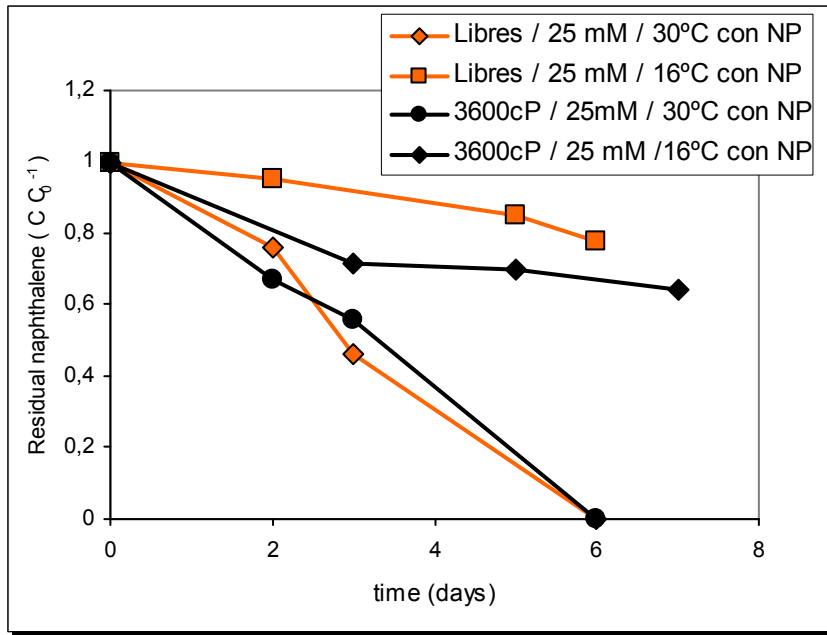


Fig.9. Degradación de una concentración inicial de naftaleno 25 mM mediante células libres (naranja) e inmobilizadas (negro) en agua de mar suplementada con nutrientes a una temperatura de 16 °C (■, ◆) y 30°C (◇, ●).

Tabla 7. Valores absolutos de la degradación de naftaleno correspondientes a la figura 9.

Células libres C ₀ =25mM T ^a =30°C Suplemento de N y P		Células libres C ₀ =25mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)	Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	25	0	26,50
2	19,02	2	25,28
3	11,59	5	22,60
6	1,65	6	20,55

Inmov. 3600 cP C ₀ =25mM T ^a =30°C Suplemento de N y P		Inmov. 3600 cP C ₀ =25mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)	Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	25	0	26,7
2	17,62	3	19,04
3	14,87	5	18,64
6	0	7	17,14

Tras 3 días de incubación podía observarse una coloración marrón en el medio de los cultivos incubados a 30°C, la cual podría ser debida a la acumulación de catecol, un producto intermedio de la degradación del naftaleno. Según un estudio realizado por Park et al. (2004) la aparición de un pigmento marrón es debida a una autooxidación no enzimática del catecol (producto intermediario del catabolismo del naftaleno) y compuestos relacionados con este.

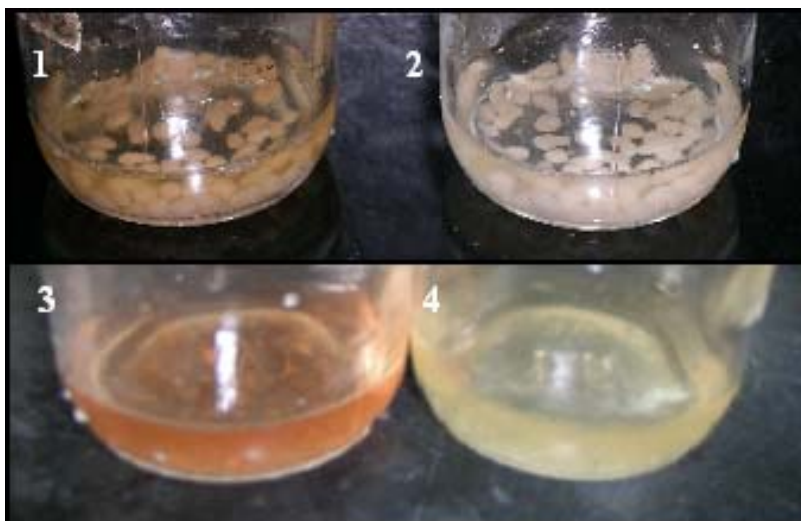


Fig. 10. Coloración del medio de cultivo tras tres días de incubación a diferentes temperaturas: 1- Células inmovilizadas en alginato cultivadas a 30°C; 2- células inmovilizadas en alginato cultivadas a 16°C; 3- células libres cultivadas a 30°C; 4- células libres cultivadas a 16°C.

4.3. Efecto de la concentración inicial de naftaleno.

Cuando se redujo la concentración de naftaleno en el medio desde 25mM a una concentración 10 mM se observó que aumentaba la velocidad de degradación tanto con las células libres como inmovilizadas cultivadas a 16°C. En el caso de las células libres (fig.11, tabla 8) tras 6 días de cultivo el 55% de una concentración 10 mM de naftaleno había sido degradada, mientras que cuando la concentración inicial fue de 25 mM únicamente se degradó el 22%. En el caso de las células inmovilizadas (fig.12, tabla 9) transcurridos 3 días y con una concentración inicial de 10 mM se había consumido el 60% del naftaleno con las células inmovilizadas en alginato de 240 cP y 3600 cP mientras que a una concentración de 25 mM únicamente había sido degradado el 18,5%, y el 28,7% respectivamente. Transcurridos 7 días estas diferencias

eran más notables entre ambas concentraciones iniciales (fig.12). El hecho de que la cantidad total de naftaleno degradado sea más baja con una concentración inicial de 25 mM posiblemente está relacionado con el efecto tóxico de este hidrocarburo. Como se muestra en las figuras 11 y 12, este efecto tóxico no es tan acusado en el caso de las células inmobilizadas puesto que transcurridos 6 días la tasa de degradación es del 33% con el alginato de 3600 cPy 25% con el alginato de 240 cP en relación al 22 % cuando se usan células libres.

La tasa degradativa era menor transcurridos los 3 primeros días de cultivo. Este hecho probablemente es debido a la acumulación de productos del metabolismo en el medio de cultivo. Tras 7 días de cultivo el pH del medio había descendido desde 7,25 (pH del agua de mar con suplemento de nitrógeno y fósforo) a 5,64; el pH óptimo para la actividad de la naftaleno dioxigenasa es 7,0 (Dorn et. al, 2003). Esta disminución de pH puede estar motivada porque se utilizó NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno para suplementar el medio, un estudio realizado por Aranha y Lewis (1981) sugiere que la utilización de esta fuente de nitrógeno puede llevar a una acumulación de ácido salicílico, producto intermediario del catabolismo del naftaleno y una reducción del pH en el medio.

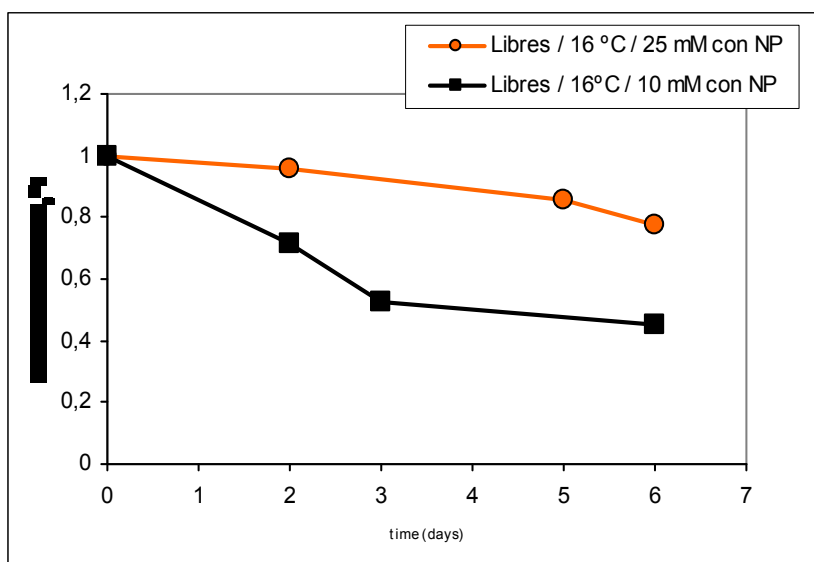


Fig.11. Degradación de una concentración inicial de naftaleno 25 mM (—●—) y 10 mM (—■—) mediante células libres en agua de mar suplementada con nitrógeno y fósforo.

Tabla 8. Valores absolutos de la degradación de naftaleno correspondientes a la figura 11.

Células libres C ₀ =10mM T ^a =16°C Suplemento de N y P		Células libres C ₀ =25mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)	Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	9,60	0	26,5
2	6,85	2	25,28
3	5,01	5	22,60
6	4,30	6	20,55

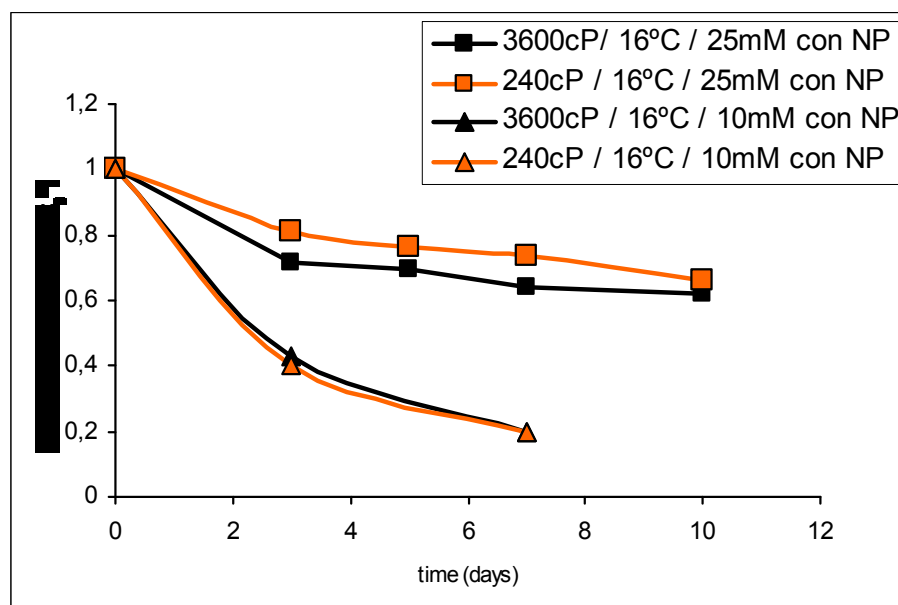


Fig.12. Degradación de una concentración inicial de naftaleno 25 mM (cuadrados) y 10 mM (triángulos) mediante células inmobilizadas en alginato de 3600 cP (■, ▲) y 240 cP (□, ▲) cultivadas en agua de mar suplementada con nitrógeno y fósforo.

Tabla 9. Valores absolutos de la degradación de naftaleno correspondientes a la figura 12.

Inmov. (3600 cP) C ₀ =10 mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Días	Concentración residual naftaleno (mM)
0	10
3	4,27
7	1,98

Inmov. (240 cP) C ₀ =10 mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Días	Concentración residual naftaleno (mM)
0	10
3	3,99
7	1,96

Inmov. (3600 cP) C ₀ =25mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	26,7
3	19,04
5	18,64
7	17,14
10	16,54

Inmov. (240 cP) C ₀ =25mM T ^a =16°C Suplemento de N y P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	25,7
3	20,94
5	19,64
7	18,84
10	17,04

4.4. Efecto de la viscosidad del alginato.

Se utilizó alginato de tres viscosidades diferentes para testar la viabilidad de las células inmovilizadas y la degradación de naftaleno como se describe en materiales y métodos.

La forma de las esferas era más regular en el caso de las formadas con alginato de 3600 cP, las esferas realizadas con alginato de viscosidad 31,4 cP eran mucho más irregulares. Tras siete días de cultivo parte de las esferas formadas con alginato de viscosidad 31,4 cP se habían fragmentado, mientras que aquellas formadas con alginato de mayor viscosidad (240 cP y 3600 cP) aparentemente no habían experimentado cambios en su estructura. Este hecho llevó a descartar las esferas formadas con alginato de 31,4 cP en los siguientes experimentos.

La concentración inicial de naftaleno utilizada para estos experimentos fue de 10 mM debido a que los resultados obtenidos previamente mostraban una menor toxicidad para las células a esta concentración y de hecho esta concentración se aproxima más a la que pueden existir en agua de mar contaminada en condiciones reales .

En la figura 12 se puede observar como la viscosidad del alginato no influye en la velocidad de degradación del naftaleno. Así, tras 7 días de cultivo las esferas realizadas con ambos tipos de alginato habían degradado aproximadamente la misma cantidad de naftaleno presente en el medio.

Para analizar la capacidad de retención celular de las esferas se analizó el número de células viables que contenían transcurridos 3 y 7 días, así como el número de células presentes en el medio (tabla 10). Transcurridos tres días se observaba una reducción en el número de células viables en las esferas. Esto responde probablemente a una pérdida inicial de células debido a la muerte celular o a la salida de las células desde las esferas al medio de cultivo.

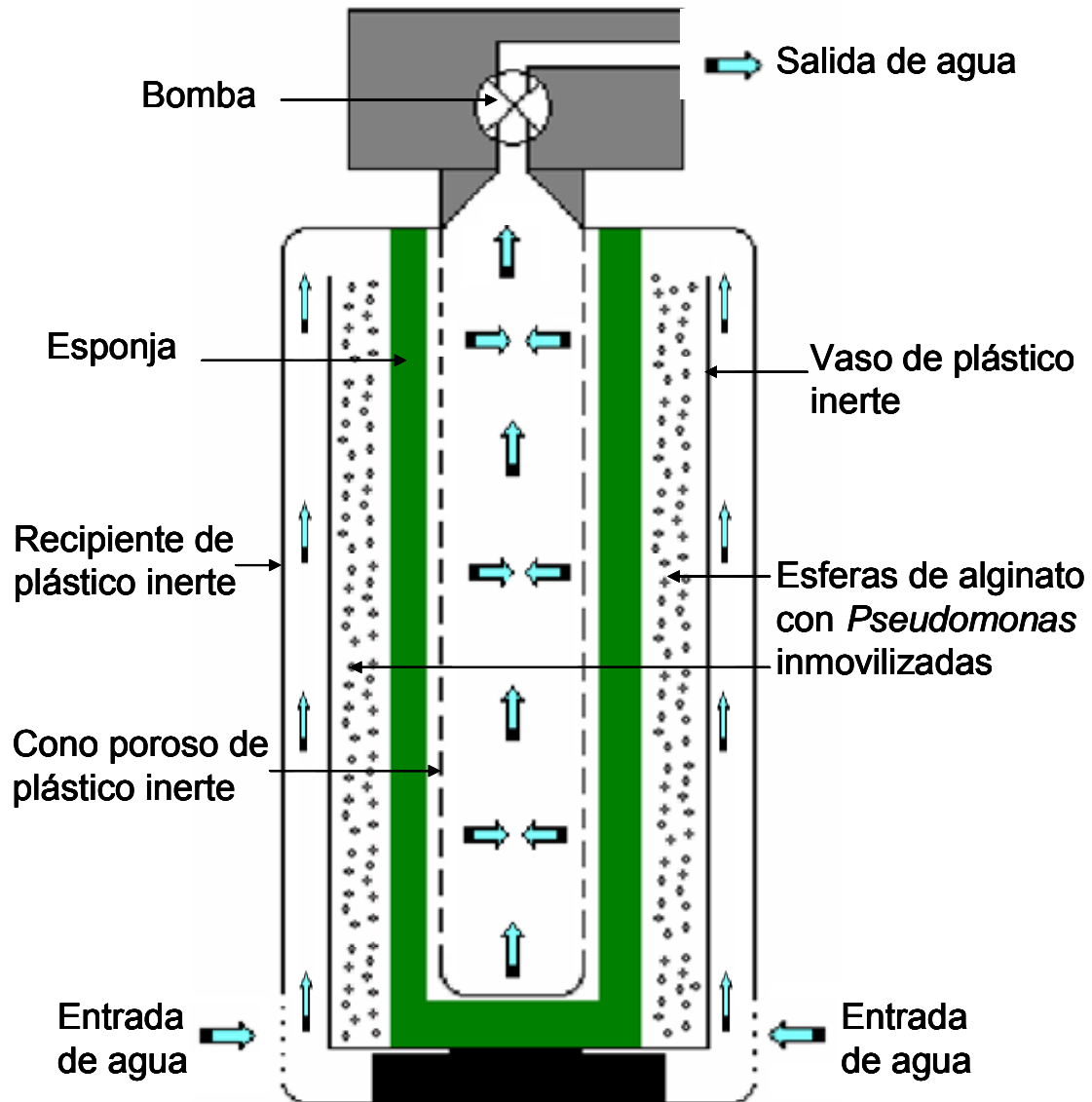
Tabla 10. Efecto de la viscosidad del alginato sobre la viabilidad de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 inmovilizada cultivada en agua de mar suplementada con nitrógeno y fósforo, a una concentración inicial de naftaleno de 25 mM y a una temperatura de 16°C transcurridos 3 y 7 días.

Inóculo	Viscosidad		Células viables	
			3 días	7 días
9,2 x 10 ⁸ UFC 2g ⁻¹	3600cP	esferas (UFC 2g ⁻¹)	4,6x10 ⁷	6,0 x 10 ⁷
		medio (UFC mL ⁻¹)	nd	8,0 x 10 ²
9,9 x 10 ⁸ UFC 2g ⁻¹	240cP	esferas (UFC 2g ⁻¹)	2,9 x10 ⁷	6,6 x 10 ⁷
		medio (UFC mL ⁻¹)	3,2 x10 ⁴	nd

nd – no determinado.

Tras siete días se observó un ligero incremento en el número de células viables en las esferas. Los resultados muestran que las esferas formadas con alginato de viscosidad elevada son más efectivas reteniendo las células, ya que el número de células viables presentes en el medio es menor que en aquellos cultivos con esferas de alginato de menor viscosidad.

5. ESQUEMA DEL BIOFILTRO CONTENIENDO LAS BACTERIAS INMOVILIZADAS



En la imagen podemos observar un esquema del biofiltro destinado a ser colocado en la entrada de agua de las piscifactorías, constaría de:

Entrada de agua en la cual habría una válvula de ajuste con la que se pueda graduar el caudal.

Las flechas indican la dirección del flujo de agua marina. El flujo debe ser constante y estable (independiente de las variaciones de presión de la red de agua salada), además el caudal de agua no deberá ser demasiado fuerte, para evitar que las esferas con las células inmobilizadas se depositen en el fondo del filtro.

El filtro tendría una carcasa cilíndrica con dos tubos concéntricos en su interior. La esponja situada entre las células inmovilizadas y cilindro interior estaría destinada a garantizar la retención de las posibles células que se pudiesen liberar desde las esferas de alginato.

La salida estaría situada en la parte superior para evitar el apilamiento de las células por gravedad. La entrada de agua baja y la salida alta aumentaría además la aireación del agua.

Una bomba regularía la salida del agua de manera que el tiempo de retención sea el suficiente para que se produzca la degradación completa del hidrocarburo.

CONCLUSIONES

1. La temperatura óptima de almacenamiento de las células inmovilizadas en alginato es de 4°C. En estas condiciones se conserva su viabilidad durante al menos un mes.
2. *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 degrada eficientemente naftaleno en agua de mar.
3. La metabolización del naftaleno es mayor cuando se añaden nutrientes al agua de mar.
4. La degradación es más lenta a 16°C que la realizada a una temperatura de 30°C.
5. La capacidad para degradar naftaleno se mantiene tras la inmovilización celular por atrapamiento en esferas de alginato bajo las diferentes condiciones ensayadas.
6. Las esferas formadas con alginato de viscosidad elevada son más efectivas reteniendo las células.
7. Cuando la temperatura de incubación es de 16°C (próxima a la que tendría el agua empleada en las piscifactorías) existe una degradación efectiva del naftaleno, sobre todo cuando la concentración de este no es demasiado elevada.

Estos estudios ponen de manifiesto el gran potencial de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 inmovilizada en alginato para el desarrollo de tecnologías para el tratamiento de aguas marinas *in situ* con concentraciones no muy elevadas de naftaleno.

BIBLIOGRAFÍA

Abou Seoud M. and Maachi R. (2003) Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas* sp. Z Naturforsch [C]. 58(9-10),726-31

Agencia Española de Seguridad Alimentaria (2003) Informe sobre repercusiones del vertido del “Prestige” en la seguridad alimentaria Colección Informes Técnicos. Ministerio de Sanidad y consumo.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1990). Toxicological Profile for Naphthalene and 2-Methylnaphthalene. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta,GA.

Ahn IS, Ghiorse WC, Lion LW and Shuler ML.(1998) Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. Biotechnol Bioeng. 59(5):587-94.

Albarghouthi M, Fara DA, Saleem M, El-Thaher T, Matalka K. and Badwan A, (2000) Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. Int J Pharm. 25;206(1-2):23-34.

Aranha HG. and Brown LR.(1981) Effect of Nitrogen Source on End Products of Degradation. Appl Environ Microbiol. 42(1), 74–78.

Atlas, R.M. (1981) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiol. Rev. 45, 180-209.

Bauer JE and Capone DG. (1985) Degradation and Mineralization of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Anthracene and Naphthalene in Intertidal Marine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 50(1),81-90.

Betteman, H. and Rehm, H.J. (1984) Degradation of phenols by polymer-entrapped microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 285-290.

Cassidy MB, Shaw KW, Lee H. and Trevors JT. (1997) Enhanced mineralization of pentachlorophenol by kappa-carrageenan-encapsulated *Pseudomonas* sp. UG30. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 108-113

Cerniglia C.E., and M.A. Heitkamp. (1989). Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in the Aquatic Environment. *In Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment, U. Varanasi (Editor)*. CRC Press, Boca Raton, FL. 41-68 pp

Colwell R.R. y Walker, R.D. (1977). Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 5, 423-445.

Diaz MP, Boyd KG, Grigson SJW and Burgess JG. (2002.) Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnol. Bioengineering.* 79,145-153.

Diaz MP, Grigson SJW, Peppiatt CJ and Burgess JG. (2000) Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading wuryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar. Biotechnol.* 2,522-532.

Dorn J.G., Frye R.J. and Maier R.M. (2003) Effect of temperature, pH, and initial cell number on luxCDABE and nah gene expression during naphthalene and salicylate catabolism in the bioreporter organism *Pseudomonas putida* RB1353. *Appl Environ Microbiol.* 69(4),2209-16.

Environmental Protection Agency (1986) Health and Environmental Effects Profile for Naphthalene. EPA/600/x-86/241. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH.

Fernández L. and Freire J. (2005). Relaciones entre la salud de los ecosistemas marinos y la seguridad alimentaria: La marea negra del Prestige como un caso de estudio. En, Javier Ferreras y Juan Freire (coordinadores). Seguridad Alimentaria (I): Pesca, Acuicultura y Marisqueo. Biblioteca Monográfica de la Fundación Instituto de Estudios Políticos y Sociales, A Coruña, pp. 91-128

Gardin H. and Pauss A. (2001) kappa-carrageenan/gelatin gel beads for the co-immobilization of aerobic and anaerobic microbial communities degrading 2,4,6-trichlorophenol under air-limited conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 517-523.

Grant GT, Morris ER, Rees DA, .Smith PJC and Thom D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg box model. FEBS Lett. 32,195-198.

Guerin WF and Boyd SA. (1995) Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and *Ancaligenes* sp. Under different culture conditions. Appl. Environ. Microbiol. 61(11):4061-8.

Habe H. and Omori T. (2003) Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism. in Diverse Aerobic Bacteria Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 (2), 225–243,. Review.

Head I.M. and Swannell R.P. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in **marine** habitats. Curr. Opin. Biotechnol. 10(3),234-9

Iniesta, R. and Blanco, J. (2005) Bioacumulación de hidrocarburos y metales asociados a vertidos accidentales en especies de interés comercial de Galicia. Revista Galega dos Recursos Mariños (Monog.): 2, 200pp.

Kargi F and Dincer AR. (2000) Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch. Water. Environ. Res. 72, 170-174.

Leahy J.G. and Colwell R.R. (1990)Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.*54(3),305-15

Manohar S. , Kim C.K. and Karegoudar T.B..(2001) Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55(3):311-6

Manohar S. and Karegoudar T.B. (1998) Degradation of naphthalene by a *Pseudomonas* strain NGK1.*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49,785-792.

McConkey B. J, Hewitt L. M. , Dixon D. G. and Greenberg B. M. (2002) Natural Sunlight Induced Photooxidation of Naphthalene in Aqueous Solution.*Water, Air, & Soil Pollution.*136 (1-4), 347-359.

Park W. , Jeon CO, Cadillo H, DeRito C. and Madsen' E. L. (2004) Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 429-435.

Preuss R. , Angerer J. and Drexler H. (2003) Naphthalene—an environmental and occupational toxicant. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 76(8),556-76.

Quek E, Ting Y.P. and HM.(2006) Rhodococcus sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresour. Technol.*97(1):32-8.

Rahman R.N., Ghaza F.M., Salleh A.B. and Basri M. (2006) Biodegradation of Hydrocarbon Contamination by Immobilized Bacterial Cells. *J. Microbiol.*44 (3),354-359

Roubal, W.T., Stranahan, S.I. and Malins, D.C. (1978) The acumulation of low molecular weight aromatic hydrocarbons of crude oil by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 7 (2): 237-244.

Serp D., Cantana E., Heinzen C., Von Stockar U. And Marison I.W. (2000) Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol Bioeng.* 5;70(1):41-53

Sharanagouda U. and Karegoudar TB. (2001) Degradation of 2-methylnaphthalene by *Pseudomonas* sp. strain NGK1. *Curr. Microbiol.* 43(6),440-3.

Shiu W.Y. and Mackay D (2006). Solubility System : Naphthalene with Sodium chloride and Water. IUPAC-NIST Solubility Database , Version 1.0. Disponible desde Internet en: <http://srdata.nist.gov/solubility/index.asp>

Siron, R., Pelletier, E. and Brochu C. (1995) Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Arch Environ Contam Toxicol* 28: 406-416.

Sepic E., Bricelj M. and Leskovsek H. (1997) Biodegradation studies of polyaromatic hydrocarbons in aqueous media., *J.of Appl. Microbiol.* 83, 561-568.

Van Deuren, J.; Wang, Z. y Ledbetter, J. (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

Weir SC, Dupuis SP, Providenti MA, Lee H. and Trevors JT. (1995) Nutrient-enhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp. UG14Lr cells in creosote-contaminated soil slurries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 946-951.

White G.F. and Thomas O.R. (1990) Immobilization of the surfactant-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B in polyacrylamide gel beads: I. Effect of immobilization on the primary and ultimate biodegradation of SDS, and

redistribution of bacteria within beads during use. *Enzyme. Microb. Technol.* 12, 697-705.

Yen K.M. and Serdar C.M. (1988). Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. *Crit. Rev. Microbiol.* 15(3),247-68

ZoBell, C.E. (1946) Actions of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol .Rev.* 10, 1-49.