

Eliminación de naftaleno
en augas mariñas contaminadas
por vertidos de petróleo
mediante inmovilización
de bacterias degradadoras

Memoria final

Departamento de Microbioloxía

Facultade de Farmacia da USC

Profesor Tomás González Villa.

INTRODUCCIÓN

1. ACCIDENTES MARÍTIMOS	3
2. HIDROCARBUROS DO PETRÓLEO	
3. TOXICIDADE DOS HIDROCARBUROS PARA OS ORGANISMOS	6
4. BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	8
5. FACTORES QUE AFECTAN Á BIODEGRADACIÓN DOS HIDROCARBUROS	11
5.1. Nutrientes	11
5.2. Variables ambientais	12
5.2.1. Osíxeno	12
5.2.2. Salinidade	13
5.2.3. Temperatura	13
5.2.4. pH	14
5.2.5. Concentración de substancias contaminantes	14
6. INMOBILIZACIÓN	15
6.1. Alxinato	16

OBXECTIVOS	20
-------------------	-----------

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CEPAS E MEDIOS DE CULTIVO	21
2. MÉTODOS ANALÍTICOS	21
3. MÉTODO DE INMOBILIZACIÓN	22
4. CONDICIÓNNS DE CULTIVO	23
5. VIABILIDADE CELULAR	24

RESULTADOS E DISCUSIÓN

1. RECTA PATRÓN	25
2. EXTRACCIÓN DO NAFTALENO DAS MOSTRAS	25
3. EFECTO DO ALMACENAMIENTO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE <i>PSEUDOMONAS STUTZERI</i> 19SMN4 INMOBILIZADAS.	26
4. DEGRADACIÓN DE NAFTALENO EN AUGA DE MAR.	27
4.1. Efecto do suplemento de nutrientes sobre a degradación do naftaleno.	27
4.2. Efecto da temperatura sobre a degradación.	29
4.3. Efecto da concentración inicial de naftaleno.	32
4.4. Efecto da viscosidade do alxinato.	35
5. ESQUEMA DO BIOFILTRO CONTENDO AS BACTERIAS INMOBILIZADAS	37

CONCLUSIÓNS	39
--------------------	-----------

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

INTRODUCCIÓN

1. ACCIDENTES MARÍTIMOS

Na actualidade, un dos problemas ambientais máis preocupantes son as verteduras de petróleo no mar coa conseguinte contaminación da costa. Estes prodúcense como consecuencia dunha combinación de diferentes accións e circunstancias. En primeiro lugar están as operacións que, de forma cotiá, levan a cabo nos buques, tales como as operacións de carga, descarga e almacenamento do fuel. Non entanto, o maior impacto ocorre cando se producen accidentes: fallos no casco, encallado dos buques, incendios ou colisións. Nestes casos, os derrames aumentan dramaticamente ata centos de miles de toneladas, producíndose as mareas negras e os desastres ecolóxicos, culturais e económicos tanto no mar como nas zonas costeiras que quedan arrasadas Exxon Valdez (1989), Nakhodka (1997), Prestige (2002).

A recente marea negra provocada polo accidente do buque Prestige puxo de manifesto as limitacións coas que contamos a nivel español e europeo para dar resposta rápida e eficaz a situacións de potencial crise alimentaria. Pero ao mesmo tempo, e a pesar da confrontación social e política que esta catástrofe supuxo, pode representar unha oportunidade de aprendizaxe da que se deberían derivar unha serie de ferramentas que permitan afrontar futuras crises en mellores condicións (Fernández L. e Freire J.,2005).

2. HIDROCARBUROS DO PETRÓLEO

O petróleo está composto por unha mestura de hidrocarburos que poden agruparse en catro clases: saturados, aromáticos, asfaltenos e resinas (Colwell e Walker, 1977).

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

Táboa 1. Características dos compoñentes dos derivados do petróleo (Iniesta e Blanco, 2005)

A disolución é a transferencia de compostos hidrosolubles do fuel ao auga e empeza a ocorrer inmediatamente logo de producirse a vertedura. A súa importancia reside en que é o mecanismo polo que se transfire a toxicidade do fuel ao auga, pois fai biodispoñibles os compostos máis tóxicos e hidrosolubles do petróleo, os hidrocarburos aromáticos, en especial os de baixo peso molecular (benceno, tolueno, naftaleno e fenantreno) para os organismos mariños (Iniesta e Branco, 2005).

Os hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) están formados por, polo menos, dous aneis aromáticos de benceno (fig.1). A súa solubilidad en auga é moi reducida e diminúe co aumento do peso molecular e número de substitucións. A súa volatilidade é tamén moi baixa. Son os hidrocarburos máis tóxicos do petróleo e teñen unha elevada persistencia e gran afinidade polos tecidos graxos, o que favorece o seu bioacumulación.

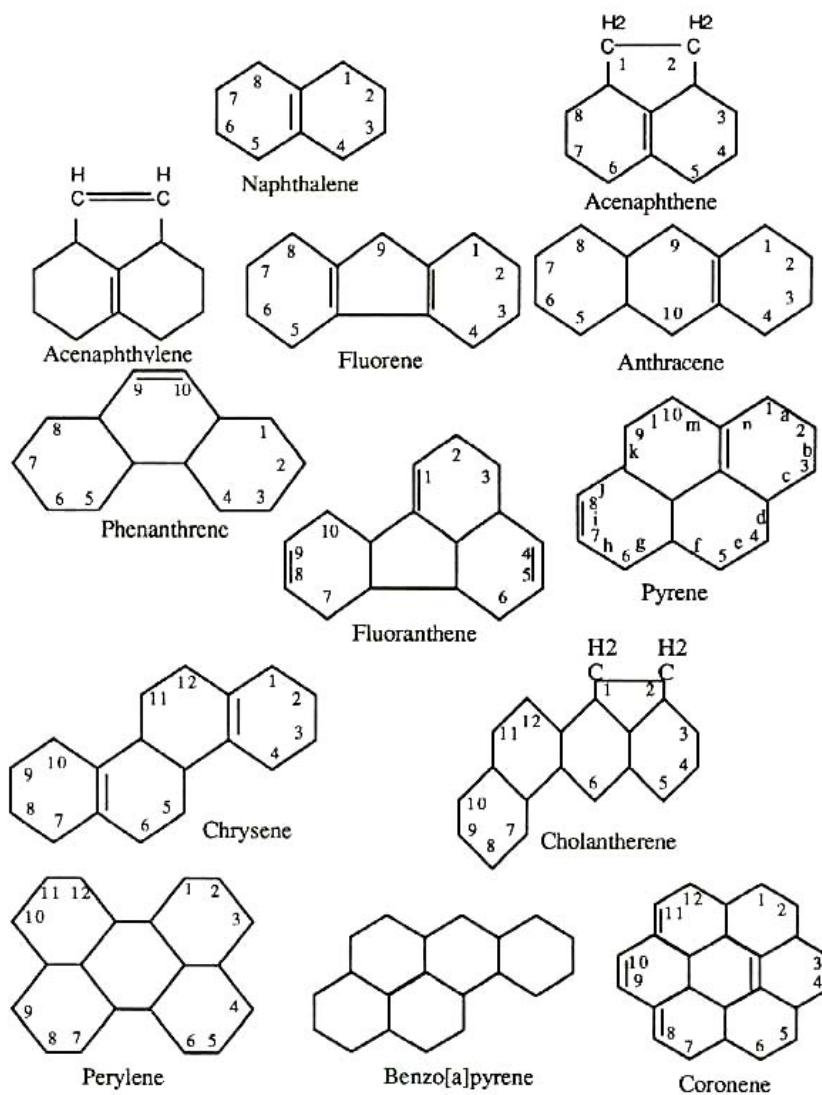


Fig.1. Estrutura química dalgúns hidrocarburos aromáticos policíclicos.

O naftaleno é o hidrocarburo aromático policíclico de menor tamaño e maior solubilidad. Trátase dun hidrocarburo aromático de baixo peso molecular con dous aneis bencénicos. É moderadamente volátil cun punto de ebulición de 218 °C e unha solubilidad en auga de 31,7 mg/L a 25°C. (Preuss et ao., 2003).

O naftaleno e os seus derivados metilados (metilnaftalenos) adoitan ser os HAPs dominantes na maioría dos fueles e crus, e tamén os que antes se

perden por disolución. As probas de solubilidade realizadas co fuel do Prestige amosaron que, tras expor o fuel durante 5 días ao auga de mar, o composto disolto máis abundante foi o naftaleno (Iniеста e Branco, 2005) (Táboa 2)

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

Táboa 2. Concentración de hidrocarburos en auga de mar tras 5 días de contacto co fuel do Prestige

3. TOXICIDADE DOS HIDROCARBUROS PARA OS ORGANISMOS

A Axencia Internacional de Investigación sobre o Cancro (IARC, Lyon) clasifica os fueles pesados como compostos de potencial canceríxeno 2B. Iso quere dicir que se dispón de evidencia suficiente da súa actividade carcinóxénica a partir de estudos con animais de experimentación pero que as probas sobre a actividade carcinóxénica en humanos son insuficientes (Axencia Española de Seguridade Alimentaria, 2003).

En xeral, dito potencial canceríxeno atribúese aos hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes nas fraccións de petróleo. Entre eles destacan os 16 compostos incluídos na lista de contaminantes prioritarios da Axencia de Protección Ambiental 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 e indeno[1,2,3-cd]pireno. (EPA, 1986).

Dende o ano 2000, no que a US National Toxicology Program atopou claras evidencias da actividade carcinóxénica do naftaleno en ratas, as axencias internacionais: International Agency for Research on Cancer (IARC), a US Environmental Protection Agency (US EPA), e a Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) reclasificaron o naftaleno como un posible carcinóxénico humano (Preuss et al., 2003).

Demostrouse que a exposición sistemática ao naftaleno e os seus derivados causa enfermidades e perturbacións no metabolismo humano (Agency for Toxic Substances and Disease Registry , 1990)

A exposición ao naftaleno relacionouse coa anemia hemolítica en persoas con deficiencia en glicosa-6- fosfato deshidroxenasa e en nenos recentemente nados (Manohar e Karegoudar ,1998) e inhibe o consumo de osíxeno en varios organismos. Estudos experimentais en animais demostraron que os HAPs poden presentar outros efectos (hematolóxicos, inmunolóxicos ou sobre a reprodución). Con todo, estes efectos aparecen en doses moi superiores ás que poden atoparse nos alimentos.

O risco para o consumidor prodúcese pola integración dos HAPs na cadea alimentaria. A inmensa maioría de sustancias carcinoxénicas non ilustran casos de toxicidade aguda no medio alimentario. Neste caso, o perigo esencial é a toxicidade crónica, é dicir o consumo habitual de produtos contaminados, que pode producir efectos sobre a saúde a longo prazo (Axencia Española de Seguridade Alimentaria, 2003; Fernández e Freire, 2005).

Demostrouse que o naftaleno e 2-metilnaftaleno concéntranse en organismos mariños, tanto en vertebrados como en invertebrados (Sharanagouda e Karegoudar, 2001).

Os peixes incorporan da auga os hidrocarburos máis solubles, como os compostos monoaromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno e xileno), os alcanos de cadea curta e os HAPs de baixo peso molecular como o naftaleno (Roubal et ao., 1978)

Ao problema do consumo polo home destes produtos contaminados con hidrocarburos súmanse os diferentes problemas fisiolóxicos e bioquímicos nos organismos mariños afectados, que van ter consecuencias sobre a súa viabilidade e éxito reprodutivo, e poden provocar alteracións xenéticas.

4. BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

O termo biorremediación utilízase para describir unha variedade de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, fungos, bacterias, etc.) para degradar ou transformar compostos orgánicos tóxicos en produtos metabólicos inocuos ou menos tóxicos. Esta estratexia biolóxica depende das actividades catabólicas dos organismos, e por conseguinte da utilización dos contaminantes como fonte de alimento e enerxía. Para que isto ocorra, é necesario favorecer as condicións para o crecemento e a biodegradación (Van Deuren et ao., 1997).

O uso de tecnoloxías de biorremediación para o tratamento de sitios contaminados é unha opción que presenta vantaxes con respecto a métodos físicos e químicos: (i) son efectivas e ambientalmente seguras; (ii) os contaminantes destrúense ou transfórmanse;(iii) pódense aplicar in situ (iv) xeralmente non se requiren tratamentos adicionais; (v) adoitan presentar vantaxes económicas. En contrapartida adoita tratarse de procesos lentos, que involucran moitas etapas e que se realizan baixo condicións ambientais complexas e non modificables.

Desde os estudos pioneiros de ZoBell (1946) en ambientes mariños, illáronse numerosas cepas bacterianas de ambientes litorais e oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos.

En ambientes acuáticos, os principais xéneros de bacterias e fungos con esta capacidade son, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. (Atlas, 1981)

Non todos os hidrocarburos degrádanse coa mesma facilidade. En xeral as taxas de biodegradación diminúen co aumento do peso molecular e complexidade dos hidrocarburos. As taxas de biodegradación dos hidrocarburos aromáticos son inversamente proporcionais ao número de aneis e de substitucións. (Leahy e Colwell, 1990; Atlas ,1981)

A degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de 2 e 3 aneis aromáticos (naftaleno, fluoreno e fenantreno) cun consorcio de microorganismos ou mediante cepas puras foi obxecto de numerosas publicacións (Sepic et ao., 1997). Illáronse un gran numero de especies de *Pseudomonas* con capacidade de utilizar hidrocarburos do petróleo (Atlas, 1981).

A capacidade para degradar naftaleno por parte de microorganismos pertencentes á especie *Pseudomonas putida* foi previamente descrita (Park et ao. 2004;Dorn et ao. , 2003;Ahn et ao., 1998 ;Guerin e Boyd ,1995)

Nas últimas dúas décadas estudouse cumpridamente a ruta biodegradativa deste composto en bacterias pertencentes a este xénero. Nestes organismos, os xenes degradativos (a miúdo denominados xenes nah) atópanse localizados en dous operóns: a vía degradativa superior codifica para a conversión de naftaleno a salicilato, e a vía degradativa inferior codifica para a transformación de salicilato a metabolitos centrais vía catecol (fig.2)(Yen and Serdar, 1988).

Xeralmente a información xenética par a degradación de hidrocarburos nas especies de pseudomonas atópase en plásmidos (Habe and Omori, 2003)

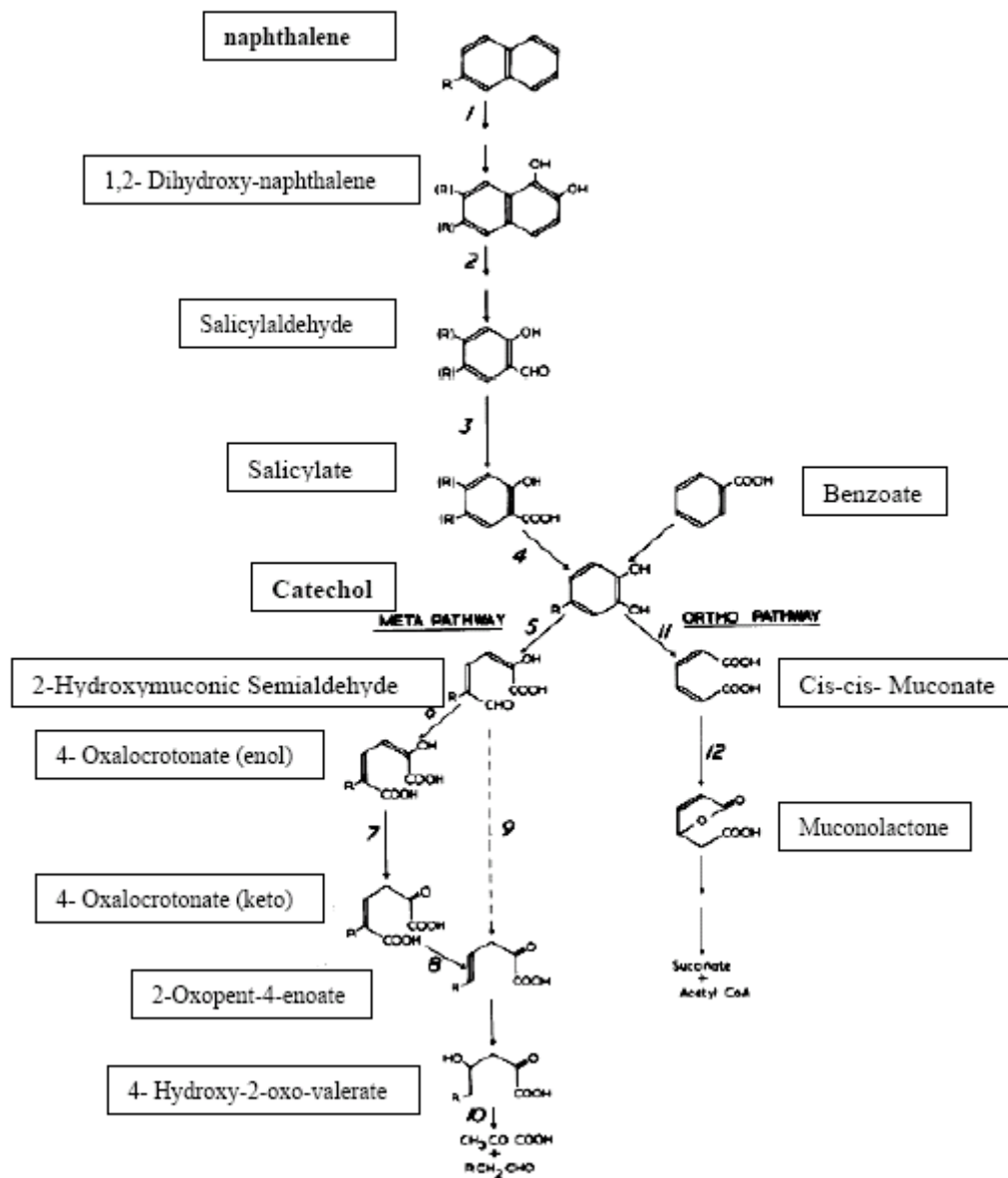


Fig.2 Metabolismo de compostos aromáticos por *Pseudomonas P_G*. Para o naftaleno, R = H; para o 2- metilnaftaleno, R= CH₃ .R entre paréntese representa posibles alternativas equivalentes. Os números corresponden ás encimas: **1**, naphthalene oxygenase; **2**, 1,2-dihydroxynaphthalene oxygenase; **3**, salicylaldehyde dehydrogenase; **4**, salicylate hydroxylase; **5**, catechol 2,3- oxygenase; **6**, 2-hydroxymuconic semialdehyde 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 e Heitkamp (1989) suxeriron os seguintes principios aplicados á degradación dos HAPs:

- 1) Unha gran variedade de bacterias, fungos e algas teñen a habilidade de degradalos.
- 2) A hidroxilación dos HAPs implica a incorporación de osíxeno molecular.
- 3) Os microorganismos procariotas metabolizan os HAPs cun ataque inicial dunha diosixenasa para dar cis,dihidrodiol que ademais é oxidado para formar dihidróxidos.
- 4) HAPs con máis de tres aneis de benzeno non serven como substrato para o crecemento bacteriano o que fai que este deba estar suxeito a unha transformación co-metabólica.
- 5) Moitos dos xenes son codificados por plásmidos.
- 6) HAPs de baixos pesos moleculares como o naftaleno son degradados rapidamente mentres que aqueles de alto peso como o antraceno ou o benzopireno son máis resistentes á degradación.
- 7) A biodegradación ocorre con maior eficiencia na interfase sedimento/auga.
- 8) A adaptación microbiana pode ocorrer por continuas exposicións aos HAPs.

5. FACTORES QUE AFECTAN Á BIODEGRADACIÓN DOS HIDROCARBUROS

5.1. Nutrientes

Os microorganismos dependen de diversos nutrientes para a súa supervivencia. A pesar de que os requirimentos son diferentes en función do tipo de microorganismo de que se trate, todos necesitan nitróxeno, fósforo e carbono. Na descomposición do fuel, a fonte de carbono non representa ningunha limitación xa que provén das propias moléculas orgánicas.

Existe certa confusión e conflito cando se analiza a limitación da biodegradación de petróleo debido á dispoñibilidade de nitróxeno e fósforo en auga de mar. Mentres que un grande número de investigadores afirmaron que se trata de nutrientes limitantes (Ahn et ao., 1998; Head and Swannell ,1999); aínda que con distintas conclusións a preto da proporción C/N, C/P necesaria, outros chegaron á conclusión oposta, debido a que cando se consideran

hidrocarburos solubles a solubilidade destes é tan baixa que imposibilita que se dea un cociente C/N ou C/P desfavorable (Atlas, 1981)

Segundo Ahn et ao. (1998), o naftaleno podería ser tóxico para *Pseudomonas putida* cando non existe unha fonte de nitróxeno e/ou osíxeno. Estes dous elementos son claves na biodegradación do naftaleno e probablemente doutros HAPs, non soamente para o mantemento do metabolismo que conduce á degradación, senón para a supresión da toxicidade que podería ocorrer se o naftaleno non é metabolizado e acumulácese ata niveis tóxicos.

A fonte de nitróxeno podería influír nos produtos finais ou intermediarios do metabolismo do naftaleno. Diferentes fontes de nitróxeno durante a oxidación do naftaleno poden dar lugar a diferenzas na morfoloxía celular, acumulación de ácido salicílico, evolución de CO₂ e produción dunha cor amarela no medio (Aranha and Brown, 1981)

5.2. Variables ambientais.

Ademais destes factores nutricionais existen varias variables ambientais que inflúen na degradación dos contaminantes orgánicos, tanto en sistemas terrestres como acuáticos. Estas variables inclúen a temperatura, pH, salinidade e, en particular a dispoñibilidade de osíxeno (Bauer and Capone, 1985). A continuación coméntanse algunhas das condicións ambientais que poden afectar ao crecemento e, xa que logo, á efectividade do proceso de biodegradación dos hidrocarburos:

5.2.1. Osíxeno.

Os pasos iniciais do catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos e aromáticos por parte de bacterias implican a oxidación do substrato mediante osixenasas, as cales requiren osíxeno molecular. Normalmente non existen condicións limitantes na superficie da columna de auga ou nas capas superficiais dos ecosistemas bentónicos mariños.

Tradicionalmente, considerouse que a biodegradación anaeróbica de hidrocarburos ten lugar a taxas despreziables, e que, polo tanto, a importancia ecolóxica é limitada. Non entanto, posteriores investigacións puxeron de manifesto a transcendencia das rutas catabólicas anaeróbicas na biorremediación. (Leahy and Colwell, 1990)

No caso concreto da degradación do naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 demostrouse que a carencia de osíxeno provocaba a morte da mesma na presenza de naftaleno. (Ahn et ao., 1998)

5.2.2. Salinidade

Cando a concentración de sal nas zonas afectadas por unha vertedura son elevadas, a eliminación de contaminantes con métodos de biorremediación convencionais resulta difícil. Concentracións de sal elevadas provocan alteracións nas membranas das células, poden desnaturalizar as encimas implicadas no proceso ou provocar a desecación osmótica das células provocándolles a súa morte (Kargi and Dincer, 2000). O número de estudos que analiza o efecto da salinidade na degradación microbiolóxica de fueles é escaso, aínda que o seu efecto prexudicial sobre a actividade microbiana si foi descrito (Diaz et ao., 2000). Non entanto, obtivéronse diversos microorganismos capaces de vivir e manter as taxas de biodegradación en condicións de salinidade elevadas (Diaz et ao., 2000).

5.2.3. Temperatura

A temperatura é un parámetro fundamental a considerar na biorremediación in situ, xa que tanto a biodisponibilidade como a solubilidade dos compostos máis hidrofóbicos dependen deste parámetro. Un incremento de temperatura provoca un descenso da viscosidade e, xa que logo, afecta ao grao de dispersión e ao aumento das taxas de difusión dos compostos orgánicos.

Temperaturas altas incrementan a metabolización dos hidrocarburos normalmente ata unha máxima ao redor dos 30 - 40°C, por encima da cal a toxicidade dos hidrocarburos aumenta para a membrana celular. (Leahy and Colwell, 1990)

En comparación cos ecosistemas mesofílicos, hai poucos exemplos de biorremediación de lugares contaminados sometidos a baixas temperaturas. Caracterizáronse diversos microorganismos adaptados ás baixas temperaturas, capaces de degradar hidrocarburos. O limiar para unha degradación significativa é de 0°C (Siron et ao., 1995). Do mesmo xeito, a temperaturas elevadas, por exemplo nas zonas litorais de rexións semiáridas, tamén se atoparon microorganismos termófilos, que posúen un determinado potencial para a conversión de hidrocarburos.

En xeral a taxa de degradación decrece cando baixa a temperatura, o cal se cre que está relacionado coa diminución da actividade encimática como consecuencia do efecto "Q10". (Leahy and Colwell, 1990). Ademais a solubilidade do osíxeno depende da temperatura e este, como xa se comentou, é un factor fundamental na biodegradación aeróbica.

5.2.4. pH.

Afecta á solubilidade de moitos compostos e, por tanto, á disponibilidad de produtos que poden afectar á actividade biolóxica.

O pH óptimo para a actividade do sistema enzimático naftaleno diosixenasa(fig.2), que cataliza o primeiro paso da ruta catabólica do naftaleno é 7. Segundo Dorn et al. 2003 o catabolismo do naftaleno está influenciado polo pH.

5.2.5. Concentración de substancias contaminantes

Naqueles casos nos que a concentración de hidrocarburos é demasiado elevada se produce unha redución na cantidade de osíxeno e nutrientes dispoñibles. Isto crea unha situación de tensión para os microorganismos que pode reducir a súa capacidade para degradar o fuel.

6. INMOBILIZACIÓN

Unha aproximación efectiva para atopar unha solución práctica á contaminación é concentrar os biodegradadores inmovilizándoos por medio de soportes naturais ou sintéticos con alta porosidade que permitan o seu uso en diferentes tipos de reactor, ou biofiltros a través dos cales fágase pasar a auga contaminada.

A inmovilización de macromoléculas, células e encimas foi extensivamente estudada durante os últimos vinte anos debido ao seu gran potencial nun amplo rango de campos, incluídos o farmacéutico, alimentación, agroquímica, medio ambiente, almacenamento celular, catálise de reaccións químicas e outros. A pesar diso existen moi poucas publicacións da súa aplicación directa en biorremediación de áreas contaminadas (Rahman et al., 2006)

A biodegradación de compostos orgánicos como o fenol, ácido dicloroacético, piridina ou acetofenona viuse moi favorecida pola inmovilización dos microorganismos en fibras ou micropartículas elaboradas con distintos polímeros naturais e/ou sintéticos. Os polímeros protexen aos microorganismos da toxicidade do xenobiótico e/ou melloran as velocidades de degradación (Cassidy et al., 1997; Manohar e Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; Gardin e Pauss, 2001)

A biorremediación de compostos tóxicos usando a tecnoloxía de inmovilización de microorganismos foi estudada empregando diferentes transportadores que inclúen poliacrilamida (Manohar e Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; White e Thomas, 1990), alxinato (Manohar e Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; Weir et al., 1995), ou κ -carragenina (Cassidy et al., 1997; Manohar e Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; Gardin e Pauss, 2001)

As principais vantaxes da inmovilización son: (i) estabilidade, (ii) elevada densidade celular, (iii) elevadas taxas de conversión, (iv) limitación da inhibición por substrato e toxicidade debido a límites difusionais (Abou Seoud e Maachi, 2003) e (v) uso en reactores continuos (Manohar e Karegoudar, 2001).

A inmovilización das bacterias aumenta significativamente a biodegradación de cru en comparación con células libres nun amplo rango de salinidade (Diaz et ao., 2002)

A degradación de naftaleno por células de *Pseudomonas spp* inmovilizadas en alxinato, agar e poliacrilamida xa foi estudada, demostrándose a efectividade desta fronte ao uso de células libres. Isto podería ser debido a un tipo de estabilización de membrana, que protexería as células mellorando as taxas de degradación nas células inmovilizadas.

6.1. Alxinato.

Os alxinatos son as sales do ácido alxínico, polisacárido natural, non tóxico, que se obtén dalgunhas “algas marróns” como *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria hyperborea*.

Está composto de dúas unidades monoméricas, o ácido- β -D-manurónico (M) e o α -L-gulurónico (G). O contido relativo de cada un destes bloques depende do tipo de alga, do seu grao de desenvolvemento e en menor medida, das condicións do seu crecemento. A presenza maioritaria dun ou outro monómero repercute ostensiblemente nas propiedades fisicoquímicas, mecánicas e de xelificación dos alxinatos (Será et al. ,2000). Este feito, unido á gran variedade de alxinatos existentes, suscitou un debate acerca da composición máis axeitada para a elaboración das cápsulas.

Estes monómeros únense como bloques formando unha cadea. A cadea polimeriza que constitúe o ácido alxínico e os seus sales componse de tres tipos de rexións ou bloques. Os bloques G conteñen só unidades derivadas do ácido L-gulurónico, os M baséanse enteiramente en acedo D-manurónico e as rexións MG, que consisten en unidades alternadas de ambos os ácidos (fig.3).

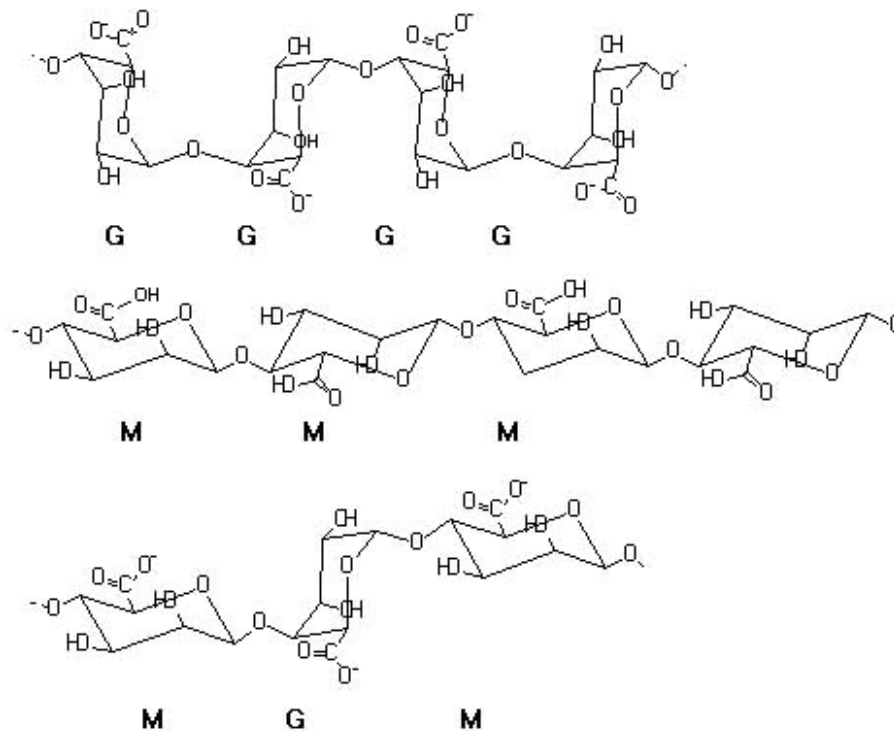


Fig.3. Bloques G (ácido L-gulurónico); bloques M (ácido D-manurónico) e rexións MG.

Cando dúas cadeas de bloques G alíñanse lado a lado resulta un oco en forma de diamante, o cal ten a dimensión ideal para acomodar no seu interior un ión calcio, formándose unha estrutura dimérica.

O alxinato forma xeles insolubles como consecuencia da súa unión a catións multivalentes como o calcio (Albarghouthi et al 2000). O calcio é o ión divalente de maior uso na formación de xeles de alxinato debido a que os seus sales son económicas, de fácil dispoñibilidade e non tóxicas. As máis usadas son o carbonato de calcio, sulfato, cloruro, fosfato ou tartrato.

O modelo que explica a formación dos xeles de alxinato con sales cálcicas denomínase "egg-box" (fig.4) e baséase na formación dunha unidade dimérica entre os ións calcio e as cadeas do polímero en forma de bucles (rexións de bloques GG) (Grant et al., 1973).

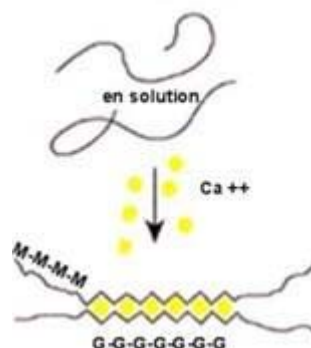


Fig. 4. Representación gráfica do modelo “Egg-box”

A secuencia de residuos de ácido gulurónico se cre que é a responsable das propiedades xelificantes do alxinato con catións divalentes, mentres que as de manurónico son as de interacción preferente coa auga. Polo tanto, un alxinato con elevados niveis de secuencias G presentará unha maior afinidade por axentes de entrecruzamento (catións polivalentes) que un alxinato con baixo contido en G .

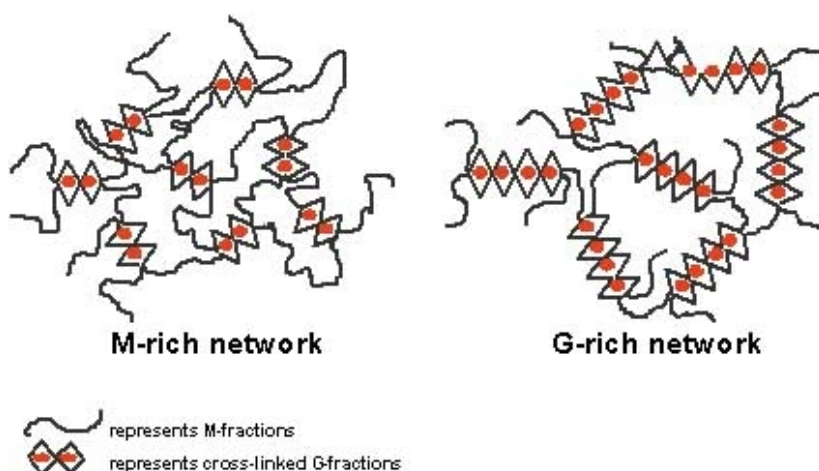


Fig.5. Redes de alxinato.

O uso do alxinato como matriz destinada á inmovilización presenta unha serie de vantaxes, como son: unha elevada porosidade e estabilidade química

xunto cun método de inmovilización rápido, simple e de baixo custo (Abou Seoud e Maachi, 2003). Ademais a inmovilización das bacterias en alxinato permite que estas se poidan reutilizar logo da biodegradación sobre cru, sen que se vexa comprometida a súa capacidade degradativa e evita que as células sexan “lavadas” en sistemas de augas “abertas” co cal redúcese o custo. (Rahman, 2006; Quek et ao, 2006; Manohar e Karegoudar,2001)

A principal desvantaxe que presenta é a desestabilización que sofre en presenza de axentes quelantes de Ca^{+2} ou catións monovalentes (Serp et ao. ,2000) así como a súa inestabilidade cando entra en contacto con elevadas concentracións de anións fosfato, citrato e lactato, os cales teñen afinidade polos ións calcio. (Albarghouthi et ao. ,2000)

OBXECTIVOS

O obxectivo do presente proxecto é o desenvolvemento dun biofiltro elaborado con bacterias con capacidade de degradar o naftaleno coa fin de eliminar este contaminante da auga mariña empregada no cultivo de peixes e mariscos polas empresas de acuicultura instaladas en Galicia. En base a iso se formulan os seguintes obxectivos concretos:

1. Determinación da capacidade degradativa de naftaleno dos cultivos puros de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 .
2. Deseño dun método de inmovilización.
3. Medición da eficacia degradativa das células inmovilizadas en auga de mar.
4. Estudo dos requirimentos nutricionais das células inmovilizadas en auga de mar.
5. Determinación das condicións óptimas de almacenamento das células inmovilizadas.
6. Deseño dun biofiltro contendo os microorganismos inmovilizados.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CEPAS E MEDIOS DE CULTIVO

A cepa utilizada neste estudio foi *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 (sin. *Pseudomonas putida* 195mn4).

O medio utilizado para o precultivo da bacteria contiña (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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O pH do medio axustouse a 7 e esterilizouse a 121°C durante 15 min. O medio esterilizado foi suplementado con 15mg/l de Tween 80 e naftaleno (0,1% w/v)(Fluka, pureza>99%).

Nos estudos de degradación do naftaleno empregouse auga de mar estéril, recollida na costa de Bueu (Pontevedra), o seu pH era de 8.20 e a salinidade de 33 ppm. Cando foi necesario se suplementou cunha fonte de fósforo en forma de K_2HPO_4 nunha relación C/P de 30:1, e de nitróxeno NH_4NO_3 nunha relación C/N de 10:1 (Ahn et al., 1998) . Engadiuse naftaleno a unha concentración final de 25 mM ou 10 mM.

O naftaleno engadiuse a partir dun stock (80g/l) disolto en hexano aos recipientes esterilizados (121 °C, 15 min). Unha vez evaporado o disolvente, engadiuse o medio de cultivo estéril e se someteu a ultrasons durante 5 minutos. As mostras incubáronse en escuridade para evitar a fotooxidación do naftaleno (McConkey et al.,2002).

2. MÉTODOS ANALÍTICO

O naftaleno foi extraído do medio de cultivo mediante a adición dun volume de hexano (Panreac; PAI)(Aranha e Brown,1981), a mestura axitouse mediante vórtex durante 5 minutos para conseguir que o naftaleno pasase á fase orgánica. Transferiuse a un tubo Corex e se centrifugou a 12.000 rpm durante 5 minutos nunha centrífuga Beckman J2-MC co fin de separar a fase acuosa da fase orgánica, da cal extraeuse 1 mL. A cuantificación do naftaleno levou a cabo mediante HPLC (model Waters). A columna utilizada foi unha Rexchrom phenyl 5 μm , 100Å (25 cmx4 x 4.6 mm); a fase móbil foi 73% acetónitrilo - 23% auga a un fluxo de 1mL/min (Regis Technologies, INC.)

O volume de inxección foi de 10 μ l. A detección realizouse mediante un detector Photodiode array waters (lonxitude de onda 254 mM). A recta patrón construír a partir de diferentes concentracións de naftaleno disolto en hexano (1, 5, 10, 15, 20, 25,30 mM) realizándose cada medición por triplicado.

3. MÉTODO DE INMOBILIZACIÓN

A inmovilización realizouse mediante o método de Bettermann e Rehm , (1984) con modificacións .

As células de *P. stutzeri* 19SMN4 foron obtidas por centrifugación (10.000 g, 10 min) desde o medio de precultivo en fase estacionaria temperá (72h) e lavadas dúas veces cunha solución 0,9% de NaCl.

Empregáronse tres tipos de alxinato: Aldrich 180947 (viscosidade 31,40 cP); Sigma A0682 (viscosidade baixa 240 cP) e A2033 (viscosidade media 3600 cP) .

O alxinato (2% w/vol) foi disolto en 0,9% NaCl durante toda a noite e esterilizado en autoclave (121°C,15min) . Preparouse unha suspensión de 50 mL contendo 2 g de células (peso húmido) en 48 mL de solución de alxinato, que se resuspendeu en 50 mL de solución de alxinato mediante un axitador magnético ata a súa completa homoxeneización.

A mestura extrúdiuse a través dunha agulla hipodérmica (0,9 x 25; 20G1) gota a gota sobre unha solución fría e estéril de CaCl_2 (0,2M) (Sigma Aldrich) e NaCl 0,9%. As esferas así formadas mantivéronse nesta solución a temperatura ambiente e axitación suave durante unha hora para conseguir o endurecemento das esferas. Finalmente, as esferas se someteron a varios lavados cunha solución NaCl ao 0,9% para eliminar o exceso de ións e as células non atrapadas na matriz de alxinato.

As esferas formadas, dun tamaño aproximado de 1,6mm (fig.6), foron almacenadas a 4°C en tubos de polipropileno contendo cada tubo 2 gramos de esferas.



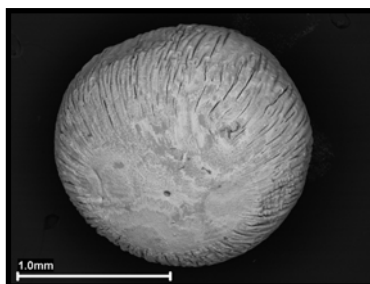


Fig.6. Micrografía electrónica de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 inmobilizada por atrapamento en matriz de alxinato.

Tamén se realizaron esferas sen engadir inóculo bacteriano para ser utilizadas como brancos e determinar a perda abiótica de naftaleno.

4. CONDICIÓN DE CULTIVO

O preinóculo cultivouse a unha temperatura de 30 °C e 180 rpm.

Para os estudos de degradación se utilizaron botellas de 125 mL ás que se engadiu auga do mar (suplementada con nitróxeno e fósforo cando foi necesario) ata un volume final de 10 mL. O inóculo empregado foi:

- Estudio coas células inmobilizadas: 2 g de células inmobilizadas; como control negativo se utilizaron esferas de alxinato sen células.

- Estudio coas células libres: 1 mL de células libres; como control negativo empregouse auga de mar sen inóculo.

Tódalas mostras suplementáronse con naftaleno a unha concentración final de 10mM ou 25 mM da maneira indicada no apartado “Cepas e medios de cultivo”.

As mostras incubáronse a 30°C ou 16 °C con axitación (150 rpm).

As mostras foron retiradas a diversos intervalos de tempo e o seu contido completo foi empregado para determinar a degradación de naftaleno. As mostras se almacenaron a -20 °C e foron procesadas todas xuntas e inmediatamente antes de ser analizadas mediante HPLC, para evitar así erros motivados pola evaporación do naftaleno durante o seu almacenamento.

Tódolos experimentos se realizaron por duplicado.

5. VIABILIDADE CELULAR

Esferas de alxinato contendo as células inmobilizadas foron lavadas dúas veces cunha solución de NaCl ao 0,9% e resuspendidas nunha solución de citrato sódico (Panreac) ao 1% e pH 6 (Serp et al., 2000). Mantivéronse nun axitador vórtex ata a completa disolución do alxinato. A partir desta suspensión se realizaron dilucións seriadas en medio LB.

As placas incubáronse a 30°C e o reconto das colonias realizouse tras 48 horas de incubación.

RESULTADOS

1. RECTA PATRÓN

Para a determinación cuantitativa do naftaleno se elaborou unha recta patrón a partir de solucións de naftaleno en hexano a unhas concentracións de: 1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM e 30mM.

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

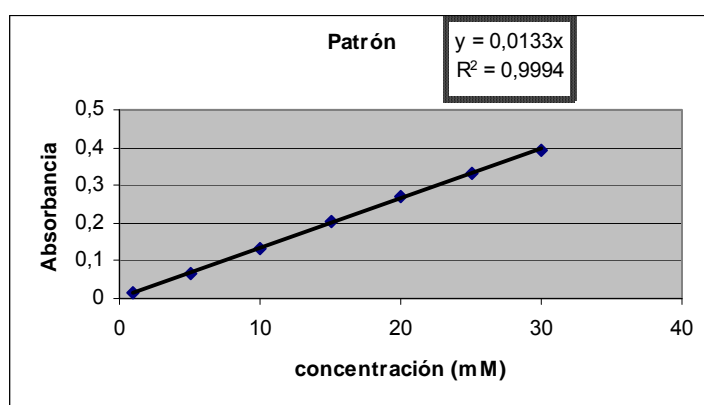


Fig.7. Recta Patrón

Táboa 3. Resultados HPLC.

A ecuación da recta a partir da cal se interpolaron os datos deste traballo foi: $y = 0.0133 x$, sendo x a concentración de naftaleno expresada en milimoles e y a absorbancia obtida ao someter as mostras a HPLC .

2. EXTRACCIÓN DO NAFTALENO DAS MOSTRAS

O hexano é un composto completamente inmiscible en auga, menos denso que esta, moi volátil e no que se dissolve o naftaleno con facilidade. Mediante o método de extracción elixido o naftaleno existente no medio de cultivo (fase acuosa), tras un período de axitación pasaba á fase orgánica (hexano). Tras la centrifugación se forman dúas fases perfectamente diferenciadas: a fase inferior que contén o medio de cultivo e as células (inmovilizadas ou libres) e a fase superior co naftaleno disolto no hexano.

Comprobouse a fiabilidade do método mediante a súa aplicación a mostras de auga de mar cunha concentración coñecida de naftaleno (26mM

/10mM /1mM) á que se lle engadiu para cada unha das concentracións testadas 2 gramos de células inmobilizadas ou 1ml de células libres.

As mostras analizáronse inmediatamente despois de ter sido preparadas, de maneira que o naftaleno non puidese comezar a ser consumido pola bacteria.

En vista dos resultados (Táboa 4) pódese afirmar que a perda de naftaleno durante o procesado das mostras é desprezable ás concentracións de traballo e que o método de extracción é eficaz. Este método é válido tanto para as células inmobilizadas como libres.

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

Táboa. 4. Comprobación da fiabilidade do método de extracción

3. EFECTO DO ALMACENAMENTO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE *PSEUDOMONAS STUTZERI* 19SMN4 INMOBILIZADAS

As células inmobilizadas almacenáronse a 4°C e -20°C, en tubos que contiñan dous gramos de esferas. Extraéronse mostras transcorridos 15 e 33 días e realizouse unha análise da viabilidade celular das esferas. O recuento de UFC realizado ás esferas recentemente formadas e tras 15 e 33 días almacenadas a 4 e -20 °C móstranse na Táboa 5.

Obsérvase que as células inmobilizadas poden permanecer polo menos un mes almacenadas a 4°C sen que se produza unha perda de viabilidade considerable, mentres que o seu almacenamento a unha temperatura de -20°C non é

recomendable. O mesmo estudo foi levado a cabo cos tres tipos de alxinato conducindo aos mesmos resultados.

Táboa 5 . Efecto do almacenamento a 4°C e a -20°C sobre a viabilidade das células inmobilizadas en alxinato (viscosidade 31,4 cP) .

Tempo (días)	Viabilidade (UFC 2g ⁻¹)	Viabilidade (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 AUGA DE MAR

Investigouse o efecto que diversos factores teñen sobre a degradación do naftaleno en auga de mar. Os resultados da biodegradación mediante células libres e inmobilizadas en alxinato son presentados como o cociente da concentración residual e a inicial (C C0-1) fronte ao tempo.

As esferas formadas cos tres tipos de alxinato e sen inóculo bacteriano para avaliar a perda abiótica do naftaleno utilizáronse para realizar as correccións dos resultados obtidos e evitar así que as perdas de naftaleno debidas á evaporación ou á absorción ás esferas fosen atribuídas á degradación realizada polas bacterias.

4.1. Efecto do suplemento de nutrientes sobre a degradación do naftaleno

Para determinar se a disponibilidad de nitróxeno e fósforo limitaba o consumo de naftaleno investigouse a degradación deste hidrocarburo mediante células libres en auga de mar con e sen suplemento de nutrientes (fig.8, Táboa 6). Os resultados a unha temperatura de 30°C amosan como unha concentración inicial de naftaleno (25 mm) era practicamente degradada (93%) dentro dos 6 primeiros días de incubación naquelas mostras nas que a auga de

mar habíase suplementado con nitróxeno e fósforo, mentres que nas que non o foron unicamente un 42% do naftaleno foi degradado transcorrido ese tempo.

Cando a temperatura foi de 16°C e cunha concentración inicial de naftaleno 10 mM (condicións máis próximas ás existentes no medio mariño) comprobouse que a presenza de nutrientes tamén afectaba á degradación aínda que en menor medida.

Estes resultados demostran a importancia de suplementar a auga de mar con nutrientes para obter unha mellor taxa de biodegradación. Polo tanto tódolos experimentos de biodegradación seguintes foron desenvolvidos suplementando a auga de mar con fontes de nitróxeno e fósforo.

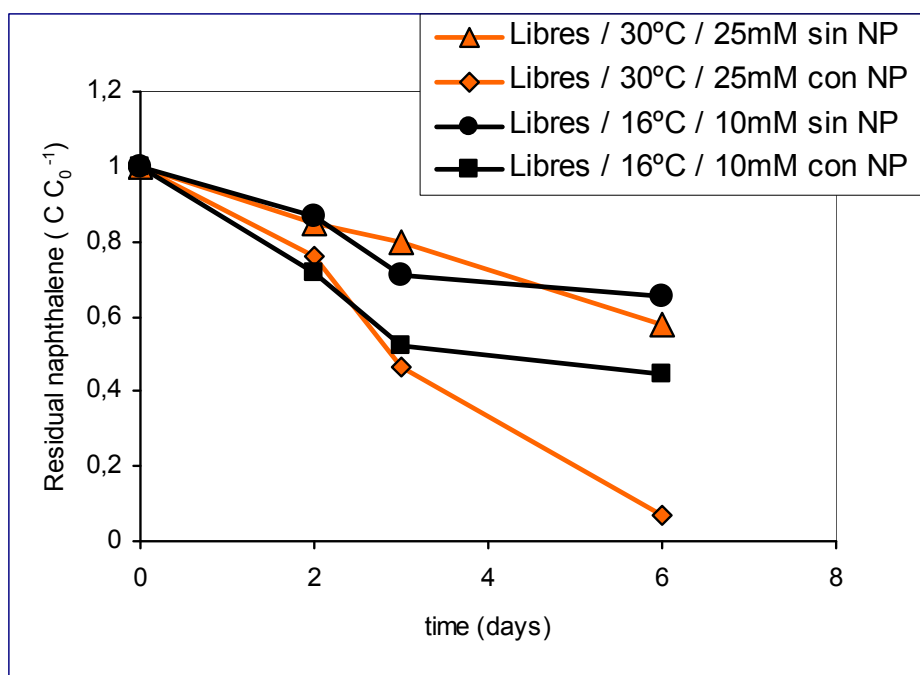


Fig.8. Degradación de naftaleno mediante células libres en auga de mar a 30°C e unha concentración inicial 25 mM de naftaleno con (◊) e sen suplemento de nutrientes (▲), e a 16 °C e unha concentración 10 mM de naftaleno con (■) e sen (●) suplemento de nutrientes.

Células libres $C_0=25\text{mM}$ $T^a=30^\circ\text{C}$ Suplemento de N e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	25
2	19,02
3	11,59
6	1,65

Células libres $C_0=25\text{mM}$ $T^a=30^\circ\text{C}$ Sen suplemento de N e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	26,50
2	22,46
3	21,06
6	15,36

Células libres $C_0=10\text{mM}$ $T^a=16^\circ\text{C}$ Suplemento de N e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	9,60
2	6,85
3	5,01
6	4,30

Células libres $C_0=10\text{mM}$ $T^a=16^\circ\text{C}$ Sen suplemento de N e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	9,60
2	8,29
3	6,84
6	6,25

Táboa 6. Valores absolutos da degradación naftaleno correspondentes á figura 8.

4.2. Efecto da temperatura sobre a degradación.

Analizouse a biodegradación de naftaleno a 30 e 16 °C para determinar a influencia da temperatura no proceso. As temperaturas seleccionadas corresponden respectivamente ás condicións óptimas de crecemento de *Pseudomonas* e á temperatura media da auga de mar rexistrada nas costas de Galicia.

Os resultados amosan que cando a temperatura de incubación foi de 30°C tanto no caso de células libres como inmobilizadas, a degradación era practicamente completa transcorridos 6 días, mentres que cando a temperatura foi de 16°C, unicamente o 22% era degradado no caso das células libres e o 33% no caso das células inmobilizadas (fig. 9, Táboa7).

O feito de que nas mesmas condiciones as células inmobilizadas teñan unha taxa de degradación maior que as células libres pode ser motivado porque os límites difusionais establecidos polo alxinato protexen á bacteria da inhibición por substrato (Abou Seoud and Maachi, 2003). Obsérvase como a degradación é moito máis lenta a 16°C que a realizada a

unha temperatura de 30°C. A diminución na velocidade de degradación a 16 °C pode ser motivado pola solubilidade e, polo tanto, biodisponibilidade do naftaleno e a taxa metabólica, a cal decrece cando se incrementa a temperatura (Shiu and Mackay, 2006; Bossert and Bartha, 1984).

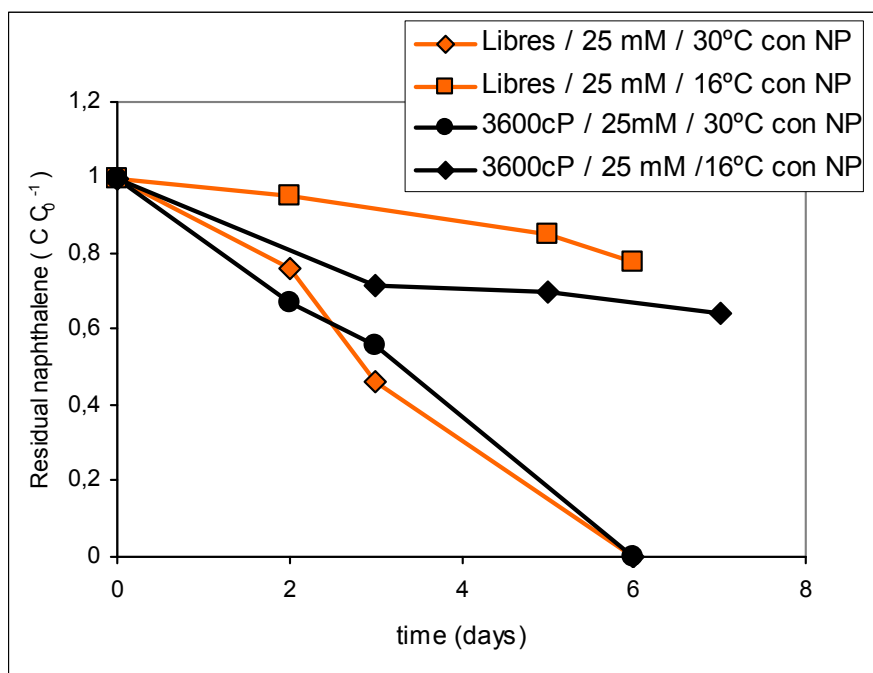


Fig.9. Degradación dunha concentración inicial de naftaleno 25 mM mediante células libres (laranxa) e inmobilizadas (negro) en auga de mar suplementada con nutrientes a unha temperatura de 16 °C (—■—, —◆—) e 30°C (—◇—, —●—).

Táboa 7. Valores absolutos da degradación de naftaleno correspondentes á figura 9.

Células libres C ₀ =25mM T ^a =30°C Suplemento de N e P		Células libres C ₀ =25mM T ^a =16°C Suplemento de N e 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 e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	25
2	17,62
3	14,87
6	0

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

Tras tres días de incubación, podía observarse unha coloración marrón no medio dos cultivos incubados a 30°C, a cal podería ser debida á acumulación de catecol, un produto intermedio da degradación do naftaleno. Segundo un estudio realizado por Park et al. (2004) a aparición dun pigmento marrón é debida a unha autooxidación non enzimática do catecol (produto intermediario do catabolismo do naftaleno) e compostos relacionados con este.

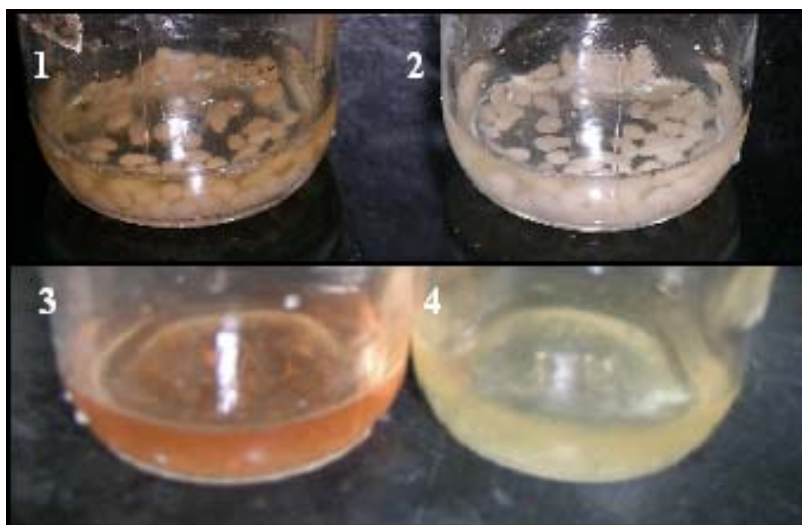


Fig. 10. Coloración do medio de cultivo tras tres días de incubación a diferentes temperaturas: **1-** Células inmobilizadas en alxinato cultivadas a 30°C; **2-** células inmobilizadas en alxinato cultivadas a 16°C; **3-** células libres cultivadas a 30°C; **4-** células libres cultivadas a 16°C.

4.3. Efecto da concentración inicial de naftaleno.

Cando se reduciu a concentración de naftaleno no medio desde 25mM a unha concentración 10 mM observouse que aumentaba a velocidade de degradación tanto coas células libres como inmobilizadas cultivadas a 16°C. No caso das células libres (fig.11,Táboa 8) tras seis días de cultivo o 55% dunha concentración 10 mM de naftaleno fora degradada, mentres que cando a concentración inicial foi de 25 mM unicamente se degradou o 22%. No caso das células inmobilizadas (fig.12,Táboa 9) transcorridos tres días e cunha concentración inicial de 10 mM se consumira o 60% do naftaleno coas células inmobilizadas en alxinato de 240 cP e 3600 cP mentres que a unha concentración de 25 mM unicamente fora degradado o 18,5%, e o 28,7% respectivamente. Transcorridos sete días estas diferenzas eran máis notables entrámbalas concentracións iniciais (fig.12). O feito de que a cantidade total de naftaleno degradado sexa máis baixa cunha concentración inicial de 25 mM posiblemente está relacionado co efecto tóxico deste hidrocarburo. Como se amosan nas figuras 11 e 12, este efecto tóxico non é tan acusado no caso das células inmobilizadas posto que transcorridos 6 días, a taxa de degradación é do 33% co alxinato de 3600 cP, e 25% co alxinato de 240 cP en relación ao 22 % cando se usan células libres.

A taxa degradativa era menor transcorridos os tres primeiros días de cultivo. Este feito probablemente é debido á acumulación de produtos do metabolismo no medio de cultivo. Tras sete días de cultivo, o pH do medio descendera desde 7,25 (pH do auga de mar con suplemento de nitróxeno e fósforo) a 5,64; o pH óptimo para a actividade da naftaleno diosixenasa é 7,0 (Dorn et. al, 2003). Esta diminución de pH pode estar motivada porque se utilizou NH_4NO_3 como fonte de nitróxeno para suplementar o medio, un estudo realizado por Aranha e Lewis (1981) suxire que a utilización desta fonte de nitróxeno pode levar a unha acumulación de ácido salicílico, produto intermediario do catabolismo do naftaleno e unha redución do pH no medio.

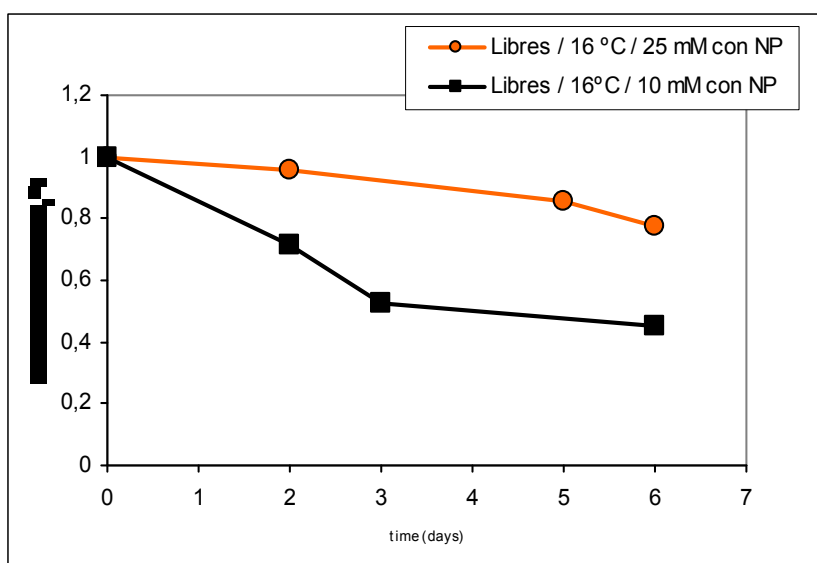


Fig.11. Degradación dunha concentración inicial de naftaleno 25 mM (—○—) e 10 mM (—■—) mediante células libres en auga de mar suplementada con nitróxeno e fósforo.

Células libres $C_0=10\text{mM}$ $T^a=16^\circ\text{C}$ Suplemento de N e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	9,60
2	6,85
3	5,01
6	4,30

Células libres $C_0=25\text{mM}$ $T^a=16^\circ\text{C}$ Suplemento de N e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	26,5
2	25,28
5	22,60
6	20,55

Táboa 8. Valores absolutos da degradación de naftaleno correspondentes á figura 11.

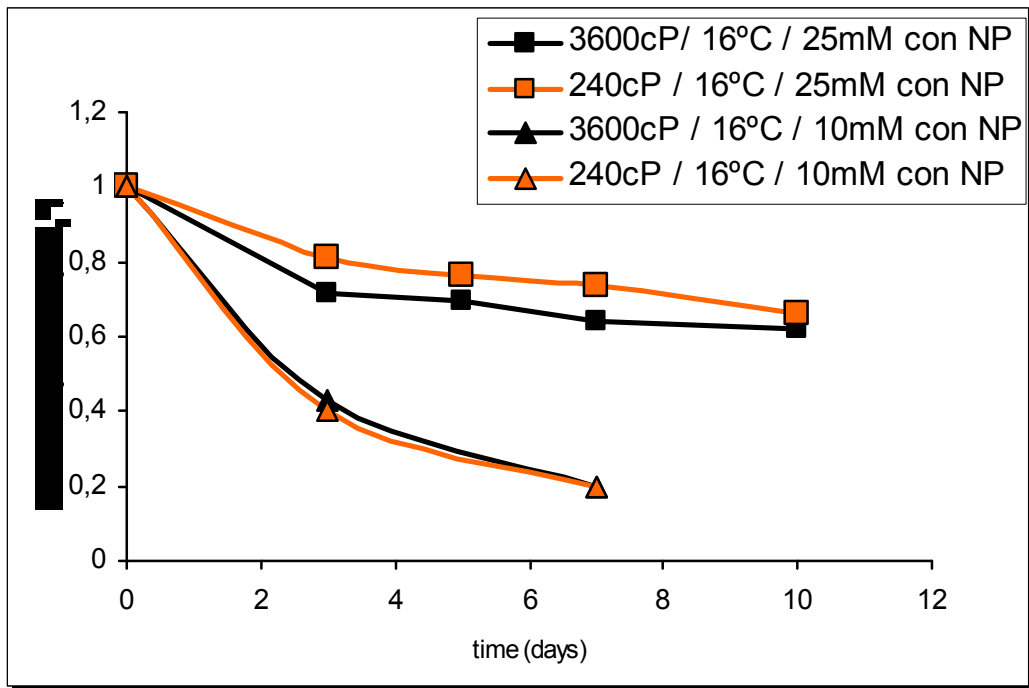


Fig.12. Degradación dunha concentración inicial de naftaleno 25 mM (cadrados) e 10 mM (triángulos) mediante células inmobilizadas en alxinato de 3600 cP (—■—, —▲—) e 240 cP (—□—, —△—) cultivadas en auga de mar suplementada con nitróxeno e fósforo.

Inmov. (3600 cP) C ₀ =10 mM T ^a =16°C Suplemento de N e 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 e 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 e 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 e P	
Día	Concentración residual naftaleno (mM)
0	25,7
3	20,94
5	19,64
7	18,84
10	17,04

Táboa 9. Valores absolutos da degradación de naftaleno correspondentes á figura 12.

4.4. Efecto da viscosidade do alxinato.

Empregouse alxinato de tres viscosidades diferentes para testar a viabilidade das células inmobilizadas e a degradación de naftaleno como se describe en materiais e métodos.

A forma das esferas era máis regular no caso das formadas con alxinato de 3600 cP, as esferas realizadas con alxinato de viscosidade 31,4 cP eran moito máis irregulares. Tras sete días de cultivo parte das esferas formadas con alxinato de viscosidade 31,4 cP fragmentáranse, mentres que aquelas formadas con alxinato de maior viscosidade (240 cP e 3600 cP) aparentemente non experimentaran cambios na súa estrutura. Este feito levou a descartar as esferas formadas con alxinato de 31,4 cP nos seguintes experimentos.

A concentración inicial de naftaleno utilizada para estes experimentos foi de 10 mM debido a que os resultados obtidos previamente mostraban unha menor toxicidade para as células a esta concentración e, de feito, esta concentración

aproxímase máis á que poden existir en auga de mar contaminada en condicións reais .

Na figura 12 se pode observar como a viscosidade do alxinato non inflúe na velocidade de degradación do naftaleno. Así, tras sete días de cultivo, as esferas realizadas con ambos tipos de alxinato degradaron aproximadamente a mesma cantidade de naftaleno presente no medio.

Para analizar a capacidade de retención celular das esferas analizouse o número de células viables que contiñan transcorridos 3 e 7 días, así como o número de células presentes no medio (Táboa 10). Transcorridos tres días, observábase unha redución no número de células viables nas esferas. Isto responde probablemente a unha perda inicial de células debido á morte celular ou á saída das células desde as esferas ao medio de cultivo.

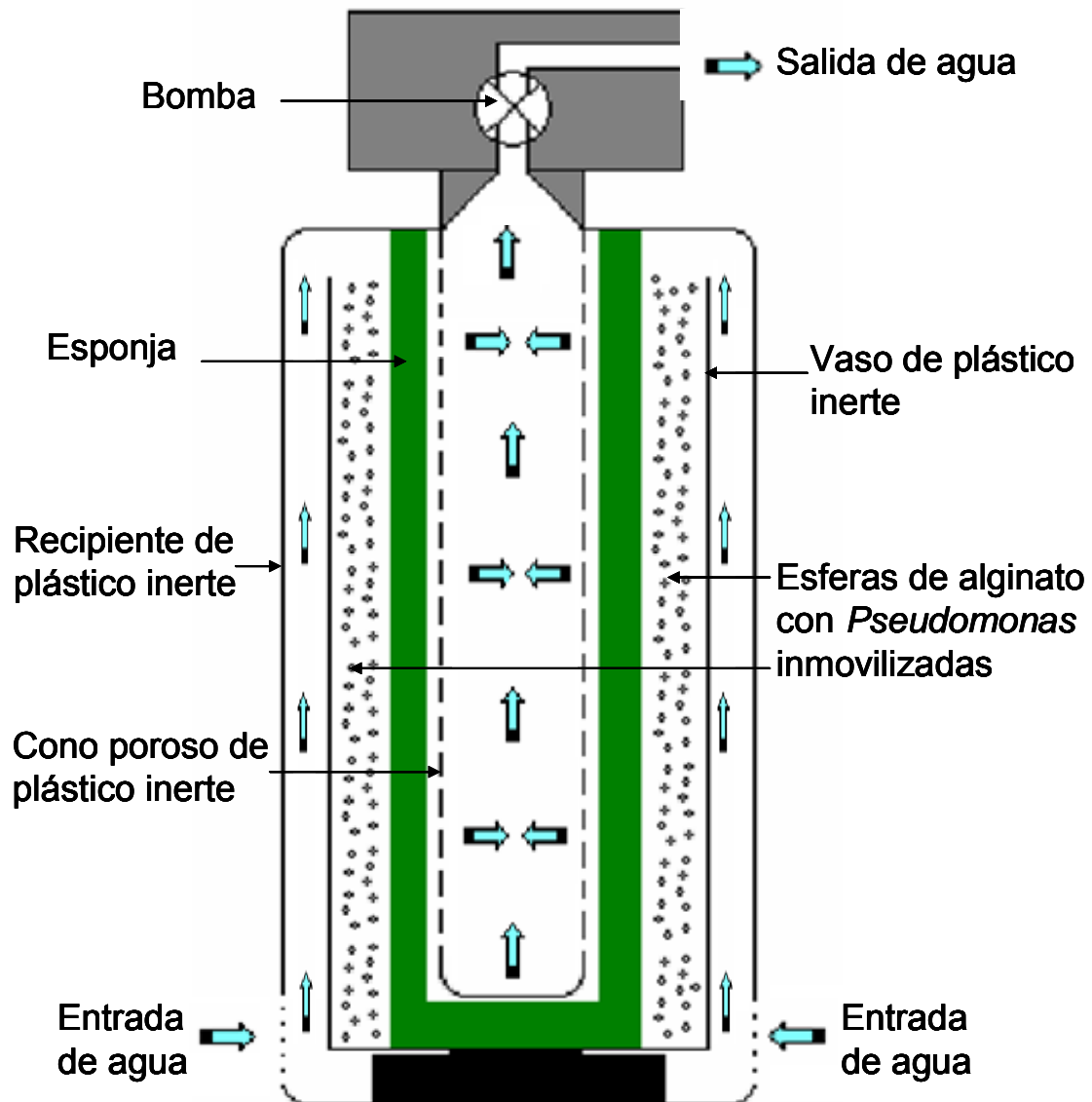
Inóculo	Viscosidade		Células viables	
			3 días	7 días
9,2 x 10 ⁸ UFC 2g ⁻¹	3600cP	esferas (UFC 2g ⁻¹)	4,6x10 ⁷	6,0 x 10 ⁷
		medio (UFC mL ⁻¹)	nd	8,0 x 10 ²
9,9 x 10 ⁸ UFC 2g ⁻¹	240cP	esferas (UFC 2g ⁻¹)	2,9 x10 ⁷	6,6 x 10 ⁷
		medio (UFC mL ⁻¹)	3,2 x10 ⁴	nd

nd – non determinado.

Táboa 10. Efecto da viscosidade do alxinato sobre a viabilidade de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 inmobilizada cultivada en auga de mar suplementada con nitróxeno e fósforo, a unha concentración inicial de naftaleno de 25 mM e a unha temperatura de 16°C transcorridos 3 e 7 días.

Tras sete días observouse un lixeiro incremento no número de células viables nas esferas. Os resultados amosan que as esferas formadas con alxinato de viscosidade elevada son máis efectivas retendo as células, xa que o número de células viables presentes no medio é menor que naqueles cultivos con esferas de alxinato de menor viscosidade.

5. Esquema do biofiltro contendo as bacterias inmobilizadas



Na imaxe podemos observar un esquema do biofiltro destinado a ser colocado na entrada de auga das piscifactorías, constaría de: Entrada de auga na cal habería unha válvula de axuste coa que se poida graduar o caudal.

As frechas indican a dirección do fluxo de auga mariña. O fluxo debe ser constante e estable (independente das variacións de presión da rede de auga salgada), ademais o caudal de auga non deberá ser demasiado forte, para evitar que as esferas coas células inmobilizadas depositense no fondo do filtro.

O filtro tería unha carcasa cilíndrica con dous tubos concéntricos no seu interior. A esponxa situada entre as células inmobilizadas e cilindro interior

estaría destinada a garantir a retención das posibles células que se puidesen liberar desde as esferas de alxinato.

A saída estaría situada na parte superior para evitar o apilamento das células por gravidade. A entrada de auga baixa e a saída alta aumentaría ademais a aireación da auga.

Unha bomba regularía a saída da auga de maneira que o tempo de retención sexa o suficiente para que se produza a degradación completa do hidrocarburo.

CONCLUSIONES

1. A temperatura óptima de almacenamento das células inmobilizadas en alxinato é de 4°C. Nestas condicións se conserva a súa viabilidade durante ao menos un mes.
2. *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 degrada eficientemente naftaleno en auga de mar.
3. A metabolización do naftaleno é maior cando se engaden nutrientes á auga de mar.
4. A degradación é máis lenta a 16°C que a realizada a unha temperatura de 30°C.
5. A capacidade para degradar naftaleno mantense tras a inmobilización celular por atrapamento en esferas de alxinato baixo as diferentes condicións ensaiadas.
6. As esferas formadas con alxinato de viscosidade elevada son máis efectivas retendo as células.
7. Cando a temperatura de incubación é de 16°C (próxima á que tería a auga empregada nas piscifactorías) existe unha degradación efectiva do naftaleno, sobre todo cando a concentración deste non é demasiado elevada.

Estes estudos poñen de manifesto o grande potencial de *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 inmobilizada en alxinato para o desenvolvemento de tecnoloxías para o tratamento de augas mariñas *in situ* con concentracións non moi 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.