



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

erriaren ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

DEGRADACIÓN DE ALCANOS POR CÉLULAS DE *ALCANIVORAX VENUSTENSIS* INMOVILIZADAS EN HIDROGELES ADHESIVOS Y BIODEGRADABLES



Eneko Largo Pereda

2010

ISBN: 978-84-694-0906-0



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

Grupo de Tecnología Enzimática y Celular
Departamento de Bioquímica y Biología Celular

Degradación de alcanos mediante *Alcanivorax venustensis* inmovilizada en
hidrogeles adhesivos y biodegradables

Memoria presentada por Eneko Largo Pereda para optar al grado de
Doctor en Ciencias.

2010

AGRADECIMIENTOS

Al acabar este trabajo, quisiera agradecer en primer lugar al Ministerio de Educación y Cultura la financiación necesaria para que este proyecto se llevara a cabo. Además, me gustaría agradecer a mis directores de tesis el haberme permitido participar en este grupo y todo lo que han aportado a mi formación y a mi persona. A la profesora María Jesús Llama por mostrarme el valor del trabajo y la importancia de no rendirse en los momentos en los que parece difícil salir adelante. Al profesor Juan Luis Serra por enseñarme que la imaginación y la creación van de la mano a la innovación. No podemos innovar sin imaginar.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, los que están y los que estuvieron. Gracias a Inés por la esperanza y por la escucha, sin ti, vecina no habría sido posible. Gracias Laura, por enseñarme como se hace ciencia y por mostrarme como quiero ser si soy investigador, como tú. Gracias a Sonia por tener todas las respuestas y a Javi por tener todas las preguntas. Gracias Begoña, por hacerme sentir tan bien desde el principio. Gracias Maite por soportarme tantísimos años, y por ser tantas veces quien me hizo avanzar. Gracias Silvia por las sonrisas, las correcciones, las rarezas y las purezas. Gracias Marta y Joana, o Joana y Marta, por estar siempre juntas, por las canciones y por las pinturas políglotas. Gracias Álvaro por ser un gallo en este gallinero, por las frikadas y por las ganas. Gracias Ainhoa y Noelia por hacerme sentir tan mayor, por dejar que los ancianos os veamos evolucionar, *arigato*. No quiero dejarme a Guille y a Teresa, por los momentos compartidos y los regalos sorpresa. Tampoco me olvido de Zuriñe y de Kike, el biólogo. Gracias a todos, somos muchos pero sois los mejores.

Gracias a toda la gente de Leia, por la ayuda, el interés y las ganas. Y por el hidrogel. Gracias Elena, por todo, Marta, Naia, Sarai y a todos los que han ayudado a que este trabajo salga adelante. Gracias también a IDEBIO S.L. y a DEGUSSA TEXTURANT SYSTEM por el quitosano y el xantano. Gracias también al profesor Fernando Rojo por cedernos amablemente dos cepas bacterianas.

Gracias a toda la gente del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y de la Facultad de Ciencia y Tecnología en general. A Kerman, a Txesco, a Jon por colaborar de buena gana en este trabajo. Unai y Aitor, Málaga ya no es lo mismo. A Igor por ser tan buen maestro. Gracias Clemente por todo el trabajo y la amabilidad. Ah, que no se me olvide, gracias al consejo, ha sido sin duda una experiencia.

Gracias a mis compañeros de clase desde siempre. A toda esa gente que ha confiado en mí. A Gorje por ser mi compañero en todo. A Irene por creer siempre en mí, por repetirme que no podía rendirme y por ese “Eneko, si tú no puedes, no puede nadie”. A María y Saioa por ser de Santutxu, por las fiestas y por la confianza. A Nuria, Aitziber, Zuriñe, a Luis, aunque solo coincidiéramos en genética. A Montse, a Ainara, a Maitane y a Jon. Tampoco quiero olvidarme de Josune y Mario, me habéis alegrado muchos días y hacéis las mejores patatas del mundo. Agradecer y citar a Jose Mesa, Igor Golubenkov y al usuario de Flickr, Jule Berlin, por las fotos de la portada y por creer que el arte, la cultura y el conocimiento han de ser accesibles y para todos, muchas gracias, ahora sé mucho más de licencias. Y a toda esa gente que me dejo. De verdad, lo siento, mi memoria es horrible.

A los Golfos, esos que me acompañan siempre y aguantan mis brasas sobre lo maravillosa que es la ciencia. Gracias Mur por ser tú. Gracias Iker por la pasión y por el fútbol. Gandalf, pero que risas tío. A toda la gente del grupo Eskaut, habéis sido mi otra vida. A mi grupo de referencia, por la paz y a Jorge por tocarme tanto las narices siempre. Un saludo hasta Ecuador, compañeros. No me quiero olvidar de Mai por aguantarme tantas cosas, a veces algunas buenas. Ni a la gente del pueblo, Sara, me doctoro, por fin. A mis compañeros en las ondas, esto va a ser grande y en directo.

A toda mi familia por aguantarme. Muchas veces sin saber a que venían las malas caras. Por aguantarlo todo. De verdad, muchas gracias. Sois tan grandes que casi ni lo sabéis. A mis primas y a mi tía, por las buenas intenciones, siempre. Gracias Aita y Ama, por hacerme lo que soy. Gordi, te quiero un montón y sin tenerte ahí, esto no habría sido igual.

Por último, Miriam, gracias por todo. Por ser mí sustento, por responder con sonrisas a cada día malo. Gracias por la convivencia, la esperanza y por confiar siempre en mí. Quien lo diría, ya estamos aquí. De verdad, eres mi todo. Mi futuro.

Mil gracias a todos. Si cualquiera de todos vosotros hubiera faltado, este trabajo no habría sido el que es.

Arte es yo, Ciencia es nosotros. Claude Bernard.

A mi familia

¡Que viva la ciencia!,

¡Que viva la poesía!...

Mi guitarra y vos. Jorge Drexler.

ABREVIATURAS

A_{λ}	Absorbancia medida a la longitud de onda λ (nm)
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CoA	Coenzima A
DEGS	Succinato de dietilenglicol
DTT	Ditiotreitol
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
pI	Punto isoeléctrico
p/v	Relación peso/volumen
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en condiciones desnaturizantes con SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UA_{λ}	Unidad de absorbancia medida a una longitud de onda λ (nm)
v/v	Relación volumen/volumen
Vh	Voltios por hora
x g	Número de veces la aceleración de la gravedad

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El petróleo.....	3
<i>1.1.1. Formación.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2. Producción.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3. Aplicaciones.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.4. Importancia económica.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.5. Transporte.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.6. El petróleo como contaminante.....</i>	<i>6</i>
1.1.6.1. Historial de grandes vertidos accidentales.....	7
1.1.6.2. El desastre del Prestige.....	8
1.2. Componentes del petróleo.....	9
<i>1.2.1. Hidrocarburos saturados.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2. Hidrocarburos aromáticos.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3. Resinas y asfaltenos.....</i>	<i>12</i>
1.3. Biodegradación de petróleo.....	13
<i>1.3.1. Metabolismo de los alcanos.....</i>	<i>14</i>

1.4. Microorganismos degradadores de hidrocarburos.	16
<i>1.4.1. Bacterias hidrocarbonoclastas obligadas (OHCB)</i>	<i>18</i>
<i>1.4.2. El género Alcanivorax.</i>	<i>19</i>
1.5. Biorremediación.	20
<i>1.5.1. Biorremediación según el lugar de aplicación.</i>	<i>21</i>
<i>1.5.2. Biorremediación según la acción humana.....</i>	<i>22</i>
<i>1.5.3. Tratamientos de biorremediación in situ de petróleo.</i>	<i>23</i>
1.6. Inmovilización de biomasa microbiana.	24
<i>1.6.1. Ventajas de las células inmovilizadas sobre las libres.</i>	<i>26</i>
<i>1.6.2. Tipos de inmovilización celular.</i>	<i>27</i>
1.6.2.1. Inmovilización a superficies de soportes sólidos.....	29
1.6.2.2. Atrapamiento en matriz porosa.	29
1.6.2.3. Agregación celular.	30
1.6.2.4. Retención de biomasa.	30
<i>1.6.3. Requisitos del soporte para inmovilización.</i>	<i>31</i>
<i>1.6.4. Inmovilización en hidrogeles</i>	<i>31</i>
2. OBJETIVOS	33

3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Reactivos y productos.....	39
3.2. Microorganismos y condiciones de cultivo	42
3.2.1. <i>Crecimiento en medio líquido.....</i>	42
3.2.2. <i>Crecimiento en placa.....</i>	44
3.2.3. <i>Crecimiento en fermentador</i>	44
3.3. Métodos analíticos	45
3.3.1. <i>Determinación de proteína.....</i>	45
3.3.2. <i>Métodos cromatográficos</i>	47
3.3.2.1. <i>Determinación de n-dodecano mediante GLC</i>	47
3.3.2.2. <i>Determinación de aceite mineral mediante GLC/MS.....</i>	48
3.4. Obtención de extractos celulares.	49
3.4.1. <i>Obtención de extracto celular soluble.....</i>	49
3.4.2. <i>Aislamiento y purificación de membranas plasmáticas.....</i>	50
3.5. Hidrogel e inmovilización de biomasa	53
3.5.1. <i>Formación del hidrogel.....</i>	55
3.5.2. <i>Caracterización del hidrogel.....</i>	56

Índice

3.5.2.1. Pruebas de adhesividad a rocas	56
3.5.2.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	56
3.5.2.3. Espectroscopía de Infrarrojo (IR).....	57
3.5.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	57
3.5.3. <i>Inmovilización de la biomasa por atrapamiento.</i>	58
3.5.3.1. Inmovilización de biomasa fresca.....	58
3.5.3.2. Inmovilización de biomasa liofilizada.	59
3.5.4. <i>Estimación de la biomasa inmovilizada</i>	60
3.6. Diseño del sistema experimental.	61
3.6.1. <i>Ensayo de respiración de la biomasa liofilizada</i>	64
3.7. Ensayos de biodegradación	65
3.7.1. <i>Ensayos en medio líquido</i>	65
3.7.2. <i>Ensayos en placa</i>	65
3.8. Métodos electroforéticos.	67
3.8.1. <i>Electroforesis monodimensional</i>	67
3.8.2. <i>Electroforesis bidimensional</i>	67
3.9. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas ESI-TOF.	69

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
4.1. Caracterización del hidrogel.....	75
4.1.1. <i>Medidas de adhesión a rocas.....</i>	75
4.1.2. <i>Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....</i>	77
4.1.3. <i>Espectroscopía de Infrarrojo (IR).....</i>	79
4.1.4. <i>Microscopía electrónica de barrido.....</i>	80
4.2. Selección de cepas.....	82
4.3. Crecimiento de <i>A. venustensis</i> en medio líquido.....	85
4.3.1. <i>Crecimiento de <i>A. venustensis</i> con n-dodecano.....</i>	85
4.3.2. <i>Crecimiento de <i>A. venustensis</i> en aceite mineral.....</i>	88
4.3.3. <i>Crecimiento de <i>A. venustensis</i> con diferentes fuentes de carbono en cultivos de 1 l.</i>	89
4.3.4. <i>Crecimiento de <i>A. venustensis</i> con diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos de 1 l.</i>	93
4.3.5. <i>Crecimiento de <i>A. venustensis</i> usando fertilizantes comerciales como fuente de nitrógeno y fósforo.....</i>	98
4.4. Inducción del sistema de degradación de hidrocarburos.....	99
4.4.1. <i>Análisis proteómico de <i>A. venustensis</i> mediante electroforesis bidimensional</i>	102

4.5. Eliminación de <i>n</i>-dodecano y aceite mineral por biomasa libre de <i>A. venustensis</i>.	113
4.5.1. <i>Eliminación de n-dodecano por biomasa libre de A. venustensis en discontinuo en cultivos de 100 ml.</i>	113
4.5.2. <i>Eliminación de aceite mineral por biomasa libre de A. venustensis en discontinuo en cultivos de 100 ml.</i>	115
4.6. Inmovilización de biomasa fresca de <i>A. venustensis</i> en hidrogeles de quitosano-goma xantano.	116
4.6.1. <i>Efecto de la salinidad y el pH sobre la inmovilización de A. venustensis.</i>	118
4.6.2. <i>Efecto del agua de mar sobre la inmovilización de A. venustensis en hidrogeles</i>	122
4.7. Eliminación de hidrocarburos por biomasa fresca inmovilizada de <i>A. venustensis</i>.	124
4.7.1. <i>Eliminación de n-dodecano por biomasa fresca de A. venustensis inmovilizada</i>	124
4.7.2. <i>Eliminación de aceite mineral por biomasa fresca de A. venustensis inmovilizada en hidrogeles.</i>	126
4.7.3. <i>Efecto de la temperatura.</i>	129
4.7.4. <i>Efecto del uso de agua de mar en la inmovilización y de la salinidad</i>	130
4.7.5. <i>Efecto de la fuente de nitrógeno</i>	132

4.7.5.1. Permeabilidad del hidrogel a colorantes iónicos.	134
4.8. Eliminación de hidrocarburos por biomasa liofilizada inmovilizada de <i>A. venustensis</i>.	136
4.8.1. Biodegradación por biomasa liofilizada.....	136
4.8.2. Tiempo de rehidratación de la biomasa.....	138
4.8.3. Cantidad óptima de liófilo.....	140
4.8.4. Efecto de la temperatura.....	142
4.8.5. Efecto de la fuente de nitrógeno.	143
4.8.6. Efecto del uso de agua de mar y agua potable.....	145
4.8.7. Efecto de la suplementación de agua de mar.....	146
4.8.8. Uso de fertilizantes para la degradación de hidrocarburos mediante biomasa inmovilizada.	147
4.9. Evaluación de la biomasa liofilizada de <i>A. venustensis</i> inmovilizada en hidrogeles de quitosano-goma xantano.....	149
5. DISCUSIÓN GENERAL	151
6. CONCLUSIONES	169
7. BIBLIOGRAFÍA.....	175

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El petróleo.

Etimológicamente la palabra *petróleo* significa aceite de piedra, por su textura similar a la del aceite y hallarse principalmente en yacimientos de roca sedimentaria. Su color varía entre ámbar y negro, en función de su composición.

El petróleo, así como sus derivados, es un conjunto complejo de compuestos químicos (Henry, 1998), en el que coexisten fases sólidas, líquidas y gaseosas. En la literatura existen varias publicaciones acerca de la composición del petróleo (Postanogova, 1981; King, 1988; Henry, 1998), y a medida que se mejoran las técnicas analíticas de separación e identificación, se consigue identificar nuevos componentes. Está compuesto básicamente por carbono e hidrógeno, y algunos hetero-átomos, principalmente nitrógeno, azufre y oxígeno (Alajbeg *et al.*, 2000), formando hidrocarburos, moléculas altamente reducidas y con un gran potencial químico (Kenney *et al.*, 2002).

1.1.1. Formación.

La formación natural del petróleo se basa en la transformación en hidrocarburos de restos orgánicos de plantas y animales principalmente por la acción de bacterias anaeróbicas. Para que este proceso pueda llevarse a cabo son necesarias altas temperaturas, una gran presión, que es ejercida por las capas terrestres de sedimentos y, por supuesto, condiciones de anoxia.

La variación de estas condiciones determinará la composición final del crudo (Schenk *et al.*, 1997; Langrock and Stein, 2004), aunque existan ciertas discrepancias acerca de cuál de estas variables es la más importante, y algunos autores sugieren que los mecanismos relacionados con la temperatura son los más determinantes (Paschoa, 1997).

A finales de siglo pasado apareció en la comunidad científica cierto debate acerca del posible origen abiótico del petróleo, bajo condiciones muy concretas como sistemas hidrotermales de algunas zonas de rifts oceánicos que alcanzan temperaturas de entre 200 y 400 °C (Simoneit *et al.*, 2004) y aunque el debate sigue abierto (Zhang, 2008), mayoritariamente, la idea original del origen del petróleo sigue siendo la más aceptada (Ding *et al.*, 2008; Grosjean *et al.*, 2009).

1.1.2. *Producción.*

A finales de 2006, las reservas probadas de petróleo a nivel mundial ascendían a 168.600 millones de toneladas, de las cuales, el 75,5% se encuentra en los 11 países pertenecientes a la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP). Si a esto le unimos las reservas de la antigua Unión Soviética, el 85,9% del petróleo cuya existencia es conocida se encuentra localizado en estos pocos países. El petróleo en crudo, tal y como se encuentra en los yacimientos no tiene utilidad práctica alguna. Es necesario realizar un proceso de separación en fracciones o refinado.

1.1.3. *Aplicaciones.*

Los productos derivados del petróleo tienen gran variedad de usos aunque principalmente sirven para el gasto energético de consumidores industriales y privados. El 90% de los derivados del crudo se destina a combustibles. En este sentido, se obtienen del refinado del petróleo, gasolinas de diferentes octanajes, gasóleos, para vehículos y calefacciones, gases del petróleo, como butano o propano, combustibles de aviones, con alto octanaje como el queroseno o fuelóleos, que se usan en la industria o como combustible de buques.

Además del uso energético, los derivados del crudo se utilizan como aceites lubricantes, asfaltos para carreteras o pistas deportivas, o como aditivos para combustibles. Además algunos subproductos pueden ser utilizados en ceras, plásticos, detergentes, fibras sintéticas o medicinas. También durante el refinado del crudo pueden obtenerse grandes cantidades de azufre e hidrógeno.

1.1.4. *Importancia económica.*

El petróleo es la fuente de energía principal de la sociedad actual. Pero es un recurso no renovable, del que se dependerá hasta la entrada en vigor de nuevas fuentes energéticas, baratas, ecológicas y renovables. Su importancia no ha dejado de crecer desde que se descubrieran sus primeras aplicaciones a mediados del siglo XIX, incluso ha sido responsable de conflictos bélicos en algunas zonas del mundo.

El petróleo es el sustento económico de los países que son grandes productores, y las fluctuaciones en el precio del crudo, influyen en gran medida en la economía mundial.

1.1.5. *Transporte.*

Geográficamente, podemos decir que el 61% de petróleo mundial se encuentra en Oriente Medio, que sin embargo consume tan solo el 7,2% del crudo mundial. Sin embargo, América del Norte, que tan solo produce el 5,6% del total, consume el 28,7%, mientras que Asia y las islas del Pacífico son el menor productor, con un 3,3%, y el máximo consumidor, ya que utiliza el 30% (BP2008).

Según estos datos, los pozos petrolíferos se encuentran muy alejados de los puntos de consumo, por lo que el transporte es un aspecto fundamental para la industria del petróleo, ya sea terrestre, a través de oleoductos o marítimo usando grandes petroleros. De hecho, el transporte marítimo de petróleo realizado durante 2002, corresponde al 40% del total de todos los productos transportados por esta vía (Fernández-Álvarez *et al.*, 2006).

Un accidente en cualquiera de estos dos métodos de transporte masivo de crudo puede generar un desastre ecológico de grandes dimensiones.

1.1.6. *El petróleo como contaminante.*

El petróleo es el mayor contaminante de los ambientes marinos a través de residuos líquidos tanto terrestres como fluviales, residuos de refinerías costeras, tráfico marítimo y pesca, así como de grandes vertidos accidentales (Gentili *et al.*, 2006). Se estima que anualmente, las aguas marinas o de estuarios reciben entre 1.700.000 y 8.800.000 toneladas de hidrocarburos procedentes del petróleo, dependiendo de las fuentes (Head and Swannell, 1999).

Los accidentes que provocan vertidos masivos, reciben mucha atención y generalmente generan gran preocupación en la opinión pública, pero por suerte, ocurren en raras ocasiones (Swannell *et al.*, 1996), y aunque representen una cantidad significativa del total de hidrocarburos contaminantes, se producen liberaciones más pequeñas de crudo a los ambientes marinos de forma regular (Head and Swannell, 1999), que globalmente tienen una importancia incluso mayor.

Existe un extenso listado de artículos que detallan los efectos nocivos que el petróleo o alguno de sus componentes o derivados tienen sobre el medio ambiente y los organismos vivos (Gómez Gesteira *et al.*, 2003; Couceiro *et al.*, 2006; Varela *et al.*, 2006; Zuberogoitia *et al.*, 2006; Alonso-Álvarez *et al.*, 2007; Banks *et al.*, 2008; González-Doncel *et al.*, 2008; Lobon *et al.*, 2008; Martin-Skilton *et al.*, 2008; Sanpera *et al.*, 2008; Joly-Turquin *et al.*, 2009), incluso sobre la salud de aquellas personas que colaboran en las tareas de limpieza de los grandes desastres, como los grandes derrames de crudo (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2007).

1.1.6.1. Historial de grandes vertidos accidentales.

En 1967, el gran petrolero *Torrey Canyon* se hunde en la costa sur de Inglaterra, contaminando 180 km de costas inglesas y 80 km de costas francesas, provocando un desastre ecológico sin precedentes. Esto hace que la comunidad científica, de forma dramática, centre sus esfuerzos en combatir el efecto de la contaminación (Atlas, 1981).

En 1978 el *Amoco Cadiz* descarga unas 220.000 toneladas de crudo a lo largo de la bahía de Morlaix en la costa británica (Gómez Gesteira *et al.*, 2003), tras zozobrar debido a un temporal. Años más tarde en 1989, en la bahía Prince William Sound, el hundimiento del petrolero *Exxon Valdez*, libera 37.000 toneladas de hidrocarburos al mar (Swannell *et al.*, 1996).

En 1991 y 1993 se repetirá el desastre. Los petroleros *Haven* y *Braer* se hunden frente a las costas italianas, liberando 140.000 toneladas de crudo el primero y en la costa de las Islas Shetland contaminando con 80.000 toneladas de petróleo el segundo.

También los derrames deliberados pueden tener una considerable tasa de contaminación. Por ejemplo, durante la Guerra del Golfo, en 1991, se vertieron en Kuwait 820.000 toneladas de fuel, lo que amenazó de gravedad el ecosistema de la zona y varias plantas de desalado (Swannell *et al.*, 1996).

En España, sobre todo en el área de A Coruña, se han producido 3 grandes desastres de este tipo. En 1972, la ruptura del casco del petrolero *Urquiola*, produjo un vertido de 100.000 toneladas de crudo procedente de la zona del Golfo, que afectaron a 215 km de costa. Posteriormente el hundimiento del petrolero *Mar Egeo* en 1992, en el exterior del puerto de A Coruña, provocó el derrame de 79.000 toneladas de crudo, que debido a los fuertes vientos contaminó rápidamente 200 km de costas. El tercer gran desastre tuvo lugar el 19 de Noviembre de 2002 (Gómez Gesteira and Dauvin, 2005).

1.1.6.2. El desastre del Prestige.

En Noviembre de 2002, en el Atlántico noroeste, frente a costas gallegas, el petrolero monocasco de 26 años de antigüedad *Prestige*, que transportaba 77.000 toneladas de petróleo, se partió en dos y derramó unas 60.000 toneladas de crudo al mar (Fernández-Álvarez *et al.*, 2006). Unos 800 km de costa fueron afectados (Díez *et al.*, 2005) por la llegada entre Noviembre de 2002 y Mayo de 2003 a tierra de restos del crudo vertido (Fernández-Álvarez *et al.*, 2006). Como consecuencia, murieron miles de aves y otros animales, de diferentes especies (Sanpera *et al.*, 2008).

Este desastre, unido a las implicaciones políticas que llevó consigo el accidente, provocó una movilización masiva en la opinión pública y en la comunidad científica (Díez *et al.*, 2005; Fernández-Álvarez *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2006; Varela *et al.*, 2006; Zuberogitia *et al.*, 2006; Alonso-Álvarez *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2007; Fernández-Varela *et al.*, 2008; González-Doncel *et al.*, 2008; Lobon *et al.*, 2008; Martin-Skilton *et al.*, 2008; Sanpera *et al.*, 2008). Miles de voluntarios que participaron en las tareas de limpieza se expusieron a compuestos potencialmente tóxicos para la salud (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2007).

1.2. Componentes del petróleo.

Los compuestos del petróleo que pueden ser separados mediante cromatografía de adsorción se dividen en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Harayama *et al.*, 1999). Además, no todos los tipos de crudo son iguales, la composición concreta de cada tipo de petróleo varía en función de la combinación de sus condiciones de formación (Fernández-Varela *et al.*, 2008).

1.2.1. Hidrocarburos saturados.

Los hidrocarburos saturados son aquellos que no poseen dobles enlaces (**Figura 1.1**). Se dividen en función de su estructura química en alcanos o parafinas y cicloalcanos o naftalenos. Los alcanos se pueden dividir a su vez en ramificados o no ramificados en función de su estructura química lineal. Están definidos por la fórmula general C_nH_{2n+2} (Harayama *et al.*, 1999).

Los cicloalcanos contienen al menos un anillo de átomos de carbono, aunque el número de anillos es muy variable. Su fórmula general es C_nH_{2n} y es relativamente común la presencia a lo largo de su estructura de sustituyentes del tipo alquilo (Harayama *et al.*, 1999).

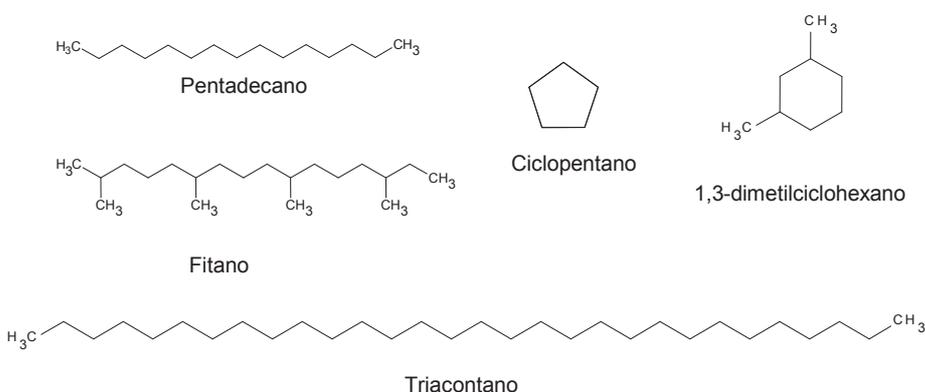


Figura 1.1. Algunos ejemplos de hidrocarburos saturados que forman parte de la mezcla de hidrocarburos del petróleo. Aparecen tanto hidrocarburos lineales como ramificados.

1.2.2. Hidrocarburos aromáticos.

Los hidrocarburos aromáticos son aquellos que poseen uno o más anillos aromáticos, y pueden estar sustituidos, o no, por radicales alquilo (**Figura 1.2**). El petróleo incluye compuestos que poseen de uno a cinco anillos aromáticos. Estos compuestos son más estables que los cicloalcanos, debido a la compartición de sus electrones deslocalizados por los enlaces π (Eweis *et al.*, 1999).

El benceno es el más simple, y junto al tolueno el etilbenceno y los tres xilenos son conocidos como BTEX, un conjunto de compuestos relativamente solubles en agua, y por lo tanto son de los más móviles de la gasolina. Además poseen un potencial contaminante elevado, especialmente el benceno que es cancerígeno (Eweis *et al.*, 1999), y por ello se suelen usar como indicadores de contaminación.

Los hidrocarburos con varios anillos aromáticos o poliaromáticos (PAH), como el antraceno y fenantreno, son producto de diversas operaciones industriales a altas temperaturas como el refinado del petróleo. Son en general poco solubles en agua y poco volátiles, y los incrementos en la masa molecular y el número de anillos, decrece aún más la volatilidad y solubilidad.

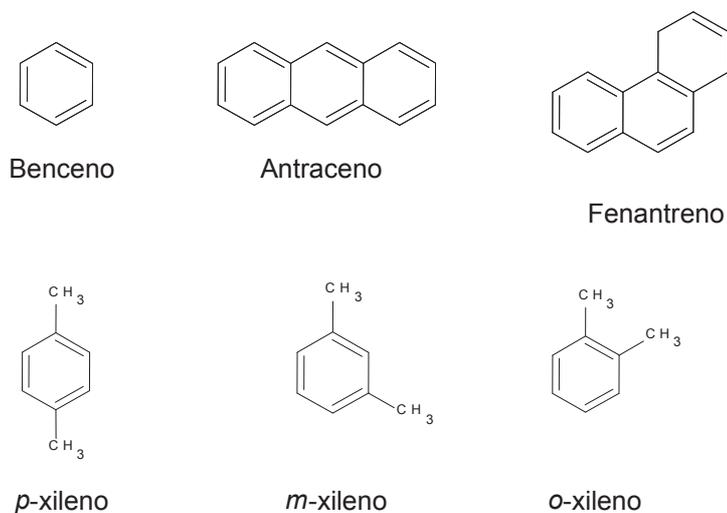


Figura 1.2. Algunos ejemplos de hidrocarburos presentes en la fracción aromática del petróleo.

1.2.3. Resinas y asfaltenos.

La fracción del crudo conocida como resinas y asfaltenos, a diferencia de las anteriores, contiene compuestos polares no hidrocarbonados (Harayama *et al.*, 1999). Son compuestos en general de alto peso molecular que además de carbono e hidrógeno, contienen trazas de oxígeno, nitrógeno y azufre (**Figura 1.3**). Su estructura puede incluir ramificaciones policíclicas aromáticas, incluso en ocasiones forman complejos con metales pesados como níquel y vanadio. Son compuestos recalcitrantes, debido a su insolubilidad y poseen grupos funcionales que les protegen de ataques microbianos, como las estructuras de anillos aromáticos (Eweis *et al.*, 1999).

Para discriminar entre resinas y asfaltenos se utiliza el parámetro de solubilidad en disolventes similares al *n*-heptano. Los asfaltenos son insolubles, mientras que las resinas, son compuestos que se disuelven en este tipo de disolventes (Harayama *et al.*, 1999).

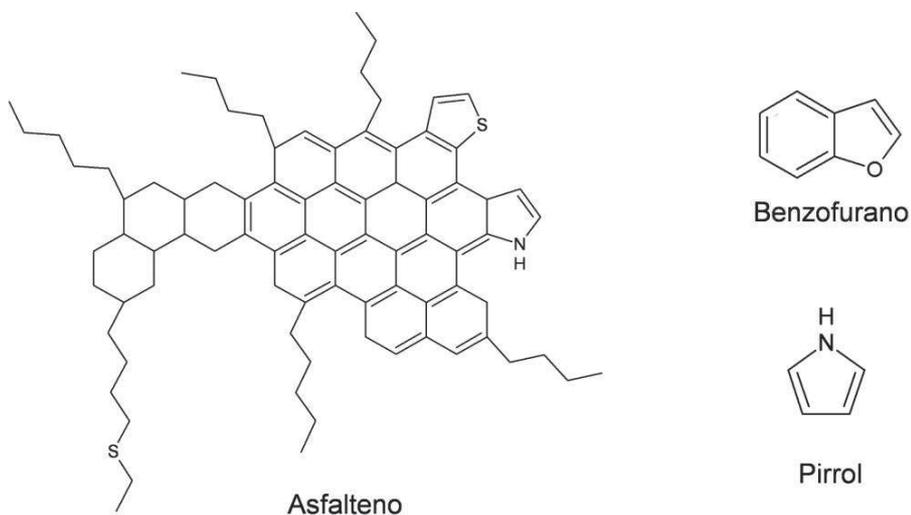


Figura 1.3. Ejemplos de asfaltenos (izquierda) y resinas (derecha).

1.3. Biodegradación de petróleo.

El principal proceso conocido de descontaminación natural es la degradación microbiana (Prince, 1993). Así, se define biodegradación como el proceso por el cual bacterias u otros microorganismos alteran o descomponen moléculas orgánicas en otras sustancias más simples, como ácidos grasos o dióxido de carbono en el caso de los hidrocarburos (United States Congress, 1991).

Es bien conocido que la mayoría de los componentes del crudo de petróleo son biodegradables (Wang *et al.*, 1998). Los hidrocarburos se diferencian en su susceptibilidad a la degradación microbiana, e históricamente se han ordenado en función de biodegradabilidad en el siguiente orden (de mayor a menor): alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > alcanos cíclicos (Leahy and Colwell, 1990).

Los alcanos lineales son considerados los compuestos del crudo de petróleo con mayor susceptibilidad a la biodegradación. Se ha demostrado que existe degradación microbiana incluso por encima de C₄₄ (Haines and Alexander, 1974). En general, los compuestos más susceptibles son los saturados, seguidos de los aromáticos ligeros y por último, los aromáticos de alto peso molecular y los compuestos polares, que muestran tasas muy bajas de degradación (Colwell, 1977; Leahy and Colwell, 1990).

Éste no es un orden universal, ya que algunos autores han demostrado en casos concretos grados de degradación diferentes, por ejemplo, mayor degradación de naftaleno que de hexadecano en sedimentos, o una importante biodegradación de alquiloaromáticos antes de observar degradación de alcanos lineales en algunos sedimentos marinos (Leahy and Colwell, 1990).

Se debe considerar asimismo, que la presencia de alcanos con un número reducido de carbonos, generalmente entre C₅ y C₁₀, a altas concentraciones, inhibe la biodegradación del resto de compuestos, ya que actúan como potentes solventes apolares rompiendo la membrana lipídica de los microorganismos.

Además, el petróleo, posee moléculas con cierta resistencia a la biodegradación, como son los compuestos con níquel o con vanadio, y la concentración de estos varía en función de cómo ha sido generado cada tipo concreto de crudo de petróleo, por ejemplo de la temperatura a la que es generado y expulsado de las rocas (Head *et al.*, 2003).

1.3.1. *Metabolismo de los alcanos.*

La degradación de alcanos llevada a cabo por microorganismos, puede ocurrir a través de rutas monotermiales, subterminales o diterminales (Sharma and Pant, 2000). Generalmente la degradación de alcanos comienza con la activación mediante la oxidación del carbono terminal, obteniendo el correspondiente alcohol primario y que posteriormente es oxidado por una alcohol y aldehído deshidrogenasa (**Figura 1.4**). Los ácidos grasos obtenidos entran en el metabolismo general a través de la β-oxidación. Algunos alcanos de cadena corta y excepcionalmente alcanos de cadena media, pueden ser degradados además, a través de la oxidación del carbono en posición subterminal. El alcohol secundario es oxidado a una cetona, y posteriormente a través de una monooxigenasa de Baeyer-Villiger a un éster. El éster es hidrolizado por una esterasa a un alcohol y un ácido graso. En algunos casos muy concretos, los dos carbonos terminales del alcano son oxidados para obtener ácidos dicarboxílicos (van Beilen *et al.*, 2003).

Dependiendo de la longitud de la cadena del alcano, se requieren sistemas enzimáticos diferentes y especializados para poder llevar a cabo la primera de las oxidaciones del sustrato y comenzar el proceso de biodegradación. Esquematizando, los alcanos entre metano y butano son oxidados por enzimas del tipo metano monooxigenasa, los alcanos entre C₅ y C₁₆ (*n*-pentano a *n*-hexadecano) son degradados por enzimas integrales de membrana, con hierro en forma o hemo, o del tipo citocromo P450, y los alcanos por encima de C₁₇, son oxidados por un sistema enzimático no conocido aún en profundidad (Rojo, 2009). Los rangos de sustratos de estos sistemas enzimáticos se solapan y a menudo incluyen diferentes grupos de alcanos (van Beilen and Funhoff, 2007).

1.4. Microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Los hidrocarburos y sus derivados, incluyendo depósitos fósiles sólidos, líquidos y gaseosos, son compuestos de origen biológico procedentes de la conversión en zonas anóxicas de lípidos y ácidos grasos de animales, plantas y microorganismos, y son ubicuos en la biosfera.

Dado el alto contenido en carbono, útil para la producción de biomasa, y la gran cantidad de energía contenida en estos compuestos muy reducidos, no es de extrañar que muchos microorganismos hayan sido capaces de evolucionar para adquirir la capacidad de utilizar estas moléculas como fuente de carbono y energía (Yakimov *et al.*, 2007).

Puesto que el petróleo es una mezcla compleja de compuestos hidrocarbonados, su degradación se favorece con una población microbiana variada (cultivos mixtos y/o consorcios bacterianos) que expresan una amplia capacidad enzimática (Eweis *et al.*, 1999).

Las investigaciones llevadas a cabo durante la primera mitad del siglo XX, nos han otorgado la actual sólida base de conocimiento acerca de la degradación de hidrocarburos, especialmente de alcanos y se han identificado una gran cantidad de microorganismos capaces de utilizar estos compuestos orgánicos altamente reducidos. Así, Claude E. Zobell, ya en 1946, realizó una revisión acerca de la capacidad de ciertos microorganismos para utilizar hidrocarburos como única fuente de energía en su metabolismo (Zobell, 1946).

En el año 2002 se conocían más de 20 géneros de bacterias marinas capaces de degradar hidrocarburos (Roling *et al.*, 2002), por ejemplo, en el caso de las eubacterias, casi todas aquellas pertenecientes a los sub-filos α -, β -, y γ -Proteobacteria son capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía (van Beilen and Funhoff, 2007). Recientemente, se han identificado cepas capaces de degradar alcanos en *Bacillus*, *Geobacillus* y *Thermus* (Meintanis *et al.*, 2006; van Beilen and Funhoff, 2007).

Entre los organismos eucariotas también existen varios capaces de degradar hidrocarburos, entre ellos, muchos hongos y levaduras y algunas algas y cianobacterias (van Beilen *et al.*, 2003).

Este estudio intensivo ha fomentado que en los últimos años se haya descubierto y reconocido un nuevo grupo, ecofisiológicamente inusual, de bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos. Este nuevo grupo, denominado bacterias hidrocarbonoclastas obligadas (OHCB), está llamado a jugar un papel muy importante en la eliminación de hidrocarburos procedentes del petróleo en aguas marinas contaminadas (Yakimov *et al.*, 2007).

1.4.1. *Bacterias hidrocarbonoclastas obligadas (OHCB)*

Este nuevo grupo se caracteriza principalmente por su capacidad para degradar hidrocarburos, principalmente alcanos, llegando a ser alcanotrofos casi obligados, es decir, solo crecen utilizando alcanos o compuestos muy relacionados como fuente de carbono y energía (van Beilen and Funhoff, 2007). Muchos de estos organismos degradadores son capaces de crecer en una amplia gama de alcanos, debido a que disponen de varias alcano hidroxilasas (van Beilen *et al.*, 2003).

Algunos ejemplos de este grupo son *Alcanivorax borkumensis*, un organismo predominante en ambientes de todo el mundo que han sufrido un gran impacto por contaminación con petróleo, pero que se encuentra por debajo de los límites de detección en ambientes no contaminados (Sabirova *et al.*, 2006) y *Alcanivorax dieselolei* (Liu and Shao, 2005).

Desde la descripción de la primera bacteria OHCB, *A. borkumensis* (Yakimov *et al.*, 1998), se han descrito seis géneros que incluyen OHCB: *Alcanivorax*, *Clycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Thalassolituus* y *Planomicrobium* (Yakimov *et al.*, 2007). Pero estos géneros incluyen además, otras especies degradadoras de hidrocarburos, con una mayor versatilidad para usar sustratos como fuentes de carbono y energía, como por ejemplo *Alcanivorax venustensis* (Fernández-Martínez *et al.*, 2003).

1.4.2. *El género Alcanivorax.*

El término *Alcanivorax*, etimológicamente deriva de los vocablos latinos *alcanum* y *vorax*, y estrictamente significa devorador de alcanos. Actualmente el género está formado por seis especies, *A. borkumensis*, *A. jadensis*, *A. venustensis*, *A. dieselolei*, *A. balearicus* y *A. hongdengensis* (Yakimov *et al.*, 1998; Bruns and Berthe-Corti, 1999; Fernández-Martínez *et al.*, 2003; Liu and Shao, 2005; Rivas *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). Son bacilos Gram-negativos con un grosor aproximado de entre 0,6 y 0,8 μm y una longitud que oscila entre 1,6 y 2,5 μm , aunque son ligeramente más pequeños (1,0-1,5 μm) cuando emplean para crecer hidrocarburos como única fuente de carbono (Yakimov *et al.*, 1998). Generalmente son bacterias no flageladas o con un único flagelo polar y su metabolismo es estrictamente aerobio (Fernández-Martínez *et al.*, 2003).

Son halófilas, requieren para crecer al menos iones Na^+ , aunque algunas especies tienen requerimientos iónicos más complejos, y generalmente son capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de NaCl. Son quimioorganotrofos y son capaces de usar ácidos grasos de cadena corta y alcanos como única fuente de carbono. Además pueden crecer utilizando acetato o piruvato como fuente de carbono (Fernández-Martínez *et al.*, 2003).

La especie *A. venustensis* (**Figura 1.5**) se aisló en el mar Mediterráneo, junto a la localidad de Santa Pola (Alicante). Sus características diferenciales incluyen que es oligotrofa facultativa es decir, es capaz de crecer a concentraciones muy bajas de nutrientes. Además, es capaz de crecer con una concentración de NaCl de hasta el 20% (p/v), pero tiene un requerimiento iónico más complejo. Su intervalo de temperatura de crecimiento se encuentra entre 4 °C y 40 °C (Fernández-Martínez *et al.*, 2003).

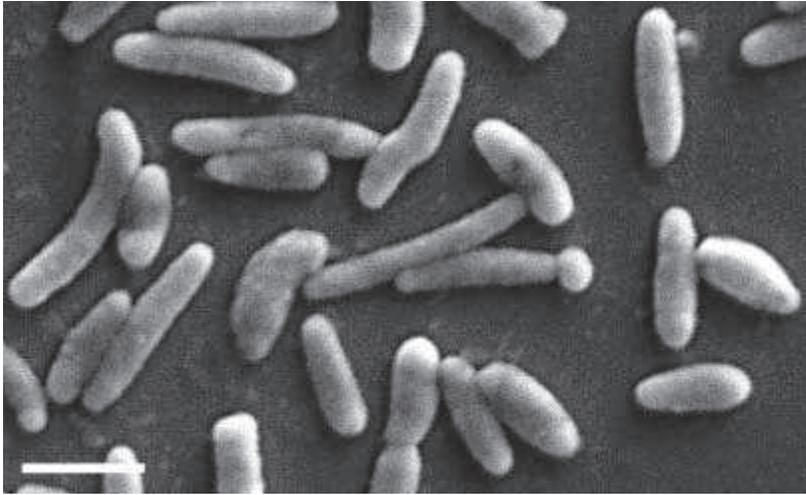


Figura 1.5. Micrografía de *Alcanivorax venustensis*. Barra, 1 μm . Tomado de Fernández-Martínez *et al.* (2003)

1.5. Biorremediación.

En general, el término biorremediación o biorrecuperación se aplica a cualquier sistema o proceso en el que se empleen métodos biológicos para transformar o fijar contaminantes (Eweis *et al.*, 1999). La biorremediación de contaminantes orgánicos incluye los procesos que llevan su transformación en productos menos tóxicos o sin toxicidad. La evolución de los microorganismos ha permitido su uso y degradación pero existe la limitación de que generalmente son procesos lentos (Singh *et al.*, 2008).

En concreto, cuando se refiere a petróleo, la biorremediación es un proceso para acelerar la degradación normal de los contaminantes del crudo, es decir una solución natural para que los contaminantes causen el menor daño ecológico posible (Atlas, 1995a). Dado el alto número de compuestos que forman el petróleo y su alta complejidad estructural, la biodegradación del petróleo produce un incremento en la resistencia a una posterior biodegradación de la mezcla residual. El petróleo crudo no llega nunca a degradarse completamente, y siempre deja algunos residuos complejos. Sin embargo, estos residuos, que contienen principalmente asfaltenos, tienen una toxicidad muy baja y terminan convirtiéndose en residuos inertes sin efecto ecológico (Atlas, 1995b).

Existen varias clasificaciones que dividen la biorremediación en tipos distintos en función de una serie de parámetros.

1.5.1. *Biorremediación según el lugar de aplicación.*

Si atendemos al lugar en el que se aplica el proceso de biorremediación, existen dos modelos diferentes. El primero de ellos, es aquel en el que la acción se lleva a cabo en el mismo lugar, sin apenas modificar el ambiente. Este proceso es conocido como biorremediación *in situ* e incluye como ventajas su bajo coste de transporte, la escasa modificación del entorno y baja generación de residuos. Presenta como inconvenientes, el bajo control de variables y la dilución de biomasa y nutrientes, aunque existen algunos métodos para evitar estos problemas, como la inmovilización de biomasa (Gentili *et al.*, 2006).

Si se excava el suelo o se traslada el material contaminado a un lugar distinto, se dice que la estrategia llevada a cabo es *ex situ*. A pesar de que se controlan las variables, los elevados costes de transporte y de equipamiento hacen que estos métodos sean menos usados que los que se realizan *in situ*. Un ejemplo de esta estrategia son las biopilas, que consiste en apilar gran cantidad de material contaminado en grandes pilas de hasta 4 metros de altura y proporcionar aire y nutrientes a la biomasa autóctona (Jorgensen *et al.*, 2000).

El objetivo de este trabajo son las rocas y acantilados de la costa atlántica por lo que, debido a su gran tamaño y difícil manipulación, así como el gran deterioro que se causaría al entorno, resulta imposible su traslado a plantas de descontaminación. Por tanto se ha optado por la estrategia de biorremediación *in situ*. Para evitar la dispersión y extrema dilución de los nutrientes y microorganismos utilizados, en un medio tan agresivo y extenso como el marino (Swannell *et al.*, 1996), y para poder actuar sobre lugares de difícil acceso, en este trabajo se ha utilizado la inmovilización de la biomasa como alternativa.

1.5.2. *Biorremediación según la acción humana*

Si atendemos a la importancia del aporte humano, podemos decir que existen dos tipos de biorrecuperación. El primer tipo, la atenuación natural, se define como la reducción en toxicidad, masa o movilidad de un contaminante sin intervención humana, y puede deberse a procesos físicos (dilución, adsorción...), químicos (precipitación, evaporación...) o biológicos (biodegradación). El proceso de biodegradación depende en gran medida de la presencia en el medio natural de donadores y aceptores de electrones y de la concentración de nutrientes.

El segundo tipo es la acción humana en los procesos de biorremediación o biorremediación aumentada. Puede llevarse a cabo a través de dos procesos diferentes. La bioestimulación es la mejora o el aumento de los nutrientes, donadores o aceptores de electrones o la modificación de algunas de las condiciones ambientales locales para estimular las poblaciones microbianas. La bioaumentación es la introducción en el medio natural de microorganismos que degraden específicamente el o los compuestos contaminantes, y puede incluir la estimulación *ex situ* de biomasa nativa, la introducción de organismos o de cultivos mixtos *wild-type* no nativos, que degraden o co-metabolizan el contaminante, o la introducción de cepas modificadas genéticamente (Scow and Hicks, 2005).

1.5.3. *Tratamientos de biorremediación in situ de petróleo.*

Se han desarrollado a escala comercial algunos sistemas o productos para el tratamiento de zonas contaminadas con petróleo o algunos de sus derivados. Uno de los casos más conocidos y utilizados es el del PUTIDOIL®, un consorcio bacteriano principalmente de cepas de *Pseudomonas putida* diseñado para su aplicación en suelos contaminados con productos derivados del petróleo.

Éste es un producto liofilizado que se rehidrata con una disolución de nitrato potásico y nitrato amónico en forma de fertilizantes comerciales y se aplica directamente sobre el suelo contaminado.

Actualmente existen algunos otros productos comerciales para el tratamiento de suelos contaminados. Además se han realizado gran cantidad de estudios sobre biorremediación en zonas marinas, sobre todo en bioaumentación de las zonas contaminadas (Radwan *et al.*, 2002; Scow and Hicks, 2005; Brakstad and Bonaunet, 2006; Gentili *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2006). Sin embargo no se comercializan a gran escala aún productos para la biorremediación *in situ* de petróleo o sus derivados en medio intermareal o en las zonas rocosas de los acantilados.

Se han descrito en la bibliografía algunos casos del uso de células inmovilizadas para la biorremediación de petróleo. Así, se han inmovilizado microorganismos degradadores de hidrocarburos en espuma de poliuretano (Quek *et al.*, 2006), en quitina y quitosano (Gentili *et al.*, 2006) y en alginato cálcico (Rahman *et al.*, 2006).

1.6. Inmovilización de biomasa microbiana.

La inmovilización de células viables se ha definido como la localización o el confinamiento físico de células intactas en una región concreta que incluye el mantenimiento de las actividades enzimáticas deseadas (Karel *et al.*, 1985). A menudo la inmovilización de biomasa imita los procesos que ocurren en la naturaleza cuando crecen sobre superficies o dentro de estructuras naturales (Kourkoutas *et al.*, 2004).

Un buen número de procesos biotecnológicos se ven favorecidos usando biomasa inmovilizada, y por ello, se han desarrollado gran número de tecnologías y métodos de inmovilización de células vivas desde su aparición a principios de los 80 (Junter and Jouenne, 2004). Existen gran variedad de aplicaciones que emplean células inmovilizadas en soportes o matrices sólidas. Algunas de ellas se resumen en la **Tabla 1.1:**

Tabla 1.1. Aplicaciones en las que se emplean células enteras inmovilizadas. (Junter and Jouenne, 2004).

<u>Biosíntesis, bioconversiones</u>	
Actividades enzimáticas	α -amilasa, celulasa, enzimas quitinolíticos, L-glutaminasa, inulasa, lipasas, penicilina V acilasa, peroxidadas, polimetilgalacturonasas, proteasas ácidas y básicas, ribonucleasa, xilasa...
Antibióticos	Ampicilina, candidina, cefalosporina, ácido clavulínico, ciclosporina A, penicilina G, rifamicina B...
Esteroides	Androstenediona, hidrocortisona, prednisolona, progesterona
Aminoácidos	Alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, fenilalanina, serina, triptófano
Ácidos orgánicos	Acético, cítrico, fumárico, glucónico, láctico, málico, ácidos propiónicos
Alcoholes	Butanol, etanol, sorbitol, xilitol
Polisacáridos	Aginato, dextrano, levano, exopolisacáridos sulfatados
Otros	Pigmentos, vitaminas, saborizantes y aromatizantes
<u>Medio ambiente</u>	
Tratamiento de aguas	Eliminación de carbono, nitrógeno, metales pesados, biodegradación de contaminantes (fenoles y compuestos fenólicos, policíclicos aromáticos, cianuro, surfactantes, hidrocarburos...)
Biofertilización	Inoculación de suelos con organismo promotores del crecimiento de plantas
Biorremediación	Degradación de contaminantes en suelos, acuíferos y ambientes marinos
Combustibles	Producción de hidrógeno y metano, etanol, células de biocombustibles.
<u>Procesado de alimentos</u>	
Bebidas alcohólicas	Elaboración de cerveza, vinificación, fermentación de sidra y kéfir, generación de bioflavores
Productos lácteos	Inóculos continuos de la leche (iniciadores del ácido láctico), hidrólisis de lactosa en el suero de la leche.

1.6.1. *Ventajas de las células inmovilizadas sobre las libres.*

Existen numerosas ventajas derivadas del uso de células enteras y viables inmovilizadas tanto en procesos industriales como en procesos de biorremediación, ya sea comparándolo con el uso de células libres o con el uso de enzimas aislados e inmovilizados. Algunas de ellas se muestran en la **Tabla 1.2**:

Tabla 1.2. Ventajas de la inmovilización de células viables frente a la inmovilización de enzimas o a las células libres (Junter and Jouenne, 2004; Kourkoutas *et al.*, 2004).

Frente a enzimas inmovilizados

- No es necesario un proceso de purificación o extracción del enzima o conjunto de enzimas necesario, que a menudo lleva consigo un costo económico, y una pérdida de actividad y estabilidad enzimática.
- Puesto que las células viables pueden continuar creciendo y aumentando la densidad celular, la actividad puede verse aumentada.
- La actividad enzimática es más estable con el tiempo debido a la protección ejercida por la célula.

Frente a células libres

- Prolongación de la actividad catalítica. El soporte actúa como agente protector frente a los efectos físico-químicos del pH, temperatura, solventes o contaminantes.
 - Alta densidad celular. La inmovilización evita la dispersión y concentra los nutrientes, mejorando la actividad biológica y acortando los tiempos de reacción.
 - Facilita procesos continuos.
 - Posibilita procesos inhibidos por altas concentraciones de sustrato.
 - Minimiza los riesgos de contaminación debido a la alta densidad celular.
 - Facilita la recogida y procesado de los productos.
 - Permite reutilizar la biomasa en procesos industriales.
-

En el caso concreto de la biorremediación, las zonas naturales en las que se introducen microorganismos suelen resultar ambientes hostiles para los mismos, por lo que la estrategia de la introducción del inóculo inmovilizado en una matriz sólida resulta muy atractiva para solventar el problema (van Veen *et al.*, 1997). Además en el medio marino se producen procesos de extrema dilución de la biomasa y de los nutrientes, que son subsanables mediante la inmovilización de los mismos (Swannell *et al.*, 1996).

1.6.2. *Tipos de inmovilización celular.*

Podemos definir las diferentes técnicas de inmovilización de biomasa viable en 4 categorías en función de los mecanismos físicos empleados: unión o adsorción a la superficie de un soporte sólido, atrapamiento en matriz porosa, agregación celular y contención de biomasa entre barreras físicas (**Figura 1.6**).

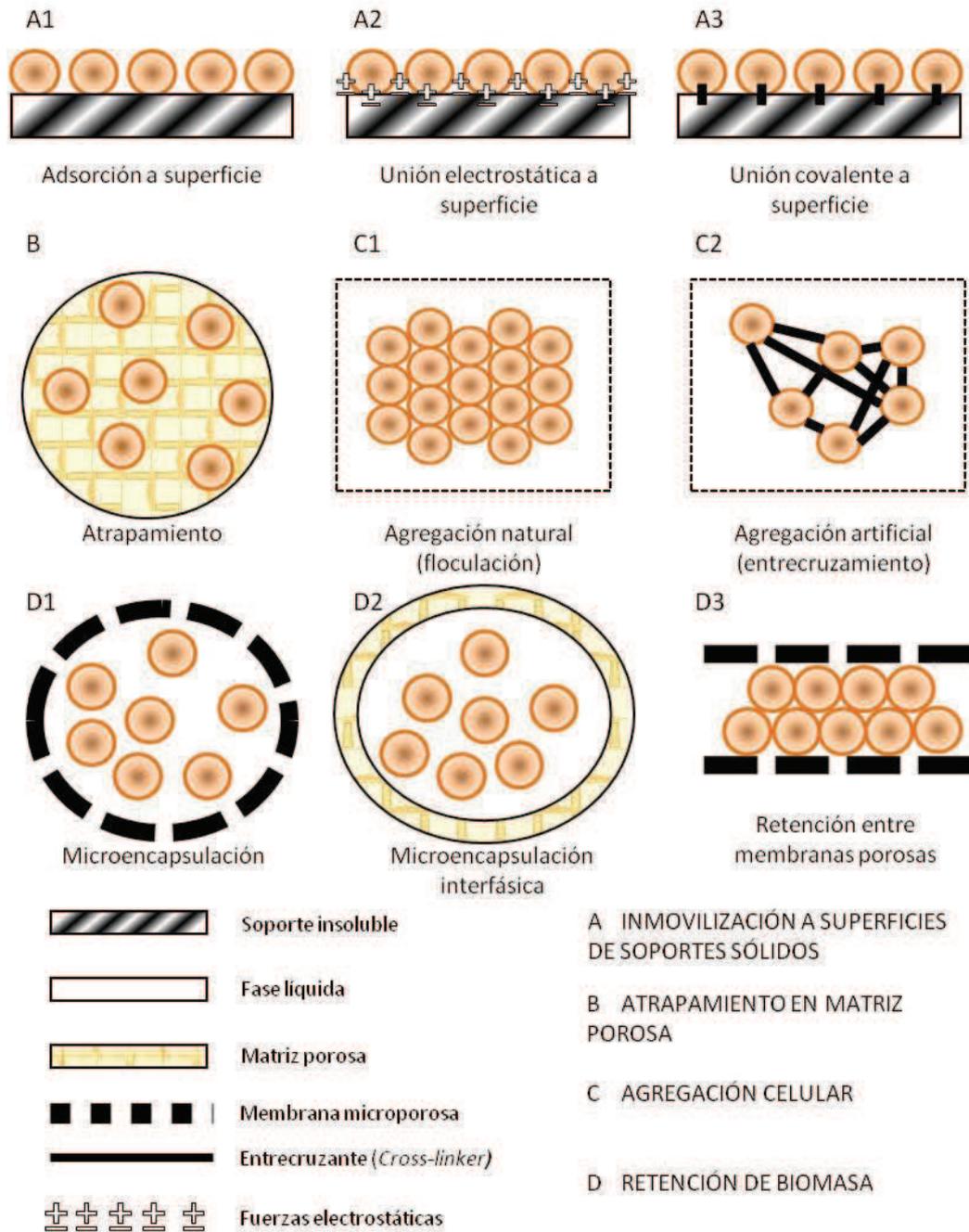


Figura 1.6. Representación esquemática de los principales tipos de inmovilización de biomasa (Kourkoutas *et al.*, 2004).

1.6.2.1. Inmovilización a superficies de soportes sólidos.

Se lleva a cabo a través de la adsorción física debido a fuerzas electroestáticas o unión covalente entre la biomasa y el soporte sólido. Su grosor varía entre una única capa de células y aproximadamente 1 mm. Es muy conocida por la facilidad con la que se puede revertir la inmovilización, y no existen barreras físicas entre las células y el solvente. Algunos ejemplos de estos soportes son materiales de tipo celulósico (DEAE-celulosa, madera o serrín) o algunos materiales inorgánicos (porcelana o cristal poroso). Se pueden usar además activadores para mejorar la adsorción a superficies (Kourkoutas *et al.*, 2004).

1.6.2.2. Atrapamiento en matriz porosa.

En este tipo de inmovilización, existen dos métodos principales. En uno de ellos, se utiliza la matriz preformada y las células penetran en el soporte hasta que otras células o la propia matriz impidan seguir avanzando en el interior de soporte. En el otro método la matriz se forma *in situ*, en torno al cultivo celular. Ambos métodos se basan en la inclusión de células en una matriz rígida y porosa, que minimiza la liberación de biomasa, pero que permite la transferencia de materia de nutrientes y metabolitos.

El crecimiento celular dentro de la matriz depende en principio de las limitaciones impuestas por el propio soporte y del impedimento estérico derivado de la acumulación de biomasa. Es posible la formación de patrones poblacionales diferentes en función de si las células se encuentran en el interior o en la superficie de la matriz (Freeman and Lilly, 1998). Uno de los problemas de este tipo de inmovilización es la posibilidad de crecimiento de la biomasa más cercana a la superficie y su liberación al medio (Kourkoutas *et al.*, 2004).

1.6.2.3. Agregación celular.

Se define la floculación como el fenómeno por el cual las células se adhieren rápidamente formando grupos y sedimentos en el medio en el que se encuentran suspendidas (Jin and Alex Speers, 1998). Los flóculos que se producen son de gran tamaño, lo que permite que sea una técnica de inmovilización utilizada en el uso de biomasa para reactores. Se usa principalmente en mohos, hongos y células vegetales (Kourkoutas *et al.*, 2004).

Se pueden usar entrecruzantes artificiales para mejorar la agregación celular o para inducirla en cultivos en los que no se produce de forma natural. Tiene importancia sobre todo en la industria alimentaria, concretamente en la fermentación de la cerveza. Los factores que influyen en la agregación son principalmente la composición de la pared celular, el pH, el oxígeno disuelto y la composición del medio (Kourkoutas *et al.*, 2004).

1.6.2.4. Retención de biomasa.

Los métodos más utilizados para inmovilizar biomasa mediante la retención mecánica son encapsulación entre filtros microporosos, atrapamiento en microcápsulas e inmovilización de biomasa en la interfase de dos líquidos inmiscibles. Es interesante cuando las células la producen en estado libre y cuando se requiere una transferencia mínima de materia. La mayor desventaja de este tipo de inmovilización es la baja transferencia de materia, lo que dificulta la obtención del producto y el *biofouling* debido al crecimiento de la biomasa entre las membranas.

1.6.3. *Requisitos del soporte para inmovilización.*

Un soporte óptimo para la biorremediación no debe ser tóxico para la biomasa ni para el medio ambiente, y debe ser estable en el tiempo que la biomasa mantenga su actividad degradadora y tener, además, un bajo coste de producción (Leenen *et al.*, 1996). También es importante que una vez que haya completado su acción, este soporte pueda ser eliminado con facilidad, es decir, sea biodegradable (Pometto *et al.*, 1998).

Además el proceso de inmovilización no debe tener efectos adversos sobre la actividad catalítica de la biomasa, y llevarse a cabo de manera sencilla y con productos que posibiliten un escalado. Es necesario asimismo, que el soporte permita el paso a través de los poros de los sustratos y nutrientes, así como de los gases necesarios para que la biomasa lleve a cabo su actividad biológica (Kourkoutas *et al.*, 2004).

1.6.4. *Inmovilización en hidrogeles*

Si bien no existe una definición concreta y precisa de hidrogel, generalmente se les define como materiales poliméricos obtenidos por entrecruzamiento formando una red tridimensional, cuya propiedad principal es que se hinchan al contacto con el agua, formando materiales blandos y de alta elasticidad. Además retienen una cantidad importante de agua, hinchándose, sin llegar a disolverse. Pueden ser tanto de origen natural como de origen sintético. Los polisacáridos como la goma xantano o el quitosano son unos de los principales formadores de hidrogeles (d'Ayala *et al.*, 2008).

Los hidrogeles han sido ampliamente utilizados como soporte para la inmovilización de enzimas y células (Chia-Hong *et al.*, 1996; Chellat *et al.*, 2000; Magnin *et al.*, 2001; Magnin *et al.*, 2003; Farris *et al.*, 2009). Sus principales ventajas son una elevada permeabilidad a determinados sustratos, productos y nutrientes, una excelente estabilidad química y compatibilidad biológica, así como la capacidad de intercambio iónico controlable y una importante resistencia al hinchamiento y encogimiento en soluciones electrolíticas. Además son sencillos de preparar y de usar, y pueden ser usados con una gran variedad de biocatalizadores, desde enzimas hasta células (Salter and Kell, 1992).

2. OBJETIVOS

Al comienzo de este trabajo existía un conocimiento amplio sobre la biodegradación bacteriana del petróleo y sus derivados. Además se conocían gran cantidad de cepas susceptibles de ser utilizadas como microorganismos degradadores de hidrocarburos en procesos de biorremediación. Se habían desarrollado tecnologías que permiten la inmovilización celular. Sin embargo, los ensayos de biorremediación de petróleo o sus derivados utilizando células inmovilizadas no habían mostrado aún los resultados esperados.

Además, son escasos los trabajos publicados sobre tratamientos de biorremediación *in situ* en zonas rocosas intermareales. Así, las zonas de acantilados son susceptibles de contaminación por derivados del petróleo en casos de grandes vertidos accidentales y no existe ninguna tecnología eficaz para llevar a cabo procesos de limpieza y descontaminación.

Por ello, en este trabajo se plantearon como objetivos principales los siguientes:

- Seleccionar microorganismos capaces de degradar hidrocarburos en condiciones de baja concentración de nutrientes.
- Sintetizar un soporte adhesivo, biodegradable y biocompatible para inmovilizar los microorganismos degradadores de hidrocarburos seleccionados.
- Desarrollar un producto biotecnológico de utilidad para la biorremediación *in situ* de hidrocarburos en zonas rocosas.
- Caracterizar la capacidad del producto para su aplicación en diferentes ecosistemas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y productos

Los reactivos y productos empleados en este trabajo se detallan en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Reactivos y productos químicos empleados. Se indican tanto el proveedor como la ciudad y el país de origen. Todos los reactivos químicos eran de calidad analítica o equivalente.

Casa comercial	Productos
Ciudad, país	
Bio-Rad	Acrilamida
Hercules, PA, EEUU	BioLyte®
	Reactivo de Bradford
	Tiras de Inmovilinas ReadyStrips™
Quimivita	Ácido acético
Barcelona, España	Hidróxido amónico
	Metanol

Materiales y métodos

Merck	Acetato amónico
Darmstadt, Alemania	Acetato sódico
	Ácido tricloroacético
	Agar
	ASB-14
	Carbonato sódico
	Cloruro amónico
	Cloruro cálcico
	Cloruro magnésico
	Cloruro sódico
	<i>n</i> -Hexano
	N,N,N',N'-Tetrametietilendiamina (TEMED)
	Nitrato sódico
	Nitrito sódico
	Persulfato amónico (APS)
	Ractivo de Folin
	Sacarosa

Panreac	Agarosa
Barcelona, España	Cloruro potásico
	Fosfato dipotásico
	Fosfato monopotásico
	Fosfato sódico
	Fructosa
	Glicerol
	Hidróxido sódico
	Sulfato magnésico

Pronadisa Madrid, España	Extracto de levadura Triptona
Roche Diagnostics Mannheim, Alemania	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Lisozima NADH
Sigma St. Louis, MO, EEUU	Aceite mineral Azul de bromofenol Desoxicolato sódico (DOC) Ditiotreitol (DTT) <i>n</i> -Dodecano Dodecilsulfato sódico (SDS) Glicina Iodoacetamina Seroalbúmina bovina (BSA) Sulfato ferroso Tiourea Urea

El quitosano de grado agrícola fue proporcionado por IDEBIO S.L. (Salamanca, España). Este quitosano tiene un grado de desacetilación del 78% y una pureza del 99%. La goma xantano de grado alimentario fue proporcionada por DEGUSSA TEXTURANT SYSTEMS (Barcelona, España). Los fertilizantes de nitrato amónico y fosfato amónico fueron suministrados por Fertilizantes Químicos S.A., FERQUISA (Madrid, España).

3.2. Microorganismos y condiciones de cultivo

En este trabajo se han empleado cuatro cepas bacterianas diferentes, hasta seleccionar la más adecuada a los trabajos que se presentan. Las cepas utilizadas son *Pseudoalteromonas* sp. CHAP-2, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, y dos cepas diferentes de *Alcanivorax venustensis*. *Pseudoalteromonas* sp. CHAP-2 fue cedida por el Dr. Fernando Rojo, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, España. *M. hydrocarbonoclasticus*, y ambas cepas de *A. venustensis* fueron adquiridas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) donde se encuentran depositadas como CECT 5005, CECT 5388 y CECT 5389, respectivamente.

3.2.1. Crecimiento en medio líquido

Las bacterias se cultivaron a partir de biomasa congelada a -81 °C utilizando glicerol al 50% (p/v) como criopreservante. Se inocularon cultivos de 100 ml de medio marino químicamente definido SM1 (Passeri *et al.*, 1992) modificado, suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía y se cultivaron durante 14 días a 24 °C y 150 rpm en un incubador orbital New Brunswick G-25 (Edison, New Jersey, EEUU).

El cultivo se utilizó para inocular hasta 1 l de medio marino, suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano. Tras 4 días de crecimiento, la biomasa se cosechó por centrifugación a 12.000 x g, 4 °C, durante 15 minutos en una centrífuga Beckman-Coulter J-20 XPI con un rotor JLA 9.1000 (Fullerton, California, EEUU). Esta biomasa se utilizó para inocular todos los cultivos posteriores utilizados tanto para ensayos de biodegradación como para inmovilizar la biomasa.

Para acortar los tiempos de cultivo de biomasa para realizar inmobilizaciones se procedió a inocular cultivos de 1 l de medio marino (Passeri *et al.*, 1992) suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano con cultivos previamente crecidos durante 4 días. La biomasa crecida en cada tanda de cultivos se usaba para inmobilizar en el soporte y para inocular nuevos cultivos.

Para el crecimiento de biomasa cultivada con aceite mineral, se utilizó biomasa previamente crecida utilizando *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía. Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio marino (Passeri *et al.*, 1992) suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano con biomasa congelada a -81 °C utilizando glicerol al 50% (p/v) como criopreservante. Los cultivos crecieron durante 14 días a 24 °C y a 150 rpm en un incubador orbital New Brunswick G-25 (Edison, New Jersey, EEUU). Tras 14 días de crecimiento la biomasa se cosechó y lavó por centrifugación a 8.000 x g, 4 °C durante 20 minutos en una centrífuga Kubota 7820 con un rotor RA-6 (Kubota, Tokio, Japón). La biomasa obtenida se utilizó para inocular cultivos de 1 l de medio marino (Passeri *et al.*, 1992) suplementado con 1% (v/v) de aceite mineral hasta 0,2 UA₆₀₀.

Para evaluar el crecimiento de la biomasa en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), el medio completo fue suplementado hasta 25 g/l de NaCl. Se cosecharon por centrifugación cultivos crecidos durante 14 días en medio SM1 suplementado con 1% de *n*-dodecano crecidos a partir de biomasa previamente congelada a -81 °C. Se inocularon cultivos de 100 ml o 1 l conteniendo medio LB hasta 0,2 UA₆₀₀.

Además se ha ensayado el crecimiento de la biomasa utilizando hidrocarburos como única fuente de carbono y como nutrientes inorgánicos dos fertilizantes comerciales en agua de mar. Los fertilizantes contienen fosfato mono amónico y nitrato amónico. Estos fertilizantes se usan comúnmente en la aplicación de productos comerciales liofilizados para biorremediación, como el PUTIDOIL®.

El crecimiento de biomasa se evaluó de forma indirecta a través de la turbidez del cultivo medido a 600 nm (Gauthier *et al.*, 1992). La concentración de proteína total se determinó, cuando fue necesario, según el método Bradford (1976) empleando el reactivo comercial de Bio-Rad (Hercules, California, EEUU) o según Lowry (1951).

3.2.2. *Crecimiento en placa*

Para el crecimiento de la biomasa en placa se utilizaron placas de medio LB modificado con un 2% (p/v) de NaCl y agar. Se utilizaron 100 µl de cultivo líquido para inocular cada placa y se extendieron sobre la placa utilizando un asa de siembra en L. El crecimiento de biomasa en placa se ha utilizado para realizar contajes de unidades formadoras de colonias (UFC).

3.2.3. *Crecimiento en fermentador*

Para obtener una cantidad significativa de biomasa liofilizada de *A. venustensis* (CECT 5388), se contrataron los servicios de la compañía Biopolis (Valencia, España). Se utilizó biomasa previamente crecida en matraces de 250 ml con 100 ml de medio marino con 1% (v/v) de *n*-dodecano desde colonias aisladas en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) para inocular a través de escalados sucesivos un fermentador de 250 l. La mitad de la biomasa obtenida se liofilizó utilizando sacarosa al 5% (p/v) como agente criopreservante y la otra mitad se liofilizó utilizando peptona de soja al 10% (p/v).

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. *Determinación de proteína*

En la mayoría de los casos, la concentración de proteína total se determinó según Bradford (Bradford, 1976), empleando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón de proteína. A 800 µl de muestra, o de muestra diluida con agua MilliQ®, se añadieron 200 µl de reactivo de Bradford. Tras 30 min de incubación, se midió la absorbancia a 595 nm.

En las muestras de la proteína de fracción soluble para análisis electroforético, la proteína total se determinó según el método de Lowry (1951) modificado por Peterson (1983), usando BSA como proteína patrón. A 50 µl de muestra se le añadieron 100 µl de desoxicolato sódico al 0,15% (p/v) y tras 10 minutos, 100 µl de ácido tricloroacético al 72% (p/v). La muestra se centrifugó a 13.000 ×g y se retiró el sobrenadante, añadiéndose después, 700 µl de Reactivo A (**Tabla 3.2**). Tras incubar durante 10 minutos, se añadieron 350 µl de Reactivo B, y tras 30 minutos se midió la absorbancia a 750 nm.

Tabla 3.2. Composición de los reactivos A y B para la determinación de proteína total según el método de Lowry, modificado por Peterson. Tanto el Reactivo A como el B se preparan inmediatamente antes de su uso, mientras que el tampón CTC se almacenó a 4 °C.

Reactivo	Composición	
A	Tampón CTC	25,0% (v/v)
	SDS al 5% (p/v)	50,0% (v/v)
	NaOH 0,8 M	25,0% (v/v)
B	Reactivo de Folin	16,3% (v/v)
	Agua destilada	83,3% (v/v)
CTC	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,1% (p/v)
	Na ₂ CO ₃	10,0% (p/v)
	Tartrato de sodio y potasio	0,2% (p/v)

En las muestras de membranas plasmáticas purificadas, la proteína total se determinó mediante el kit de ensayo de proteína BCA™ (Thermo Scientific, Rockford, EEUU), usando BSA como proteína patrón. Las muestras se precipitaron según Sabirova (2006) y se resuspendieron en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, con 3 M de urea y 4% (p/v) de CHAPS. A 50 µl de muestra se le añadió 1 ml de mezcla 50:1 (v/v) de reactivo A y B. Las muestras se agitaron y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Se midió la absorbancia a 562 nm.

3.3.2. Métodos cromatográficos

3.3.2.1. Determinación de *n*-dodecano mediante GLC

La determinación de *n*-dodecano se realizó mediante GLC. Se empleó un equipo Shimadzu (Kioto, Japón) con una columna de 2 m de longitud. Como fase estacionaria se empleó DEGS, mientras que como fase móvil se utilizó N₂. El volumen de muestra inyectada fue de 5 µl, y para la inyección de las mismas, se usó una microjeringa. Las muestras habían sido extraídas con 10 ml de *n*-hexano, y para que el cálculo fuera independiente del volumen de muestra, la concentración de *n*-dodecano se calculó a través de la razón entre el área de la señal producida en el cromatograma por el *n*-dodecano y la producida por el disolvente (**Figura 3.1**).

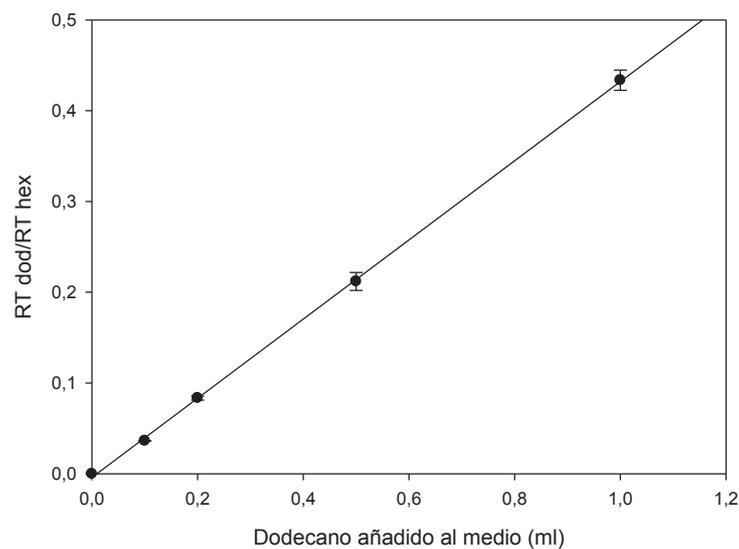


Figura 3.1. Recta patrón para la cuantificación de *n*-dodecano en cultivos líquidos mediante GLC. Se añadieron diferentes volúmenes de *n*-dodecano a matraces con 100 ml de medio SM1 sin biomasa. El *n*-dodecano se extrajo con 10 ml de *n*-hexano y se analizó por GLC. Se muestra la razón de la señal producido por el *n*-dodecano entre la producida por el disolvente, *n*-hexano.

3.3.2.2. Determinación de aceite mineral mediante GLC/MS

La determinación de aceite mineral se llevó a cabo mediante GLC/MS (**Figura 3.2**). Se utilizó un sistema cromatográfico Agilent (Santa Clara, CA, Estados Unidos). Para la separación de compuestos se usó una columna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , con He como gas de arrastre, a un flujo de 1,5 ml/min. El inyector se termostató a 270 $^{\circ}\text{C}$ y la temperatura inicial de la columna era de 50 $^{\circ}\text{C}$. Se aumentó a 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 100 $^{\circ}\text{C}$ y a 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 290 $^{\circ}\text{C}$, permaneciendo a esa temperatura durante 15 min. El volumen de inyección fue de 1 μl utilizando un inyector automático. La inyección se realizó en modo splitless y se realizó una selección del ión 85, propio de alcanos lineales (Smith, 2004). Para cuantificar el aceite mineral, se integró el área bajo la curva del cromatograma entre 12 y 25 minutos.

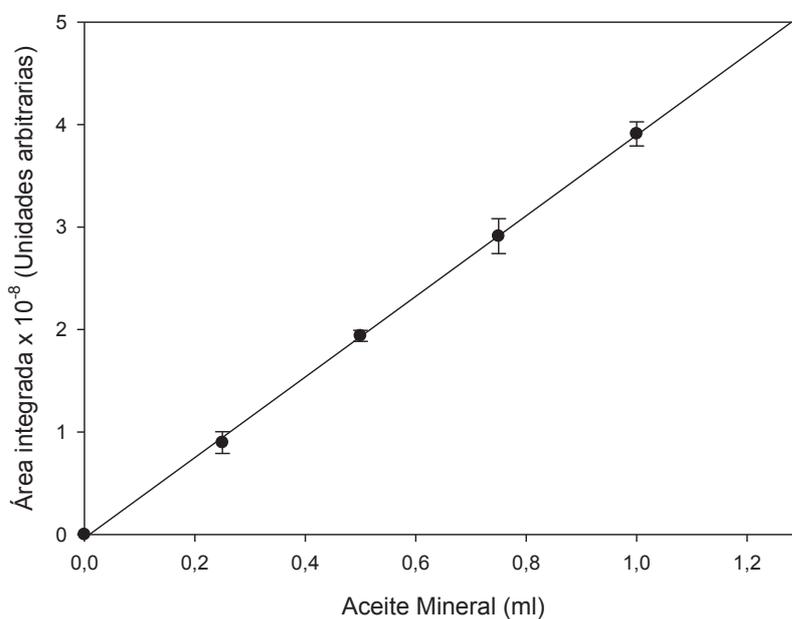


Figura 3.2. Recta patrón de la cuantificación de aceite mineral mediante GS/MS. El área corresponde a la integral de la curva entre 12 y 25 minutos.

3.4. Obtención de extractos celulares.

3.4.1. *Obtención de extracto celular soluble.*

Para las células cultivadas con acetato sódico y fructosa como fuente de carbono, se partió de dos cultivos de 100 ml que se cosecharon por centrifugación a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Kubota 7820 (Kubota, Tokio, Japón). La biomasa se lavó dos veces por centrifugación, y se resuspendió en 50 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8, con lisozima (0,3 mg/ml) y 5 mM de EDTA y, finalmente, se incubó 16 h a 4 °C.

La biomasa se recuperó tras el tratamiento con lisozima mediante centrifugación y se resuspendió en 10 ml de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8. Para la ruptura celular se utilizó una prensa de French SLM-Aminco (Rochester, New York, Estados Unidos) a 1.800 psi. La biomasa cultivada con acetato se sometió a 2 ciclos de ruptura mientras que la biomasa cultivada en *n*-dodecano y liofilizada se sometió a 5 ciclos (**Figura 3.3**). Para eliminar los restos celulares y la biomasa no lisada, el homogenizado celular se centrifugó durante 10 min a 11.000 ×g en una centrífuga Sigma 1-15PK (Osterode am Harz, Alemania). El sobrenadante se ultracentrifugó nuevamente durante 1 h a 30.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman-Coulter Optima L100K (Fullerton, California, EEUU) con un rotor basculante SW 60Ti, para obtener del sobrenadante la fracción de proteína soluble.

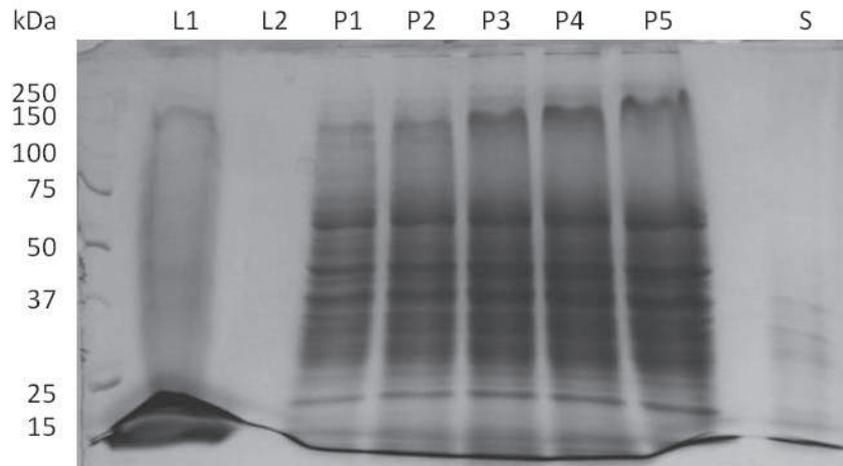


Figura 3.3. Análisis por SDS-PAGE del proceso de ruptura celular, que incluye los lavados de la muestra (L), ciclos de prensa de French (P) y de ultrasonación (S).

3.4.2. *Aislamiento y purificación de membranas plasmáticas.*

Para obtener el extracto celular para el aislamiento y purificación de membranas plasmáticas de *A. venustensis*, se cosechó un cultivo de 1 litro de volumen total por centrifugación a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Kubota 7820 (Kubota, Tokio, Japón). Se recuperó el sedimento celular y se resuspendió en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8. Se repitió dos veces el proceso de centrifugación para finalmente resuspender la biomasa en 15 ml del mismo tampón.

Se incubó la muestra a 37 °C en baño de agua durante 3 horas y posteriormente se sonicó en un sonicador Branson Sonifier (Danbury, CT, EEUU), al 50% de potencia, durante 8 minutos en ciclos de 30 s ON, 30 s OFF (**Figura 3.4**). Para eliminar la biomasa no lisada, el homogenizado celular se centrifugó durante 10 min a 4.000 ×g en una centrífuga 1-15PK (Osterode am Harz, Alemania).

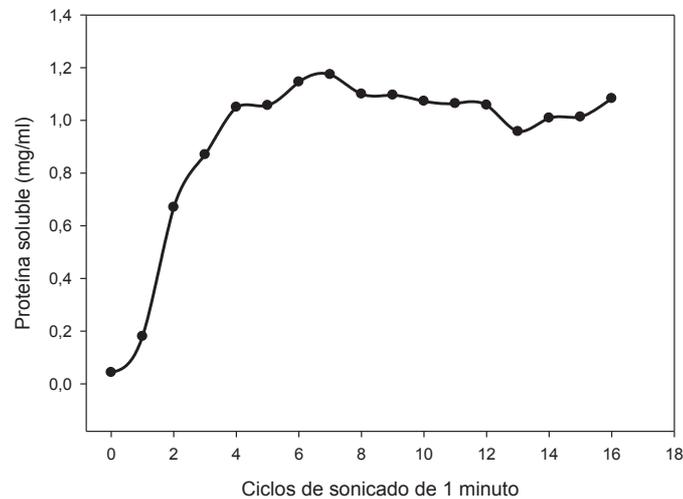


Figura 3.4. Concentración de proteína soluble medida tras cada ciclo de sonicación de 1 minuto. Se utilizó un sonicador Branson Sonifier al 50% de potencia en ciclos de 30 s ON, 30 s OFF. Se observó que a partir de 8 minutos de sonicación se alcanza el máximo de proteína soluble libre, por lo que se concluyó que se alcanza la mayor cantidad de células rotas para este método.

La purificación de membranas plasmáticas de *A. venustensis* se llevó a cabo según el método descrito por Niederweis (1995). El sedimento obtenido tras ultracentrifugar el homogenizado celular a 30.000 rpm se resuspendió en tampón Tris-HCl, 10 mM, pH 8, y se ultracentrifugó a 30.000 rpm durante 1 hora a 4 °C en una ultracentrífuga Optima L100K (Fullerton, California, EEUU) con un rotor basculante SW 60Ti. El sedimento se resuspendió en tampón y para asegurar la eliminación de toda la fracción soluble la biomasa se lavó dos veces más. Finalmente el sedimento se resuspendió en unos 6 ml de tampón.

Se aplicó 1 ml de esta muestra sobre un gradiente discontinuo de sacarosa preparado en tubos de ultracentrífuga de 4 ml de volumen, que contenían 900 μ l de sacarosa al 70% (p/v), 1,2 ml de sacarosa al 40% (p/v) y 900 μ l de sacarosa al 30% (p/v). Posteriormente, se formó el gradiente lineal al centrifugar durante 16 h a 4 °C a 30.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman-Coulter Optima L100K (Fullerton, California, EEUU) con un rotor basculante SW 60Ti.

Se recogieron 6 fracciones a lo largo del gradiente desde la parte superior. Se ensayó la actividad de la NADH oxidasa de cada una de las fracciones, para determinar cuál de ella estaba enriquecida en membranas plasmáticas (**Figura 3.5**).

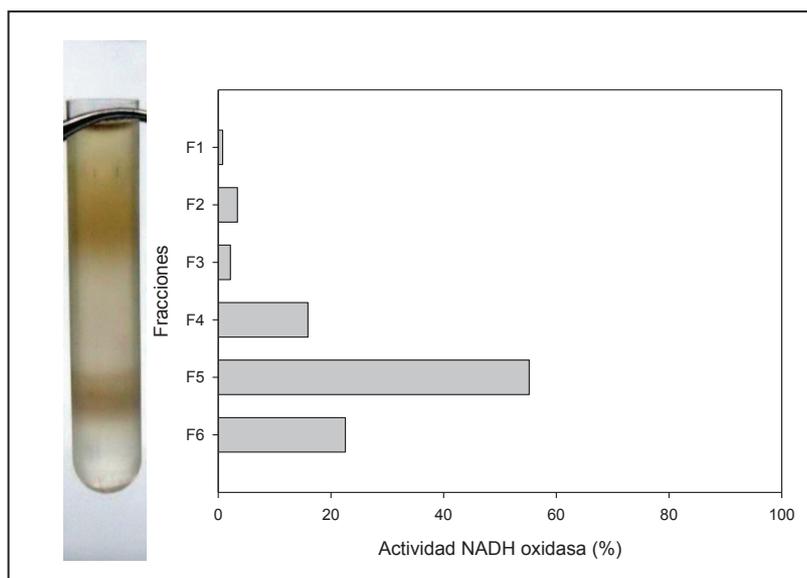


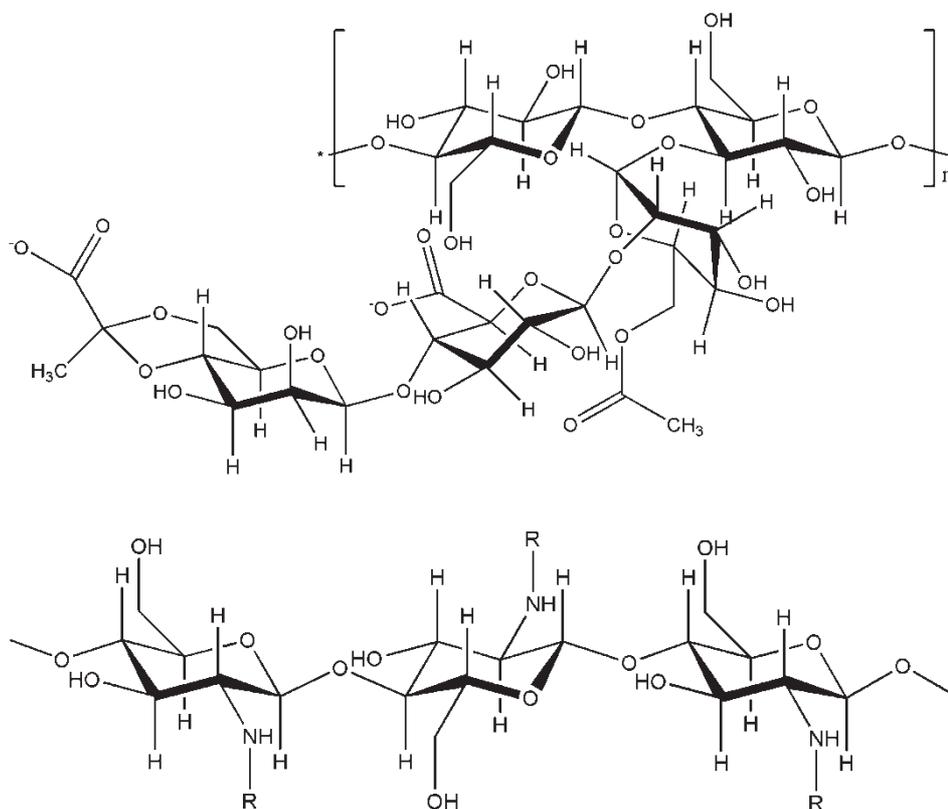
Figura 3.5. Presencia de actividad NADH oxidasa medida en las fracciones extraídas del gradiente de sacarosa. La actividad se expresa en porcentaje de la total detectada. Se selecciona la fracción 5 como la que contiene mayor concentración de membranas plasmáticas. Coincide con la banda marrón que se observa en el tubo de centrífuga en el que se ha llevado a cabo la separación en gradiente de sacarosa.

La fracción 5 contenía aproximadamente el 55% del total de la actividad NADH oxidasa detectada, lo que indicaba un mayor contenido en membranas plasmáticas. Estas fracciones se diluyeron en tampón Tris-HCl, 10mM, pH 8, y se ultracentrifugaron durante 1 h a 4 °C a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Optima L100K (Beckman-Coulter) con un rotor basculante SW 60Ti. El sedimento se resuspendió en un pequeño volumen del mismo tampón y se almacenó a -21 °C hasta el posterior análisis por electroforesis bidimensional.

3.5. Hidrogel e inmovilización de biomasa

El hidrogel utilizado en este trabajo se sintetizó por un equipo de investigadores de la Unidad Alimentaria de Fundación LEIA, C.D.T. (Vitoria) con el que se ha colaborado a lo largo de este trabajo.

El hidrogel utilizado está formado por la interacción electrostática de goma xantano y quitosano, dos polímeros de carga opuesta. El monómero de xantano (**Figura 3.6, arriba**), es un heteropolisacárido formado por una cadena principal de dos monómeros D-glucosa con enlace β (1-4) glicosídico, con una cadena lateral formada por manosa, ácido glucurónico y manosa. El quitosano (**Figura 3.6, abajo**) es el producto de la desacetilación total o parcial de la quitina y está formado por repeticiones aleatorias de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina con enlace β (1-4) glicosídico. La cantidad relativa de N-acetil-D-glucosamina, depende del grado de desacetilación del compuesto.



R=H o COCH₃

Figura 3.6. Esquemas de los polímeros utilizados para la formación del hidrogel. Arriba: goma xantano. Abajo: Quitosano.

3.5.1. *Formación del hidrogel*

Para la obtención del hidrogel, se preparó una disolución de quitosano al 4% (p/v), en una solución de ácido acético al 4% (v/v) en agua. Una vez disuelto el quitosano, la disolución se filtra para eliminar impurezas y restos no disueltos de quitosano. Paralelamente a ésta, se prepara otra disolución de goma xantano al 3% (p/v) en agua. Ambas soluciones se mezclan con agitación mecánica dando lugar al gel, que se lava varias veces para eliminar restos de ácido acético y quitosano y goma xantano sin reaccionar. Posteriormente se centrifuga para retirar por decantación el agua sobrante y se seca en una estufa a 45-50 °C, hasta que no hay modificación del peso, y se tritura en un molino hasta que se obtiene un polvo seco. El rendimiento total de la producción del hidrogel está en torno al 90%, siendo este rendimiento calculado como:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{peso del gel seco})}{(\text{peso del quitosano}) + (\text{peso del xantano})} \times 100$$

El hidrogel secado, triturado y posteriormente rehidratado era capaz de recuperar sus propiedades físico-químicas.

3.5.2. *Caracterización del hidrogel*

3.5.2.1. Pruebas de adhesividad a rocas

Se diseñó un sistema experimental que medía la capacidad adhesiva de diferentes hidrogeles a la roca y que imitaba el oleaje que el producto sufriría en un ambiente costero. Para ello en una cuba de metacrilato se colocaron rocas, lo más similares posible, con una cantidad de agua que no alcanzaba a cubrir las rocas. Se extendieron diferentes hidrogeles sobre las rocas y un movimiento oscilante hacía que el agua que contenía la cuba de metacrilato se moviera imitando el oleaje.

El experimento se repitió al menos 3 veces con cada hidrogel presentándose como resultados las medias de todos los experimentos.

3.5.2.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los ensayos de DSC se llevaron a cabo con un equipo de calorimetría diferencial de barrido DCS Q1000 de TA Instruments (New Castle, DE, EEUU), utilizando cápsulas de aluminio. Se utilizó un programa de barrido de temperaturas entre -50 y 80 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

El porcentaje de agua total en el hidrogel (W_T) se calculó como:

$$\% W_T = 100 \frac{W_t - W_o}{W_o}$$

Donde W_t es el peso del hidrogel completo e hinchado y W_o es el peso del gel seco o xerogel.

A partir del área de los picos endotérmicos, se calculó la entalpía de fusión (ΔH_f en $J \cdot g^{-1}$) del hidrogel. El porcentaje de agua libre (W_L) se calculó a partir de la expresión:

$$\% W_L = 100 \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f (H_2O)}$$

El contenido de agua asociada al hidrogel (W_A) se obtuvo como la diferencia entre el contenido de agua total y el contenido de agua libre:

$$W_A = W_T - W_L$$

3.5.2.3. Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

Los análisis de infrarrojos se realizaron con un equipo Magna IR 760 de Nicolet, obteniéndose los espectros por el método de absorbancia en la región $400-4000 \text{ cm}^{-1}$, con 32 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras se prepararon mediante la mezcla de los compuestos puros, ya sea quitosano o goma xantano, o el hidrogel con KBr en una proporción aproximada de 1:100 para la obtención de una pastilla que posteriormente se secó en una lámpara de IR, antes de la realización de la medida.

3.5.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se observaron las estructuras del hidrogel original y del hidrogel reestructurado mediante microscopía electrónica de barrido, usando un microscopio JEOL JSM-6480-LV (JEOL Ltd, Tokio, Japón), trabajando a 10 kV. Las observaciones y las muestras se prepararon y llevaron a cabo en estado de bajo vacío.

3.5.3. *Inmovilización de la biomasa por atrapamiento.*

3.5.3.1. Inmovilización de biomasa fresca.

La biomasa se cultivó durante 4 días en medio marino suplementado con 1% (v/v) y se cosechó por centrifugación a 12.000 x g, 4 °C, durante 15 minutos en una centrifuga Beckman-Coulter J-20 XPI con un rotor JLA 9.1000 (Fullerton, California, EEUU). Cada cultivo de un litro se lavó tres veces con medio marino fresco, y se resuspendió en un volumen final de 20 ml de medio marino.

Se utilizaron 5 ml de esa suspensión celular concentrada para rehidratar 0,5 g de hidrogel en tubos cónicos con 50 ml de volumen nominal. El hidrogel se esterilizó mediante radiación UV, durante toda la noche. La mezcla se removió intensamente y se incubó durante 1 h para permitir la restructuración completa del hidrogel y la inmovilización por atrapamiento de la biomasa.

Para los ensayos de caracterización, el medio marino SM1 se sustituyó en cada caso por medio SM1 modificado o agua de mar. Para la caracterización del efecto de la fuente de nitrógeno, se utilizó medio cuya fuente de nitrógeno se sustituyó por cloruro amónico o acetato amónico. La cantidad de nitrógeno aportada en cada caso fue la misma. También se preparó medio marino SM1 sin nitrógeno.

Para la caracterización del efecto de la temperatura, los experimentos se llevaron a cabo bien en incubadores a 24 y 37 °C o en cámara fría a 4 °C. También se usó agua de mar esterilizada por filtración y autoclavado, así como diluciones de ésta con agua MilliQ®.

3.5.3.2. Inmovilización de biomasa liofilizada.

La biomasa liofilizada se hidrató con medio SM1 o con agua bidestilada estéril durante diferentes tiempos antes de ser inmovilizada en el soporte. El volumen de rehidratación de la biomasa se ajustó a 6 ml de medio SM1 o 5 ml de agua estéril, a la que tras el periodo de rehidratación de la biomasa, se añadía una solución concentrada de medio SM1. La solución concentrada de medio SM1 se esterilizó por filtración.

Tras el periodo de rehidratación de la biomasa, el hidrogel seco y triturado se añadió a la suspensión celular y la mezcla se removió intensamente para obtener una distribución lo más homogénea posible y se incubó durante 1 hora para permitir la reestructuración completa del hidrogel y la inmovilización por atrapamiento de la biomasa. El hidrogel se esterilizó mediante radiación UV, durante toda la noche.

Para la caracterización del efecto de nitrógeno, temperatura y salinidad se usó el mismo procedimiento que con las células sin liofilizar. Para los experimentos de suplementación de agua de mar, se utilizó fosfato di-sódico como fuente de fósforo, y nitrato sódico como fuente de nitrógeno, en las mismas concentraciones que se usan en el medio SM1.

3.5.4. *Estimación de la biomasa inmovilizada*

La medida directa de biomasa viable inmovilizada (Gentili *et al.*, 2006) resultó de poca utilidad debido a la dificultad y la baja reproducibilidad de la liberación de la biomasa atrapada en el soporte. El uso de métodos indirectos, como la cuantificación de DNA (Bergmaier *et al.*, 2003) o de proteína de las células inmovilizadas (Song *et al.*, 2005), se descartó debido que el soporte es de naturaleza glucídica, lo que interfiere en las medidas de DNA y a la presencia grupos amino en el hidrogel, lo que a menudo produce medidas erróneas de proteína. Se decidió realizar una estimación de la biomasa.

La biomasa inmovilizada se estimó indirectamente del cálculo de la biomasa no inmovilizado o liberada. Para dicha estimación se utilizó el cálculo de la diferencia entre las unidades formadoras de colonias (UFC) ofrecidas para la inmovilización (Jirků, 1999) y las no inmovilizadas.

Para determinar la biomasa ofrecida, la misma cantidad de biomasa usada para la inmovilización, se diluyó mediante diluciones seriadas, por triplicado, en medio SM1, y se sembró 100 µl de dilución en placas de LB agar con 2% de NaCl por triplicado. Las placas se cultivaron durante 48 h a 25 °C y se realizó un conteo de UFC, usando el software GenoSmart de Syngene (Cambridge, Reino Unido). Para la determinación de la biomasa no inmovilizada, el tubo en el que se llevó a cabo la inmovilización se lavó vigorosamente con 10 ml de medio SM1. Se tomaron muestras por triplicado y se realizaron diluciones seriadas. Se sembraron 100 µl de la disolución por triplicado en placas de LB agar con 2% (p/v) de NaCl, y se realizó el conteo de UFC. Para determinar la biomasa liberada del hidrogel tras la inmovilización, el soporte con la biomasa inmovilizada se agitó en presencia de 10 ml de medio SM1. Del mismo modo se diluyó por triplicado la biomasa liberada por el hidrogel y se sembró en placas del mismo modo. Se realizó el conteo de UFC.

Se compararon las diferencias entre la biomasa ofrecida y la no inmovilizada o liberada para poder estimar la biomasa que había sido inmovilizada por atrapamiento en el soporte.

Además, para la caracterización del efecto de la salinidad en la inmovilización, se preparó medio marino SM1 en ausencia de NaCl, y con 1 M de dicha sal. Estas preparaciones se usaron para el lavado y resuspensión de la biomasa. El mismo proceso se llevó a cabo utilizando agua de mar, filtrada y esterilizada por autoclavado.

Con el fin de estudiar el posible efecto del pH sobre la reestructuración del hidrogel y la inmovilización de la biomasa, se prepararon tampones Tris-HCl 150 mM y 0,4 M de NaCl, ajustados a pH 7, 8 y 9. No se añadieron el resto de sales inorgánicas, puesto que el número de ufc iba a ser evaluado en medio rico.

3.6. Diseño del sistema experimental.

Se requería un sistema experimental en el que poder evaluar la eficacia de las bacterias inmovilizadas en la biorremediación de alcanos adheridos en una superficie. Se requería que el sistema aislara las bacterias inmovilizadas del medio externo a fin de poder controlar variables como salinidad, humedad ambiente o temperatura, y que mimetizara en la medida de lo posible el lugar de aplicación para el que se pretendía diseñar el producto.

Se diseñó un sistema experimental a pequeña escala, que permitía controlar las variables y que simulaba la adhesión del soporte a una superficie impregnada con hidrocarburos (**Figura 3.7**).

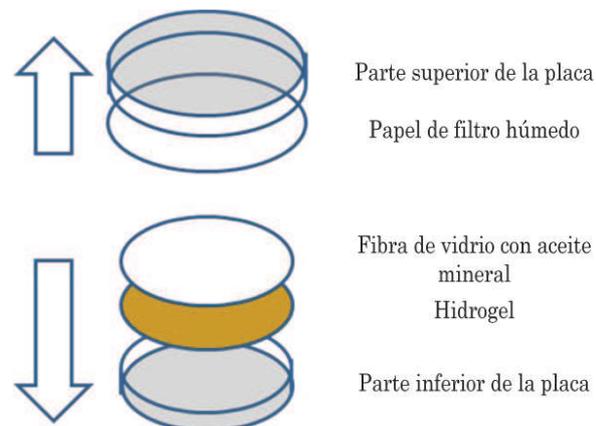


Figura 3.7. Esquema del sistema utilizado en los experimentos de biodegradación mediante biomasa inmovilizada. El sistema está compuesto por el soporte con la biomasa inmovilizada extendido sobre una placa de vidrio con un filtro de fibra de vidrio impregnado en aceite mineral. En la placa superior se coloca un filtro de papel humedecido con agua estéril.

Se utilizaron placas de vidrio de borosilicato de 90 mm de diámetro interno mínimo, en las que se extendía el soporte con bacterias inmovilizadas. Sobre el soporte se colocaba una membrana de fibra de vidrio de 90 mm de diámetro, que se impregnaba con un volumen conocido de hidrocarburo. La humedad ambiental propia de una zona intermareal, se simulaba a través de un papel de filtro de 100 mm de diámetro que se humedecía al menos una vez al día con agua estéril (**Figura 3.8**).

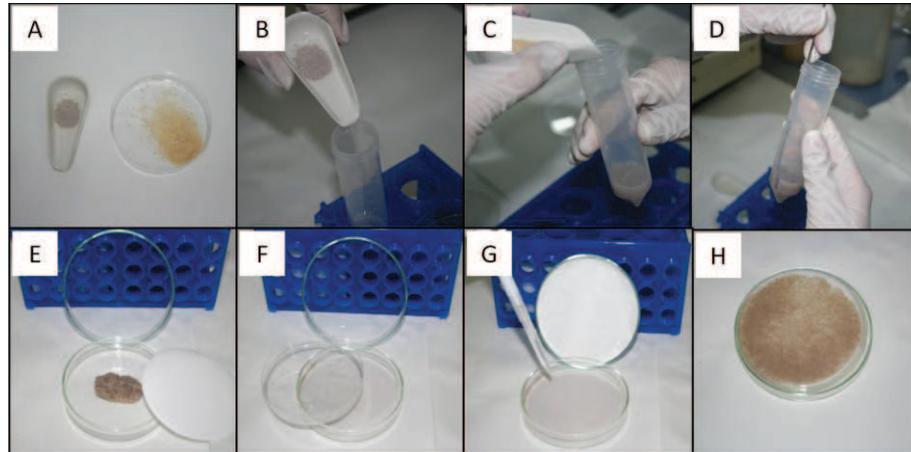


Figura 3.8. Secuencia fotográfica de la preparación de las muestras en el sistema experimental de ensayo. (A) Se pesan por separado la biomasa liofilizada, izquierda, y el hidrogel, derecha. El hidrogel es previamente esterilizado por radiación ultravioleta durante toda la noche. (B) Se suspende la biomasa liofilizada en el medio de rehidratación y se incuba durante 1 h a 22 °C. (C) Se añade sobre la suspensión de biomasa rehidratada el hidrogel y se agita vigorosamente hasta conseguir una mezcla homogénea. (D) Se retira, con una espátula, el hidrogel con la biomasa inmobilizada tras una hora de incubación. Previamente se centrifuga unos segundos para facilitar la recogida del material. (E) Se deposita el hidrogel sobre la base de la placa de vidrio y se coloca encima el filtro de fibra de vidrio. (F) Se utiliza una placa de petri de plástico pequeña para extender el hidrogel sobre la placa de vidrio, presionando el filtro contra el material. (G) Se coloca en la tapa de la placa un filtro de papel que se humedece adecuadamente. Se deposita sobre el filtro de fibra de vidrio la cantidad requerida de aceite mineral. (H) Se incuba durante el tiempo necesario. Se muestra el aspecto de la base de la placa con el hidrogel con biomasa inmobilizada extendido.

A fin de valorar la necesidad de rehidratación, se ensayó la velocidad de evaporación del agua con el que era impregnado el papel de filtro. Se muestra en la **Figura 3.9** la tendencia lineal de la evaporación de agua en ausencia de actividad biológica, cuando se añaden inicialmente 1 ml o 1,5 ml. La tendencia es prácticamente similar, 0,03 ml/h de evaporación a temperatura ambiente entre 22-24 °C. Con estos resultados, se decidió añadir 1,5 ml iniciales y añadir 1 ml diariamente en una o dos etapas.

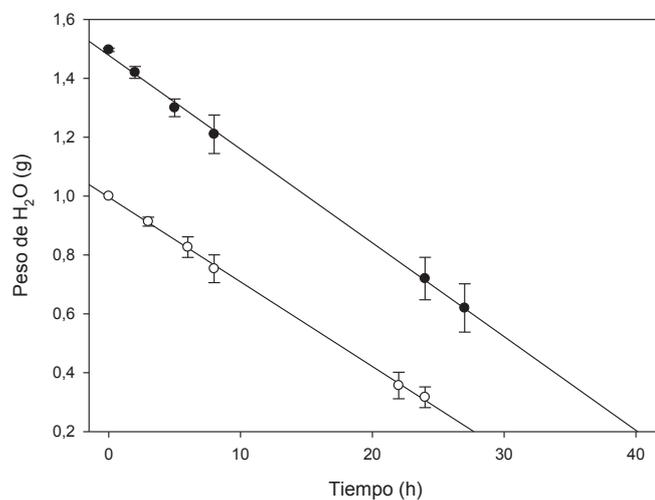


Figura 3.9. Evaporación de agua en las placas del sistema experimental en función del tiempo, cuando se usa 1 ml de agua (o) y cuando se usa 1,5 ml de agua por cada filtro (•). Se pesaron las placas del sistema experimental sin agua y posteriormente se pesaron tras la adición de la cantidad indicada de agua MilliQ®. Posteriormente se realizaron diferentes pesadas para calcular la pérdida de agua por evaporación.

3.6.1. *Ensayo de respiración de la biomasa liofilizada*

Para los ensayos de respiración de la biomasa liofilizada durante la rehidratación se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark (Rank Brothers, Cambridge, Reino Unido). La cubeta de metacrilato se termostató a 22 °C y se añadieron 500 mg de biomasa liofilizada a 6 ml de medio marino SM1. Se registró la evolución de la concentración de O₂.

3.7. Ensayos de biodegradación

3.7.1. Ensayos en medio líquido

La biodegradación de *n*-dodecano y aceite mineral en medio líquido se ensayó de manera discontinua. Para ello se inocularon con 0,2 UA₆₀₀ matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio marino (Passeri *et al.*, 1992) suplementado con diferentes concentraciones de *n*-dodecano o aceite mineral. Los matraces se mantuvieron en un incubador orbital New Brunswick G-25 (Edison, New Jersey, EEUU) a 24 °C y 150 rpm. Cada cultivo se utilizó para una sola medida de determinación de hidrocarburos, mediante extracción del aceite mineral o el *n*-dodecano con 10 ml de *n*-hexano y posterior cromatografía de gases. Para cada medida se utilizaron dos matraces de 250 ml con 100 ml de cultivo, de los que se tomaron muestras por duplicado.

3.7.2. Ensayos en placa

Para los ensayos de biodegradación de aceite mineral en placa, utilizando el sistema experimental anteriormente detallado, se extrajo con *n*-hexano el aceite mineral del filtro de fibra de vidrio. Se utilizaron 10 ml de *n*-hexano por cada placa, que se incubó durante 10 minutos con agitación suave. Se tomaron muestra de cada placa y se analizaron por cromatografía de gases.

Se comprobó la linealidad de la extracción y cuantificación de aceite mineral, mediante el método utilizado anteriormente, obteniendo resultados que demuestran que el sistema experimental es válido para evaluar la degradación de hidrocarburos por parte de biomasa inmovilizada en un soporte adhesivo (**Figura 3.10**).

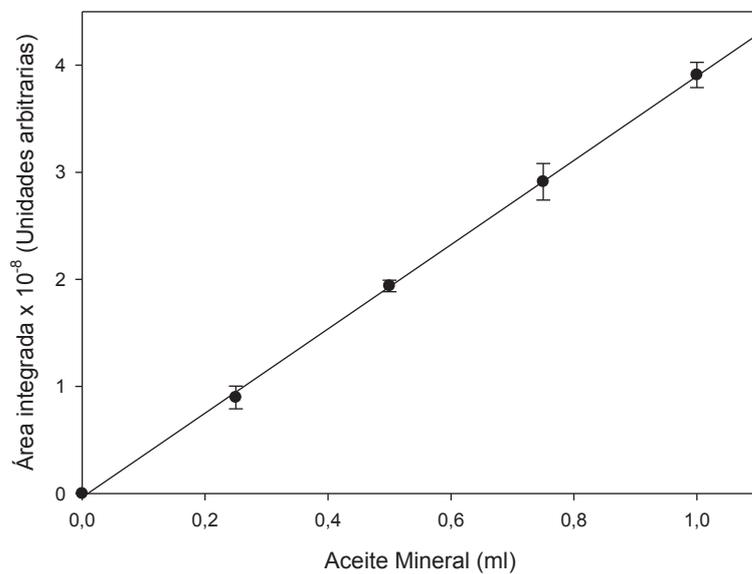


Figura 3.10. Recta patrón de aceite mineral. Esta recta se realizó añadiendo diferentes volúmenes de aceite mineral en el sistema experimental y extrayéndolo con *n*-hexano. Las muestras se analizaron mediante GLC/MS y se integró el área bajo la curva entre 12 y 25 minutos.

3.8. Métodos electroforéticos.

3.8.1. Electroforesis monodimensional

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida con un espesor de 1 mm y una concentración de acrilamida del 4% (v/v) en el gel concentrador y del 10 o el 12% (v/v) en el gel separador. Se añadió SDS al 1% (p/v) al tampón de electrodos y 2% (p/v) al tampón de muestra, que contenía además 5% (v/v) de β -mercaptoetanol. El tampón de muestra se añadió al menos en una proporción de 1:2 (v/v), calentando las muestras 5 minutos a 95 °C. Se incluyó una calle en la que se analizaron patrones de proteínas de bajo peso molecular (*Precision Protein Standards*, Bio-Rad, Hércules, PA, EEUU). Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta MINI-PROTEAN III® de Bio-Rad (Hércules, PA, EEUU).

3.8.2. Electroforesis bidimensional

Las proteínas de la fracción soluble, se analizaron en tiras de IPG de 7 cm con un gradiente lineal de pH de intervalo 4-7 (ReadyStrip™ de Bio-Rad, Hércules, PA, EEUU). La rehidratación se realizó de forma pasiva a 18 °C durante 16 horas con 125 μ l de tampón de rehidratación que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% (p/v), DTT 100 mM, Biolyte® pH 3-10 al 0,2% (v/v), y trazas de azul de bromofenol, además de extracto proteico soluble (50-100 μ g de proteína).

Las proteínas de la fracción de membrana, se analizaron en tiras de IPG de 7 cm con un gradiente lineal de pH de intervalo 5-8 (ReadyStrip™ de Bio-Rad, Hércules, PA, EEUU). La rehidratación se realizó de manera similar a la fracción soluble, pero se añadió en el tampón de rehidratación 2% (p/v) de ASB-14, para mejorar la solubilización de las proteínas (Chevallet *et al.*, 1998; Herbert, 1999; Molloy *et al.*, 2001; Martins-de-Souza *et al.*, 2007).

Para la primera dimensión se empleó un equipo Protean IEF Cell de Bio-Rad (Hércules, PA, EEUU). El voltaje aplicado fue de 250 V durante 2 h. Posteriormente se realizó un gradiente lineal de voltaje durante 3 horas hasta 2000 V que se mantuvieron hasta alcanzar 30000 Vh totales. La temperatura se mantuvo a 18 °C durante todo el proceso.

Posteriormente y antes de la segunda dimensión se realizó un equilibrado de las tiras. Para ello las tiras con proteínas de la fracción soluble, se incubaron en tampón de equilibrado suplementado con DTT al 2% (p/v) durante 15 minutos y después otros 15 minutos en tampón de equilibrado suplementado con iodoacetamida al 2,5% (p/v) y trazas de azul de bromofenol. Las tiras para la fracción de membrana se incubaron durante 30 minutos en cada uno de las disoluciones. El tampón de equilibrado contenía urea 6 M, Tris HCl 0,375 M, SDS al 2% (p/v) y glicerol al 20% (v/v), ajustado a pH 8.8. Para la fracción de membrana, la concentración de SDS era 4% (p/v).

La segunda dimensión se llevó a cabo en una cubeta MINI-PROTEAN III® de Bio-Rad. Se emplearon geles discontinuos de 1 mm de grosor, con 12% de acrilamida (p/v). El gel superior estaba compuesto por agarosa al 1% (p/v) en tampón de electrodos. La agarosa se polimerizó sobre las tiras previamente equilibradas, dejando una calle para marcadores de masa molecular (Precision Protein Standards, Bio-Rad, Hércules, PA, EEUU). Tras la segunda dimensión, los geles se revelaron con Azul de Coomassie (PhastGel® Blue R, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) o con tinción de plata según Shevchenko (1996).

3.9. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas ESI-TOF.

La espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry) se basa en el análisis de los iones moleculares en función de su relación entre masa y carga (m/z). La medida exacta de este valor ofrece información sobre la masa molecular del analito. Si además se introduce el proceso de fragmentación molecular (MS/MS), cada fragmento iónico podrá ser analizado y detectado su valor de m/z . El conjunto de fragmentos es característico de cada analito y depende de su estructura química. Esto permite obtener información no solo de la masa molecular del analito sino también de su estructura química.

Las proteínas a analizar se sometieron a digestión trípica según el método descrito por Shevchenko (1996) con ligeras modificaciones. Brevemente, los *spots* recortados del gel se incubaron con DTT 5 mM durante 45 min a 56 °C, y posteriormente con iodoacetamida 15 mM durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

A continuación, se añadió tripsina (Roche Diagnostics, tripsina de calidad proteómica) en una relación 1/25 (p/p) y la digestión se llevó a cabo durante 16 h a 37 °C. Las muestras se cargaron sin ningún tipo de purificación posterior en el sistema cromatográfico.

Los espectros de masa en tándem se adquirieron utilizando un espectrómetro de masas SYNAPT HDMS (Waters) conectado a un cromatógrafo capilar Nano Acquity UPLC System (Waters). Se tomaron 8 μl de la muestra de péptidos generados en la digestión triptica y se cargaron en una columna Symetry C18 5 μm (Waters). Se lavó la columna con ácido fluoracético al 0.1% (v/v) durante 5 min a un flujo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ y se conectó a una columna BEH 130 C18, 75 μm x 200 mm, 1,7 μm (Waters) equilibrada en acetonitrilo al 5% (v/v) y ácido fluoracético al 0.1% (v/v) en agua. El flujo se ajustó a 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ y los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 30 min entre el 5% y 60% (v/v) de acetonitrilo directamente en la punta capilar del nano-electrospray. El voltaje del capilar se ajustó entre 3,000-3,500 V para obtener la mejor relación señal/ruido.

Para la obtención de datos de MS/MS el espectrómetro de masas se programó de dos formas diferentes. Por un lado, se utilizó un modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) en el cual se fragmentan los 3 precursores más intensos de cada *scan* en un intervalo de *m/z* entre 400-1,500, que contengan 2, 3 ó 4 cargas positivas y con una intensidad superior a 20 cuentas/*scan*.

Los espectros de masas obtenidos una vez procesados se contrastaron frente a las bases de datos públicas NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y Swiss-Prot <http://www.expasy.org/> utilizando los motores de búsqueda MASCOT (Matrixscience) y VEMS (Matthiesen *et al.*, 2004; 2005). Para la identificación de las proteínas se establecieron los siguientes parámetros de búsqueda: carboxiamidometilación completa de cisteínas, oxidación variable de metioninas, error máximo en la masa peptídica 25-50 ppm, error máximo en la masa de los fragmentos, 0.05-0.1 Da, digestión con tripsina y omisión de lugares de corte, 1.

Los análisis de espectrometría de masas MS-QTOF y LC-MS/MS se llevaron a cabo en el Servicio General de Proteómica de los Servicios Generales de Investigación de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del hidrogel

Los experimentos de caracterización del hidrogel se han llevado a cabo en los laboratorios de I+D de Fundación LEIA, Centro de Desarrollo Tecnológico.

4.1.1. *Medidas de adhesión a rocas*

Se ha evaluado la capacidad de diferentes hidrogeles para adherirse a un material rocoso en presencia de una simulación de oleaje. Se sintetizaron hidrogeles que combinaban a diferentes concentraciones de quitosano y goma xantano. Los resultados de adhesión se muestran en la **Tabla 4.1**.

Resultados y discusión

Tabla 4.1. Resumen de hidrogeles y su adhesión a rocas. Se muestran el porcentaje de cada polímero en la disolución inicial y la relación entre las disoluciones de cada polímero.

GEL	Quitosano (%)	Xantano (%)	Relación quitosano:xantano	Días Adheridos a roca
1	1,5	3	1:2	-
2	1	3	1:3	-
3	2	2	1:1	-
4	2	1	2:1	-
5	1,5	1	3:2	-
6	2	0,66	3:1	-
7	2	3	6:1	-
8	2	3	3:1	-
9	2	3	3:2	7 días
10	2	3	2:3	7 días
11	2	3	1:6	7 días
12	2	3	1:3	7 días
13	4	3	6:1	-
14	4	3	3:1	-
15	4	3	3:2	>10 días
16	4	3	2:3	7 días
17	4	3	1:6	7 días
18	4	3	1:3	7 días

Se seleccionó el gel 15 debido a su mayor capacidad adhesiva. Aquellos geles para los que no se muestra ningún resultado tenía un rendimiento de formación muy bajo y por tanto no podían producirse para ser adheridos a las rocas. Además se utilizaron combinaciones de quitosano con carboximetil celulosa, con un resultado de 6 días de adhesión a las rocas y combinaciones de quitosano y goma gellam, que permanecían en torno a 5 días sobre las rocas del ensayo.

4.1.2. *Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)*

Los resultados de DSC, resultan de utilidad para la caracterización del hidrogel en cuanto al contenido real en agua del soporte. La presencia de agua, es fundamental para sustentar tanto el metabolismo vital como la actividad degradativa de las bacterias, una vez que estas son inmovilizadas en el soporte.

Se han realizado barridos tanto del hidrogel original como del hidrogel secado y triturado, posteriormente rehidratado. Los termogramas (**Figura 4.1**) muestran un único pico, correspondiente al proceso de fusión del agua presente en el hidrogel, y se observan valores de temperatura para la fusión, ligeramente superiores a 0 °C. La integración del área bajo las curvas, permite conocer tanto el contenido de agua total como de agua libre, es decir, accesible a las bacterias, mediante el procedimiento detallado en materiales y métodos.

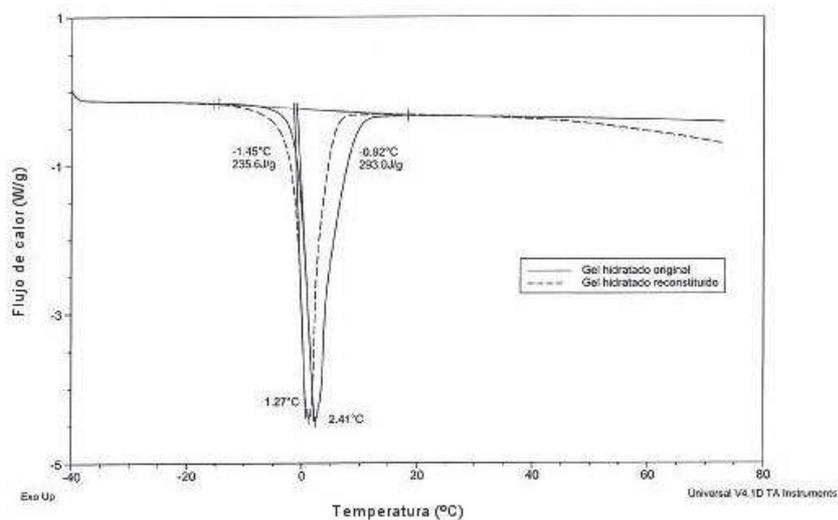


Figura 4.1. Termogramas obtenidos por DSC para el hidrogel original y el hidrogel reestructurado. Se observan las ligeras diferencias en la cantidad de agua entre ambos hidrogel.

Teniendo en cuenta que la entalpía de fusión del agua pura desionizada es $330,0 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$, los contenidos calculados para cada uno de los hidrogel de agua total, agua libre y agua asociada se presentan en la **Tabla 4.2:**

Tabla 4.2. Contenidos en agua total, agua libre y agua asociada al hidrogel para los dos soportes, el hidrogel original y el hidrogel reestructurado.

	Hidrogel original	Hidrogel reestructurado
Agua total (W_T)	98%	85%
Agua libre (W_L)	88,3%	70,5%
Agua asociada(W_A)	9,7%	14,5%

4.1.3. *Espectroscopía de Infrarrojo (IR)*

Los análisis de IR permiten conocer y caracterizar algunos grupos funcionales libres de los compuestos. En este caso, se pretende conocer si existen en el hidrogel ya formado grupos reactivos libres del tipo carboxilo o amino. Esto repercutirá en la permeabilidad a compuestos bien polares o bien apolares, en función de la presencia o no de cargas o distribuciones asimétricas de las mismas.

Se analizaron por separado tanto la goma xantano como el quitosano identificándose las bandas características del grupo carboxilo para la goma xantano y del grupo amino para el quitosano. Se observa aproximadamente a 1728 cm^{-1} la banda de la tensión de enlace C=O y a 1650 cm^{-1} la banda del enlace N-H (**Figura 4.2**).

Cuando se observa el espectro de IR para el hidrogel, se puede observar que ambas bandas siguen presentes, aunque reducidas y ligeramente desplazadas. Esto indica que esas fuerzas de enlace han sido modificadas por la interacción de ambos compuestos, si bien quedan aún grupos libres susceptibles de reaccionar o interaccionar con nutrientes.

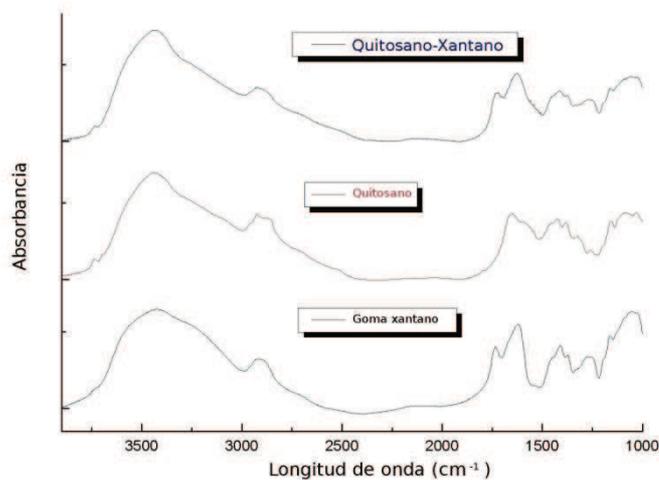


Figura 4.2. Espectros de absorbancia de IR de la goma xantano, el quitosano y el hidrogel de la mezcla de ambos. Se observa aproximadamente a 1728 cm^{-1} la banda de la tensión de enlace C=O en el xantano y a 1650 cm^{-1} la banda del enlace N-H en el quitosano. Cuando se analiza el hidrogel compuesto por ambos polímeros, podemos observar que ambas bandas se reducen aunque no desaparecen, debido a que existen aún grupos reactivos libres en el hidrogel polimerizado.

4.1.4. Microscopía electrónica de barrido

Entre ambas imágenes de SEM, pueden observarse algunas diferencias, que pueden ser atribuidas al diferente contenido en agua de ambos hidrogeles y al proceso de molienda al que se somete al hidrogel después de su secado, para almacenarlo en forma de polvo, evitando de ese modo que se deteriore o sea degradado por microorganismos (**Figura 4.3**).

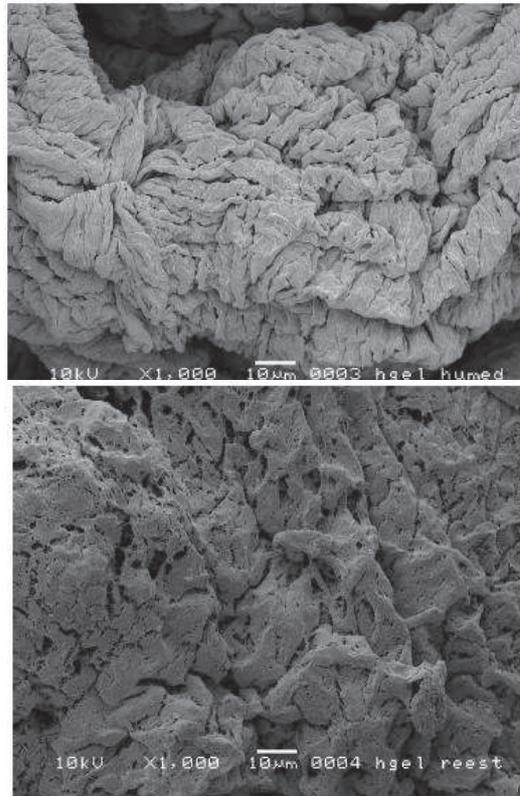


Figura 4.3. Micrografías obtenidas por SEM del hidrogel de quitosano-xantano. Arriba: hidrogel original. Abajo: hidrogel reestructurado.

Sin embargo el hidrogel reestructurado posee las propiedades necesarias para la inmovilización de microorganismos y el proceso de secado y triturado facilita la inmovilización.

4.2. Selección de cepas

El estudio de biodegradación de hidrocarburos se comenzó con *M. hydrocarbonoclasticus*, *Pseudomonas* sp. CHAPS-2 y dos cepas de *A. venustensis*. Se seleccionó la cepa de *A. venustensis* como candidata para el estudio en base a dos criterios concretos. El primero de ellos es la degradación de alcanos de cadena variable, tanto en células libres como inmovilizadas. Era necesario que la bacteria elegida tuviera la mayor flexibilidad metabólica posible. El segundo de los criterios era la posibilidad de obtener gran cantidad de biomasa para los ensayos de inmovilización y degradación de aceite mineral con biomasa inmovilizada.

En base al primero de los criterios se descartaron tanto *Pseudoalteromonas* como *A. venustensis* (5389). La primera no era capaz de degradar aceite mineral de forma efectiva en cultivo líquido (**Figura 4.4**), a pesar de su capacidad para degradar *n*-dodecano. No se alcanzaron densidades celulares por encima de 0,5 UA en presencia de aceite mineral, lo que indica una baja capacidad para utilizar alcanos de cadena larga. Además se observaban grandes fluctuaciones en las medidas del crecimiento celular por turbidez, debido a la rápida floculación de la biomasa.

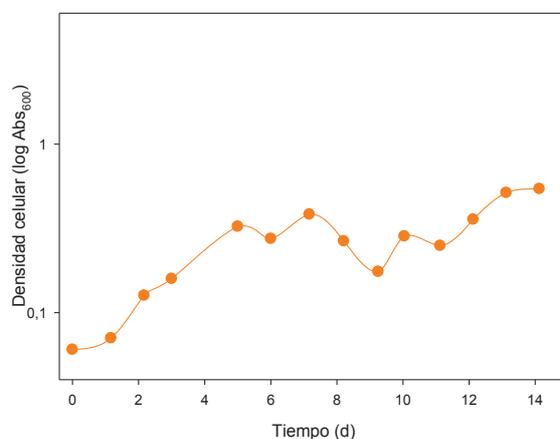


Figura 4.4. Curva de crecimiento de *Pseudoalteromonas* sp CHAPS-2 en medio SM1 usando aceite mineral como única fuente de carbono y energía. Se muestra el crecimiento de un cultivo para representar las fluctuaciones de biomasa en suspensión a lo largo de dos semanas de incubación.

En el caso de *A. venustensis* (5389), cuyas células degradan aceite mineral en cultivo líquido, no era capaz de degradarlo después de ser inmovilizada en el soporte (**Figura 4.5**). A pesar de su actividad degradadora de aceite mineral en cultivo líquido, una vez inmovilizada por atrapamiento no era capaz de degradar alcanos de cadena larga a diferencia de la cepa 5388 de *A. venustensis* y *M. hydrocarbonoclasticus* (**Figura 4.5**). No se observan diferencias entre los ensayos realizados con la cepa 5389 de *A. venustensis* y el control de soporte sin bacterias inmovilizadas. Tras estos ensayos, se trabajó tan solo con la cepa 5388 de *A. venustensis* y *M. hydrocarbonoclasticus*.

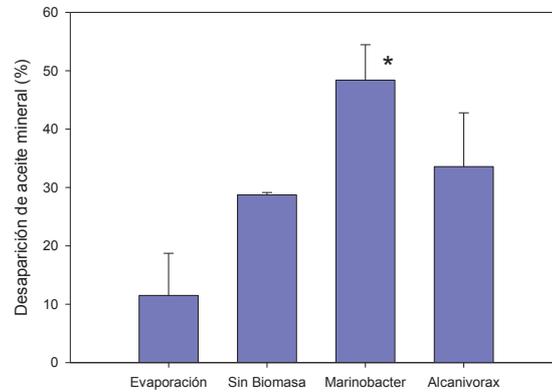


Figura 4.5. Degradación de aceite mineral mediante biomasa inmovilizada en hidrogeles. Se muestran el control de evaporación y el control abiótico, soporte sin bacterias inmovilizadas. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

A partir de este momento, se caracterizó la degradación de aceite mineral usando biomasa inmovilizada de *A. venustensis* y *M. hydrocarbonoclasticus*. Sin embargo, atendiendo al segundo principio citado, la cantidad de biomasa de *M. hydrocarbonoclasticus* que se podía recuperar mediante centrifugación era mucho menor que la de *A. venustensis*, por ello, en el momento de preparar biomasa liofilizada, tan solo se llevó a gran escala el cultivo y liofilización de *A. venustensis*. A partir de este momento, tan solo se mostrarán resultados de *A. venustensis*, ya que es con esta cepa con la que se ha realizado el trabajo completo.

4.3. Crecimiento de *A. venustensis* en medio líquido.

4.3.1. Crecimiento de *A. venustensis* con *n*-dodecano.

Se determinó el crecimiento de la biomasa de *A. venustensis* utilizando *n*-dodecano como única fuente de carbono en medio marino SM1, utilizando dos concentraciones distintas de disolvente. Primeramente se determinó el crecimiento de la biomasa utilizando una concentración baja de *n*-dodecano, para lo que se inocularon hasta 0,2 UA₆₀₀ matraces de 250 ml de volumen nominal, con 100 ml de medio SM1, suplementado con 0,5% (v/v).

En la **Figura 4.6** se observa un rápido crecimiento de la biomasa con una fase exponencial de unas 20 horas. A las 25 horas de incubación se alcanza una corta fase estacionaria, tras la cual la biomasa comienza a flocular y a adherirse rápidamente a las paredes del matraz. La cantidad de biomasa en suspensión se reduce a los niveles iniciales (**Figura 4.6b**). Es posible que esta reacción se deba a una situación de agotamiento de nutrientes (Soares and Vroman, 2003) o a cambios fisiológicos relacionados con la naturaleza hidrofóbica de la fuente de carbono. Para conocer la razón de la adhesión de la biomasa y si esta misma continúa viable y ha continuado dividiéndose, se procedió a añadir de nuevo un 0,5% (v/v) de *n*-dodecano.

Se observa que la biomasa en suspensión se mantiene a niveles basales hasta que se añade el contaminante. En unos 30 minutos tras la adición de *n*-dodecano, la cantidad de células en suspensión aumenta de manera importante, muy por encima de la biomasa obtenida inicialmente, por lo que durante el proceso de floculación se produce crecimiento bacteriano, así que la floculación de la biomasa difícilmente puede deberse a un estado de agotamiento de nutrientes. La biomasa vuelve a adherirse rápidamente a las paredes de matraz tras la adición de *n*-dodecano.

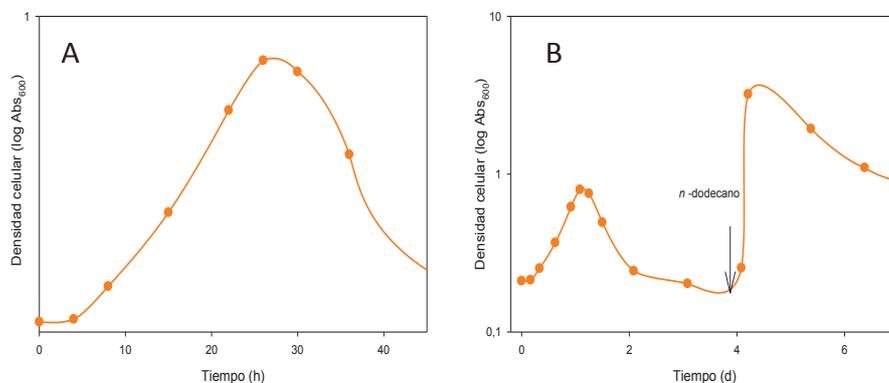


Figura 4.6. Curvas de crecimiento de *A. venustensis* en matraces de 250 ml con 100 ml de medio SM1, utilizando 0,5% (v/v) de *n*-dodecano como única fuente de carbono. **(A)** Crecimiento bacteriano con una única adición inicial de *n*-dodecano. **(B)** Crecimiento bacteriano con una adición inicial de *n*-dodecano y una adición a los 4 días.

Los diferentes mecanismos conocidos de acceso a los hidrocarburos incluyen, contacto directo de las células con el hidrocarburo a través de la membrana, toma a través de emulsiones aceite-agua o la secreción de biosurfactantes para aumentar la baja solubilidad de los hidrocarburos (Sekelsky and Shreve, 1999; Olivera *et al.*, 2009). En el caso de *A. venustensis* suponemos que la toma de hidrocarburos se efectúa a través del contacto directo entre la biomasa y el contaminante en la interfase *n*-dodecano-agua, puesto que para esta especie, a diferencia de otras de este mismo género, no se ha descrito el uso de biosurfactantes liberados al medio (Yakimov *et al.*, 1998; Fernández-Martínez *et al.*, 2003; Liu and Shao, 2005; Olivera *et al.*, 2009).

El mecanismo que se basa en el contacto directo de la membrana con el contaminante, exige una modificación de la hidrofobicidad de la membrana, lo que permite a la biomasa crecer e interactuar con el hidrocarburo en la interfase (Prabhu and Phale, 2003), pero también explicaría el proceso de floculación cuando comienza a agotarse el hidrocarburo insoluble y se reduce la interfase.

Se determinó también el crecimiento de la biomasa de *A. venustensis* en medio SM1 suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano, inoculando para ello cultivos de 100 ml de medio hasta 0,2 UA₆₀₀ de biomasa. Se observa que al igual que para el caso anterior, se alcanza una fase estacionaria sobre las 24 horas de cultivo (**Figura 4.7a**), pero esta vez, la cantidad de biomasa en suspensión se mantiene durante otras 24 horas antes de comenzar a adherirse a las paredes y a flocular. Tras 4 días de cultivo, la biomasa en suspensión se rebaja a niveles iniciales. Se realizó el mismo ensayo al añadir de nuevo contaminante, obteniendo resultados similares a los anteriores (**Figura 4.7b**).

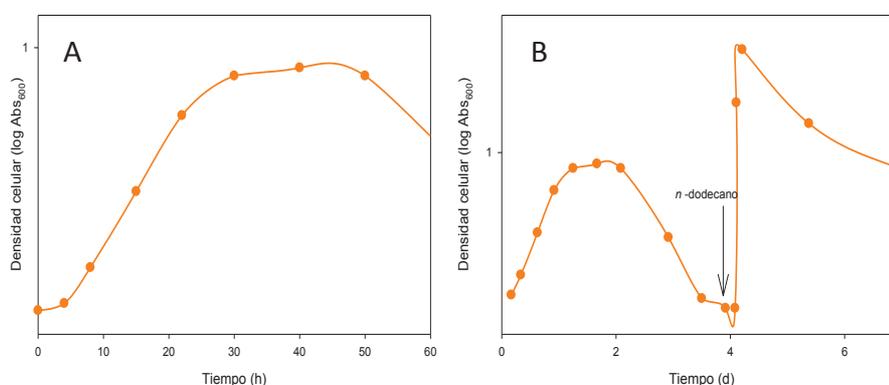


Figura 4.7. Curvas de crecimiento de *A. venustensis* en matracas de 250 ml con 100 ml de medio SM1, utilizando 1% (v/v) de *n*-dodecano como única fuente de carbono. (A) Crecimiento bacteriano con una única adición inicial de *n*-dodecano. (B) Crecimiento bacteriano con una adición inicial de *n*-dodecano y una adición a los 4 días.

4.3.2. Crecimiento de *A. venustensis* en aceite mineral.

Se determinó, además, el crecimiento de la biomasa de *A. venustensis* en presencia de aceite mineral como única fuente de carbono. Se suplementó el medio marino SM1 con 1% (v/v) de aceite mineral y se inocularon los cultivos con biomasa hasta $0,2U_{A_{600}}$.

El crecimiento de *A. venustensis* en presencia de aceite mineral, era más continuado en el tiempo alcanzándose cantidades de biomasa menor pero sin problemas de floculación, al menos aparentemente, durante los 5 días de crecimiento, ya que a partir del cuarto día la cantidad de biomasa que podía medirse comenzaba a reducirse (**Figura 4.8**). Es posible explicar esto en base a un metabolismo más lento para el aceite mineral que para el *n*-dodecano.

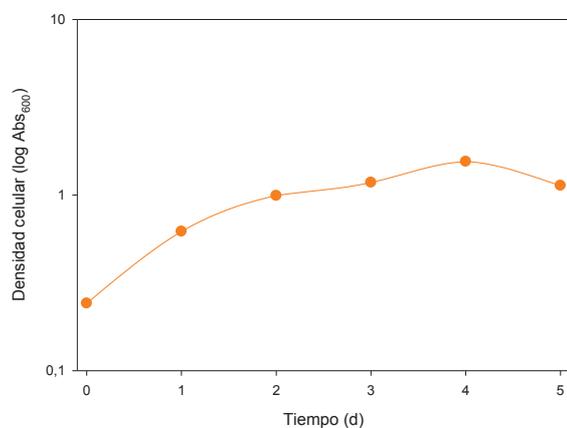


Figura 4.8. Curva de crecimiento de *A. venustensis* en medio SM1 Suplementado con 1% (v/v) de aceite mineral como única fuente de carbono y energía.

El crecimiento de *A. venustensis* en presencia de aceite mineral era por tanto más lento, siendo menor la producción de biomasa final. Además, la tensión superficial del aceite mineral es mayor que la del *n*-dodecano, por lo que en estos matraces, el 1% (v/v), de aceite mineral no cubre la superficie total, y por tanto el área que las bacterias tienen accesible es menor. A pesar de ser necesarias pruebas a mayor escala para la producción de biomasa, el *n*-dodecano no permitía disponer de mayor cantidad de biomasa rápidamente. A esto hay que añadir el hecho de que la biomasa crecida en presencia de *n*-dodecano, era más fácil de cosechar, puesto que, durante la centrifugación, se formaba una epifase orgánica, donde se posicionaba parte de la biomasa. Esta epifase era menor en el caso del *n*-dodecano y la biomasa que se perdía en el proceso era por tanto menor.

4.3.3. *Crecimiento de A. venustensis con diferentes fuentes de carbono en cultivos de 1 l.*

Para los ensayos de biodegradación de alcanos era necesaria una cantidad de biomasa considerable. Por ello, resultaba necesario caracterizar el crecimiento y la cantidad de biomasa obtenida utilizando matraces de 2,5 l de volumen nominal con 1 l de medio.

Se determinó el crecimiento de *A. venustensis* utilizando *n*-dodecano como única fuente de carbono en medio marino SM1, suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano, en matraces de 2,5 l de volumen nominal conteniendo 1 l de medio marino. Se observa que el crecimiento de la biomasa es más rápido en este volumen que en los cultivos de 100 ml (**Figura 4.9**). Además también se obtienen mayores densidades celulares en suspensión. El proceso de floculación se inicia más tarde, al cabo de 4 días de cultivo y finaliza dos días después.

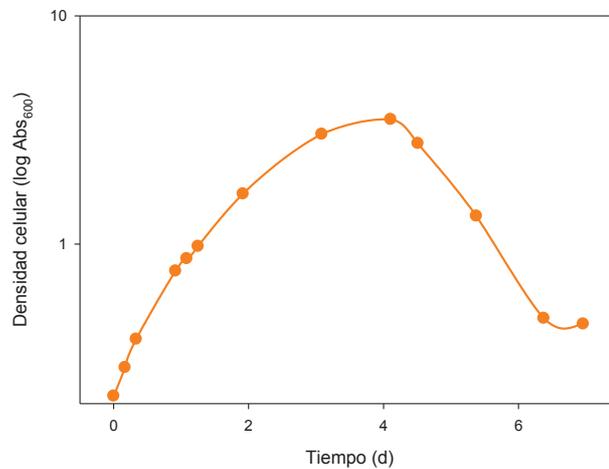


Figura 4.9. Curva de crecimiento de *A. venustensis* en matraces con 1 l de medio SM1, utilizando 1% (v/v) de *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía.

Esto puede deberse a la diferente relación, entre la superficie de contacto con el hidrocarburo y el volumen, que se obtiene al escalar los cultivos desde matraces con 100 ml a matraces que contienen 1 l de medio. Mientras que el volumen aumenta 10 veces, la superficie apenas aumenta 3 veces (en los matraces con 100 ml, la superficie a la altura del cultivo es de 50,24 cm², mientras que en los de 1 l, la superficie es de 153,93 cm²). De esta manera la toma de *n*-dodecano por parte de las bacterias no produce una rápida reducción de la fase orgánica, a pesar de mantener velocidad de división semejante, lo que permite el crecimiento en suspensión más prolongado. Este crecimiento más prolongado permite mejorar la cantidad de biomasa cosechada y facilitar mucho el proceso de obtención de células bacterianas para la inmovilización.

Se ha comparado el crecimiento bacteriano de *A. venustensis* en medio SM1 utilizando como única fuente de carbono *n*-dodecano o aceite mineral (fuentes ambas hidrofóbicas, aunque el aceite mineral en mayor medida) con el crecimiento en medio rico LB. Esto es posible, puesto que *A. venustensis* es un microorganismo degradador de hidrocarburos pero con una importante versatilidad en cuanto a la utilización de fuentes de carbono. En la **Figura 4.10** se observa que el crecimiento en medio LB es más rápido, y cuando alcanza la fase estacionaria no se produce ningún fenómeno de floculación, ya que no existe componente apolar en el medio y las células bacterianas no deben modificar la polaridad de su membrana. En la bibliografía se cita el crecimiento con acetato como similar al crecimiento con alcanos (Fernández-Martínez *et al.*, 2003), aunque en nuestros experimentos éste sea sensiblemente más lento y con menor producción de biomasa. Además, el crecimiento con fructosa como única fuente de carbono y energía es aún más lento y proporciona menos biomasa.

El crecimiento en presencia de *n*-dodecano es ligeramente superior, comparado con el que se produce en presencia de aceite mineral, aunque ambos siguen un patrón similar. Crecimiento rápido inicial hasta alcanzar un máximo, tras el cual la biomasa comienza a flocular y deja de encontrarse en suspensión. El aceite mineral es un compuesto heterogéneo más hidrofóbico que el *n*-dodecano, lo que limitaría ligeramente la accesibilidad de las células bacterianas a este sustrato.

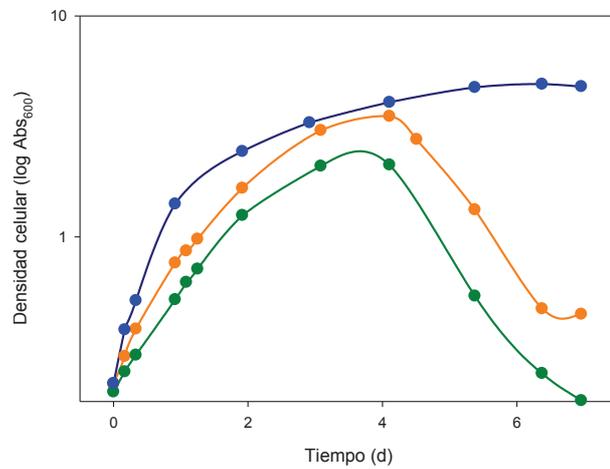


Figura 4.10. Curvas de crecimiento de *A. venustensis* en matraces con 1 l de medio. Se ha comparado el crecimiento de la biomasa en un medio rico con varias fuentes de carbono y energía y en un medio mineral utilizando diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Utilizando medio SM1 con *n*-dodecano como única fuente de carbono (—) o aceite mineral (—). Utilizando medio LB (—).

El proceso de floculación de la biomasa y su adhesión a las paredes del matraz resulta más evidente en cultivos de 1 l de medio cuando el tiempo de cultivo se eleva por encima de los 10 días (**Figura 4.11**).



Figura 4.11. Fotografía de un matraz inoculado con *A. venustensis* en medio SM1, con *n*-dodecano como única fuente de carbono, tras 2 semanas de incubación. Se observa la floculación celular y adhesión a las paredes.

4.3.4. Crecimiento de *A. venustensis* con diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos de 1 l.

Se determinó el efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento de *A. venustensis* en medio marino SM1, suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano. Para ello se preparó una variante del medio marino en la que la concentración de nitrato sódico era el doble de la formulación original. El medio marino SM1, contiene 0,823 g/l de nitrógeno en forma de nitrato sódico, mientras que la variante contenía 1,65 g/l de nitrógeno. En la **Figura 4.12** se observa que se produce un crecimiento mayor cuando la concentración de nitrógeno es mayor, y el proceso de floculación es más tardío (datos no mostrados). En los cultivos sucesivos, para la cosecha de biomasa para inmovilizar, se utilizó el medio de cultivo SM1 modificado, con una concentración mayor de nitrógeno.

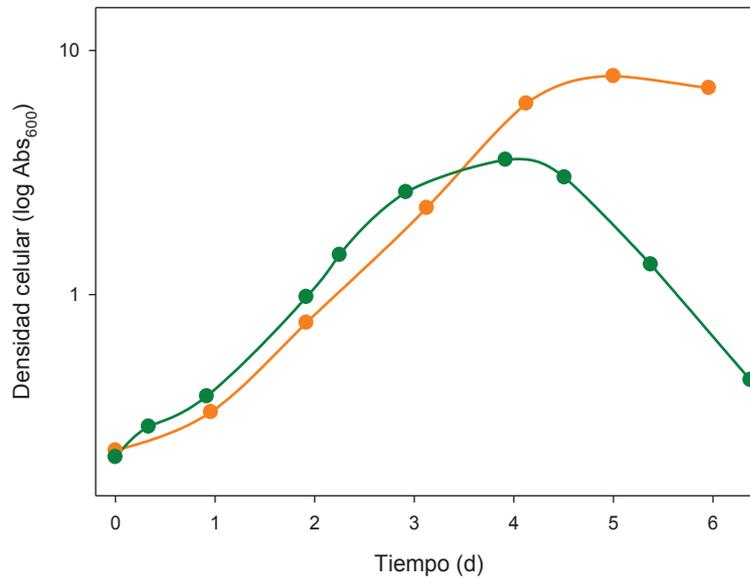


Figura 4.12. Diferencias en el crecimiento de *A. venustensis* en función de la cantidad de nitrógeno presente en el medio de cultivo. Se muestran curvas de crecimiento de *A. venustensis* en medio SM1 (—) y en medio SM1 modificado, con el doble de concentración de nitrógeno (—).

Se ensayó además el crecimiento de *A. venustensis* utilizando diferentes fuentes de nitrógeno, en función de su estado de oxidación, la naturaleza del contra-ión de la sal y la presencia de una fuente alternativa de carbono.

Se observó que las células eran capaces de crecer de manera muy similar utilizando como fuente de nitrógeno tanto nitrato sódico como potásico. Además, la naturaleza del contra-ión utilizado en la fuente de nitrógeno, cuando está se encuentra en forma de nitrato, no afecta al crecimiento de *A. venustensis* (**Figura 4.13a**). Cuando se analizó el efecto del estado de oxidación del nitrógeno en la fuente, se observó que se producía un crecimiento muy limitado en presencia de nitrito y de amonio, frente a la obtenida en presencia de nitrato (**Figura 4.13b**). A pesar de que en principio, *A. venustensis* puede utilizar tanto amonio como nitrato como fuente de nitrógeno (Fernández-Martínez *et al.*, 2003), se observó un mayor crecimiento en presencia de nitrato, por lo que se procedió al cultivo de la biomasa utilizando nitrato sódico como fuente de nitrógeno. Quizá el crecimiento en presencia de amonio se vea limitado por variaciones de pH en el medio, debidas a la evaporación o al consumo de amonio.

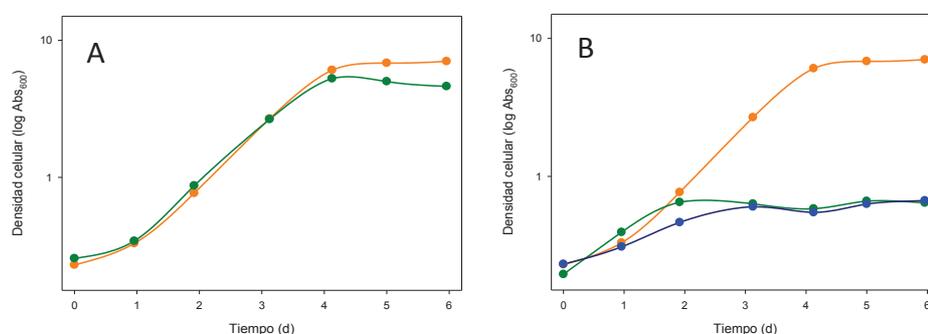


Figura 4.13. Efecto de la fuente de nitrógeno en el crecimiento de *A. venustensis* en medio SM1. (A) Curvas de crecimiento de *A. venustensis* utilizando nitrato como fuente de nitrógeno. Se utilizaron dos sales de nitrato, sal sódica (—) y potásica (—). (B) Curvas de crecimiento de *A. venustensis* utilizando como fuente principal de nitrógeno nitrato sódico (—), nitrito sódico (—) o cloruro amónico (—).

A fin de discriminar si la limitación se debía a un efecto de la presencia de amonio en el medio, se comparó el crecimiento de *A. venustensis* en presencia de nitrato, amonio y nitrato amónico. En la **Figura 4.14a** se observa, que el crecimiento se ve igualmente limitado utilizando tanto cloruro amónico como nitrato amónico como fuente de nitrógeno, lo que podría indicar que el efecto del amonio sobre el pH inhibe el crecimiento de *A. venustensis*.

Además, para mejorar el crecimiento bacteriano, se valoró la posibilidad de utilizar una fuente de carbono diferente junto a una fuente de nitrógeno reducida, por ejemplo acetato amónico (Klein *et al.*, 2008), pero se obtuvieron resultados negativos. La presencia de amonio produce un crecimiento menor de lo esperado, que no alcanza el crecimiento obtenido con el medio marino modificado, aunque la presencia de una fuente de carbono como el acetato, mejoraba ligeramente el crecimiento (**Figura 4.14b**). Por lo tanto, *A. venustensis* no era capaz de utilizar *n*-dodecano en presencia de amonio, sin embargo era capaz de utilizar el acetato, que es una fuente de carbono con la que se obtiene generalmente un mejor crecimiento (Fernández-Martínez *et al.*, 2003).

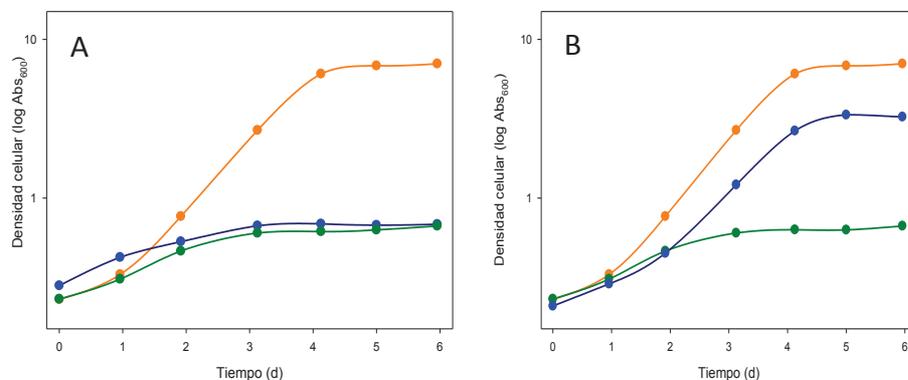


Figura 4.14. Utilización de amonio como fuente de nitrógeno para la obtención de biomasa de *A. venustensis* en medio SM1. (A) Curvas de crecimiento de *A. venustensis* utilizando nitrato sódico (—), nitrato amónico (—) o cloruro amónico (—) como fuente de nitrógeno. (B) Curvas de crecimiento de *A. venustensis* utilizando como fuente de nitrógeno nitrato sódico (—), cloruro amónico (—) o acetato amónico (—).

En conclusión, con los datos obtenidos, se empleó SM1 con la concentración de nitrógeno aumentada dos veces, en forma de nitrato sódico, tanto para el crecimiento celular como para inmovilizar, y para la obtención del producto de biomasa liofilizada.

4.3.5. Crecimiento de *A. venustensis* usando fertilizantes comerciales como fuente de nitrógeno y fósforo.

Para poder reducir costes en la posible producción de biomasa a gran escala, se estudió el crecimiento de *A. venustensis* utilizando fertilizantes comerciales que aportan fósforo y nitrógeno de forma económicamente ventajosa. Estos fertilizantes se usan en algunos productos comerciales para biorremediación como el "PUTIDOIL". De ese modo, se inocularon con biomasa crecida en medio SM1 con *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía, matraces que contenían 100 ml de agua de mar suplementada con 8,7 g/l de nitrato amónico, 5,4 g/l de fosfato mono amónico y 1% (v/v) de *n*-dodecano. El crecimiento se siguió midiendo la variación de la turbidez a 600 nm. Los resultados se muestran en la **Figura 4.15**.

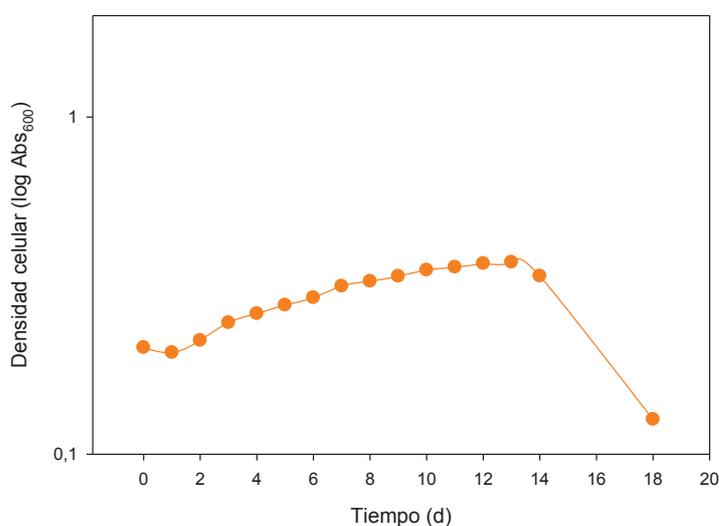


Figura 4.15. Crecimiento de *A. venustensis* en agua de mar suplementada con 8,7 g/l de nitrato amónico y 5,4 g/l de fosfato mono amónico en forma de fertilizantes comerciales, con 1% (v/v) de *n*-dodecano, como fuente de carbono y energía.

No se observó crecimiento en los cultivos con fertilizantes que pudieran permitir usar este sistema para la obtención de biomasa. De este modo se decidió usar medio SM1 para el crecimiento celular.

4.4. Inducción del sistema de degradación de hidrocarburos.

Según los experimentos realizados, *A. venustensis* era capaz de crecer en un medio en ausencia de hidrocarburos, utilizando otros compuestos como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, aquellas células que habían sido crecidas en ausencia de hidrocarburos, no eran capaces posteriormente de degradar alcanos, y al parecer era necesario un periodo de aclimatación. Esto hace suponer la existencia de un sistema enzimático inducible para la degradación de alcanos. Éste parecía inducirse en presencia de alcanos durante el crecimiento.

Para determinar si el sistema enzimático de degradación de alcanos era un mecanismo inducible por la presencia de *n*-dodecano, se cultivaron células de *A. venustensis*, con acetato sódico y fructosa o *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía, empleándose posteriormente estas células para ensayar la degradación de *n*-dodecano. El metabolismo del acetato como única fuente de carbono es muy similar al metabolismo de alcanos, una vez que estos han sido degradados a acetyl-CoA, por lo que se suplementó el medio con fructosa para la obtención de intermediarios del ciclo de Krebs y para la biosíntesis de macromoléculas.

Se comprobó que la biomasa previamente cultivada con acetato y fructosa no era capaz de crecer utilizando *n*-dodecano como fuente de carbono en las mismas condiciones en las que lo hacía la habitualmente la biomasa cultivada con *n*-dodecano (**Figura 4.16**). Hasta el segundo día de cultivo no se observó crecimiento bacteriano cuando se utilizaba biomasa cultivada con acetato y fructosa.

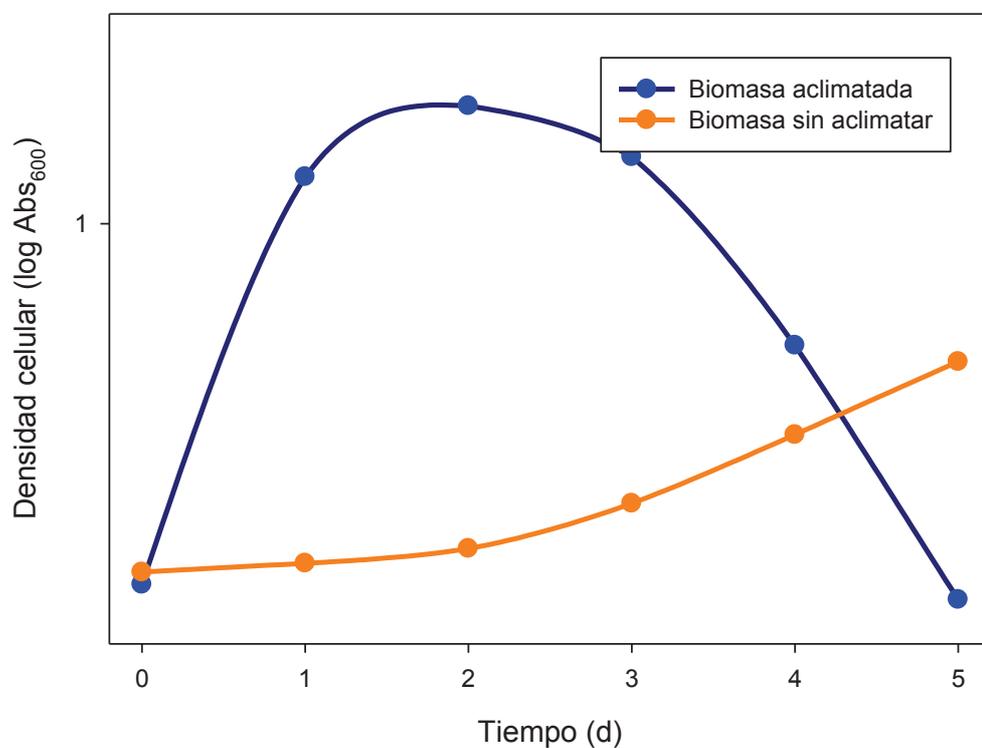


Figura 4.16. Seguimiento del crecimiento de *A. venustensis* en medio SM1, utilizando *n*-dodecano como única fuente de carbono, mediante la medida de turbidez a 595 nm. Los cultivos se inocularon con la biomasa para obtener una densidad celular equivalente a 0,25 AU₅₉₅. El trazo azul corresponde a la biomasa previamente cultivada con *n*-dodecano y el trazo naranja a la biomasa previamente cultivada en acetato y fructosa.

El hecho de que la biomasa cultivada previamente con *n*-dodecano sea capaz de degradar alcanos, indica que el sistema metabólico implicado en este proceso no es constitutivo, sino que se trata de un sistema inducible por la presencia del compuesto en el medio. Con el fin de determinar el tiempo necesario para la inducción del sistema y para comprobar si ese tiempo coincidía con el retraso en el crecimiento de *A. venustensis*, se siguió la desaparición de *n*-dodecano con el tiempo, en cultivos líquidos, suplementados con 1 ml de *n*-dodecano (**Figura 4.17**).

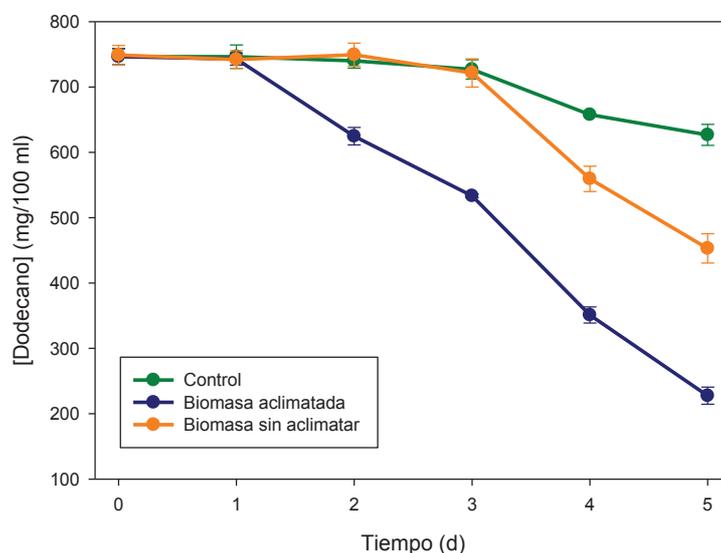


Figura 4.17. Degradación de *n*-dodecano por *A. venustensis*. Se inocularon cultivos con *n*-dodecano como única fuente de carbono, con 0,2 AU₅₉₅ de densidad celular de biomasa cultivada únicamente con fructosa (•) o *n*-dodecano (•). Se ensayó también la cinética de desaparición de *n*-dodecano por evaporación (•).

Al estudiar la degradación de *n*-dodecano se observa que la biomasa cultivada en presencia de alcanos comienza a eliminar *n*-dodecano del medio a una velocidad constante a partir del primer día de cultivo. En cambio, la biomasa cultivada con fructosa sufre un retraso de dos días en el uso del alcano respecto a la biomasa cultivada en *n*-dodecano. Así, la biomasa comienza a crecer al cabo de dos días de incubación y la degradación de *n*-dodecano, comienza a ser observable a partir del tercer día. La velocidad a la que la biomasa crecida con fructosa es capaz de degradar *n*-dodecano a partir del tercer día, es similar a la de la biomasa cultivada con *n*-dodecano. Esto indica que el sistema se induce completamente y que la biomasa es capaz de recuperar su actividad para incorporar carbono a su metabolismo a partir de alcanos.

4.4.1. *Análisis proteómico de A. venustensis mediante electroforesis bidimensional*

El análisis proteómico constituye una importante y potente herramienta para el análisis de los cambios globales en la expresión génica de un organismo concreto en respuesta a diferentes condiciones ambientales y/o nutricionales. La electroforesis bidimensional permite la separación de muestras complejas de proteínas en función de su punto isoeléctrico y su masa molecular. Su efectividad depende de la solubilidad de las proteínas analizadas y de su abundancia relativa en la muestra total. Además, es posible combinar esta técnica con la espectrometría de masas, lo que permite el análisis de múltiples proteomas y la construcción de diversas bases de datos (Gorg *et al.*, 2004).

En el caso concreto de las proteínas de membrana, su estudio es de utilidad para determinar el comportamiento celular respecto al medio y su respuesta a los cambios producidos en el entorno, así como a los distintos solutos que son transportados a ambos lados de la membrana. Sin embargo, en numerosos estudios se ha puesto de manifiesto la baja efectividad que la electroforesis bidimensional tiene para el análisis de proteínas de membrana. Principalmente, estas limitaciones vienen determinadas por la escasa solubilidad de las proteínas de membrana en los detergentes que se emplean habitualmente en la técnica, y por la agregación proteica a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico, por lo que se requiere desarrollar en ocasiones estrategias para mejorar la solubilización de las proteínas de membrana (Deshusses *et al.*, 2003; Babu *et al.*, 2004; Bunai and Yamane, 2005).

Teniendo en cuenta el carácter aparentemente inducible del uso de alcanos, o al menos, de su toma neta en *A. venustensis*, se decidió analizar mediante electroforesis bidimensional los polipéptidos, de las fracciones citoplasmática soluble y de membranas purificadas (Sabirova *et al.*, 2006), de células cultivadas tanto con acetato y fructosa como con *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía.

Se aislaron y analizaron mediante electroforesis bidimensional, utilizando tiras de inmovilinas con un intervalo de pH entre 4 y 7, las proteínas de la fracción citoplasmática celular de *A. venustensis* crecida utilizando dos fuentes de carbono diferentes. En la **Figura 4.18** se muestran geles de poliacrilamida representativos de los resultados obtenidos para cada caso.

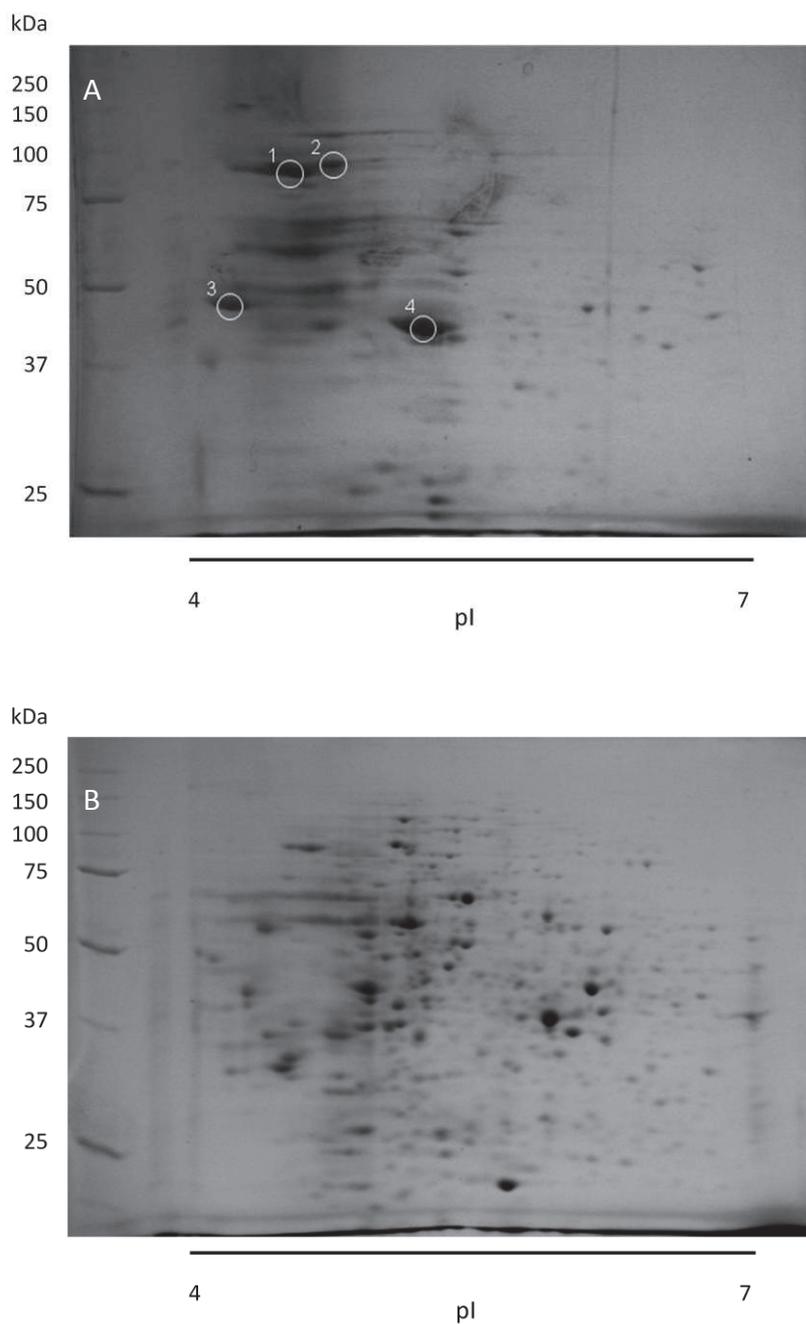


Figura 4.18. Análisis mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomasie G-250 de polipéptidos de fracción soluble de células de *A. venustensis* cultivadas con (A) *n*-dodecano y (B) acetato y fructosa.

Técnicamente resultó muy complicado enfocar la zona más ácida del intervalo de pH en las muestras de polipéptidos solubles de células crecidas con *n*-dodecano. Aún así, en los geles resultantes del análisis de la fracción soluble de biomasa cultivada con *n*-dodecano se identificó la presencia de varias proteínas que no aparecían en preparaciones de biomasa cultivada con acetato y fructosa. Se seleccionaron aquellas con una elevada expresión y que eran mayoritarias en el gel, para su análisis por espectrometría de masas.

Los spots seleccionados y marcados como 1,2, 3 y 4 fueron aislados del gel y analizados mediante MALDI-TOF. La **Tabla 4.3** detalla las proteínas analizadas e identificadas con éxito.

Tabla 4. 3. Proteínas citoplasmáticas de *A. venustensis* analizadas por electroforesis bidimensional identificadas por espectrometría de masas.

Spot	Identificación por MS	Score	Microorganismo	Nº acceso GenBank
2	Malato sintasa	262	<i>Alcanivorax borkumensis SK2</i>	CAL16715
3	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	129	<i>Alcanivorax borkumensis SK2</i>	CAL15516
4	Malato deshidrogenasa	180	<i>Alcanivorax borkumensis SK2</i>	CAL16696

Puesto que el genoma de *A. venustensis* no se encuentra secuenciado y apenas existen proteínas identificadas, la identificación de proteínas ha de hacerse por comparación con otras especies bacterianas, como por ejemplo *A. borkumensis* SK2, cuyo genoma debe ser muy similar al de *A. venustensis* ya que se trata de la cepa bacteriana filogenéticamente más próxima cuyo genoma ha sido secuenciado (Fernández-Martínez *et al.*, 2003; Liu and Shao, 2005).

La proteína número 2 se identificó como malato sintasa de *A. borkumensis* SK2 (nº de acceso GenBank CAL16715). Esta enzima es de vital importancia en organismos crecidos con alcanos como única fuente de carbono, puesto que pertenece al conocido como bypass del glioxilato (**Figura 4.19**). Este puente dentro del ciclo de los ácidos tricarbónicos, permite el funcionamiento del ciclo, y por tanto la producción de ATP sin la pérdida de carbono en forma de CO₂, además de la síntesis de esqueletos carbonados de tres átomos de carbono, fundamentales en la biosíntesis de azúcares y aminoácidos. De este modo el oxalacetato se recicla a partir del malato producido vía glioxilato o succinato. Además de producir oxalacetato, el malato es usado por la célula para la producción de piruvato, mediante la enzima málica. Estas rutas hacen posible la biosíntesis de azúcares y algunos aminoácidos.

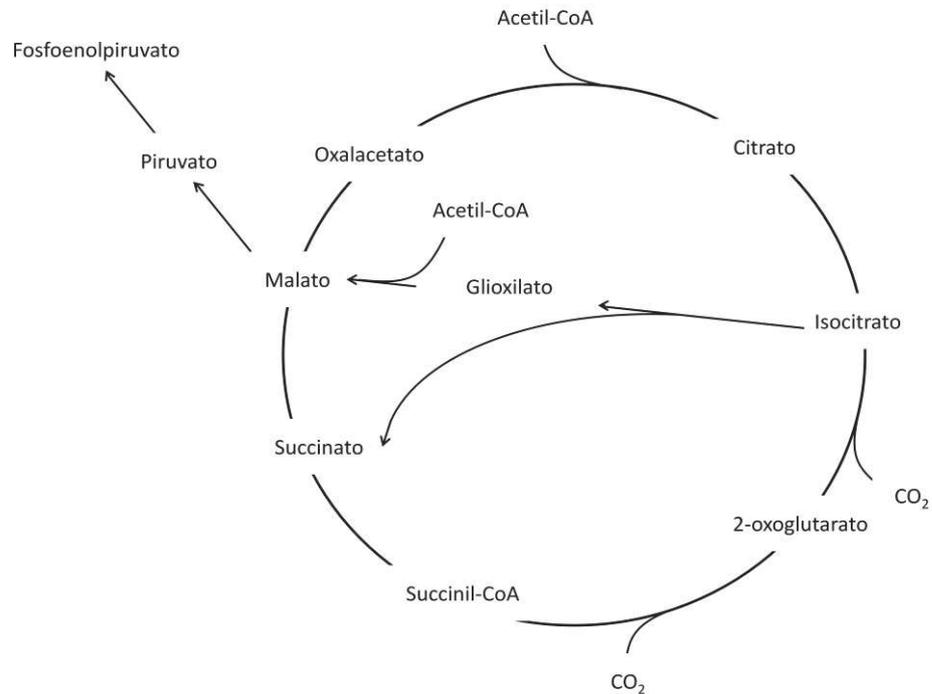


Figura 4.19. Esquema del ciclo del glioxilato. El isocitrato se escinde en succinato y glioxilato, que con la adición de una molécula de acetil-CoA, permite la síntesis de otra unidad de malato.

La proteína número 3 se identificó como D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa de *A. borkumensis* SK2. Esta enzima está implicada en la ruta biosintética de la glicina y otros aminoácidos, como la serina, lo que indirectamente enlaza con la síntesis de lípidos como materiales de reserva de carbono. Se encarga de la conversión del 3-fosfoglicerato en fosfopiruvato. El fosfoglicerato proviene del fosfoenolpiruvato producido desde el malato.

La proteína número 4 se identificó como malato deshidrogenasa de *A. borkumensis* SK2, que es precisamente la encargada de convertir el malato en oxalacetato, produciendo además NADH. La sobreexpresión de esta enzima, implica una concentración mayor de malato, que se explicaría a través de la activación del ciclo del glioxilato y la producción de dos moléculas de malato a partir de una única molécula de isocitrato.

El ciclo del glioxilato se asocia con la biodegradación de alcanos, ya que la célula ha de sintetizar todos los precursores metabólicos a partir de únicamente acetil-CoA (Kawamoto *et al.*, 1977; Okada *et al.*, 1986; Sabirova *et al.*, 2006). Éste, es el producto final de la degradación de alcanos a través de la β -oxidación de los ácidos grasos y es por tanto la fuente de carbono y energía que las bacterias han de utilizar.

Las enzimas analizadas e identificadas encajan con la inducción metabólica esperada para el crecimiento con alcanos. Esto indica que existen modificaciones de la expresión proteica en *A. venustensis* cuando crece en presencia de alcanos como única fuente de carbono. La intención inicial de este estudio era identificar enzimas implicadas en la degradación de alcanos de forma directa, sin embargo, estas enzimas están implicadas en su metabolismo, aunque de forma indirecta. Si bien no se ha identificado ninguna enzima que interactúa directamente con alcanos, se puede afirmar que existe una estimulación en la expresión de algunas enzimas, entre ellas, las implicadas en el ciclo del glioxilato. Esto conlleva la síntesis proteica *de novo* y con ello el retraso en el uso de alcanos como muestran las gráficas del apartado 4.4.

Se ha llevado a cabo un estudio similar de aislamiento y separación de electroforesis bidimensional de polipéptidos de membrana. Sin embargo a la dificultad para realizar la separación electroforética debido a la hidrofobicidad de algunos polipéptidos, hay que añadir la dificultad para identificar mediante ESI-TOF péptidos representativos de los spots seleccionados.

Como en el caso de las proteínas solubles, en la **Figura 4.20** se muestran geles de poliacrilamida representativos de cada una de las condiciones de crecimiento establecidas.

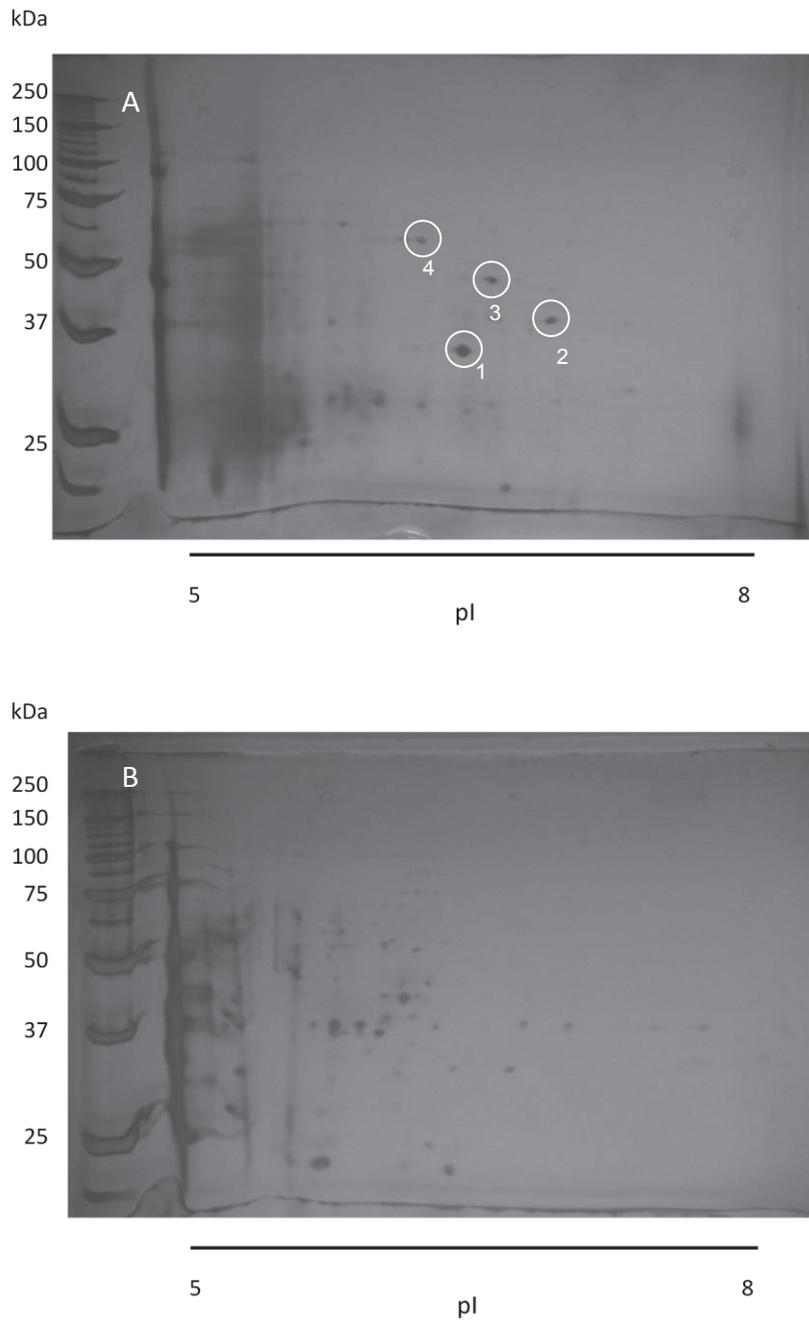


Figura 4.20. Análisis mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida teñidos con tinción de plata de polipéptidos de fracción de proteína de membrana de células de *A. venustensis* cultivadas con (A) *n*-dodecano y (B) acetato y fructosa.

De los *spots* aislados y analizados sólo se han obtenido resultados significativos de los spot 2 y 3 (**Tabla 4.4**).

Tabla 4.4. Proteínas de membrana de *A. venustensis* analizadas por electroforesis bidimensional y analizadas por espectrometría de masas.

Spot	Identificación por MS	Score	Microorganismo	Nº acceso GenBank
2	Citocromo P-450 alcano hidroxilasa	504	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	ACQ99381
3	Proteína de membrana implicada en la degradación de hidrocarburos aromáticos	53	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	ACF50011

La identificación de proteínas sobreexpresadas relacionadas con el metabolismo de los hidrocarburos reafirma la hipótesis de que la maquinaria proteica encargada de la degradación de alcanos es inducible por la presencia de hidrocarburos en el medio durante el crecimiento bacteriano.

Dentro de la familia de citocromos P-450, se conocen varias enzimas relacionadas con la degradación de alcanos y que se encuentran en el grupo de alcano hidroxilasas conocidas (van Beilen *et al.*, 2006). Aunque si bien es una proteína considerada soluble, en ocasiones se encuentra asociada a proteínas de membrana, y si realizamos una predicción de dominios transmembranales a partir de su secuencia, se puede detectar que existe un dominio en la enzima que podría estar asociado a la membrana. Es posible que en presencia de alcanos, el citocromo P-450 pueda asociarse a la membrana con otras enzimas para degradar los alcanos (**Figura 4.21**).

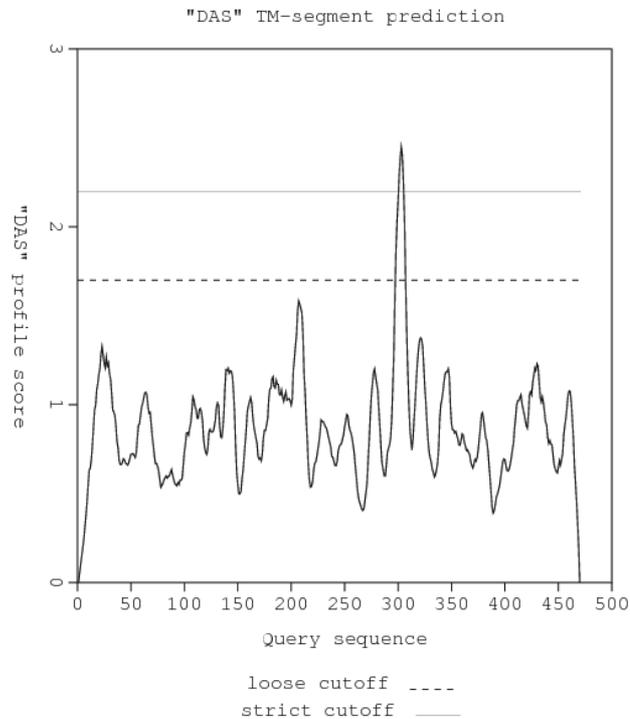


Figura 4.21. Perfil de hidrofobicidad y de posibles dominios asociados a membrana utilizando el índice DAS para la secuencia de citocromo P-450.

Además de esta enzima, se ha identificado otra relacionada con la degradación de hidrocarburos aromáticos en *Stenotrophomonas*. Al comparar mediante BLAST esta proteína con el género *Alcanivorax*, ésta presenta dominios de alta homología con varias proteínas conocidas en diferentes especies. Se trata de transportadores de membrana relacionados con las superfamilias de proteínas TodX y FadL, implicadas en el metabolismo del tolueno y el transporte de ácidos grasos respectivamente.

4.5. Eliminación de *n*-dodecano y aceite mineral por biomasa libre de *A. venustensis*.

*4.5.1. Eliminación de *n*-dodecano por biomasa libre de *A. venustensis* en discontinuo en cultivos de 100 ml.*

Se determinó la desaparición de *n*-dodecano en cultivos de *A. venustensis* en medio marino SM1 suplementado con dos concentraciones de *n*-dodecano. Se utilizaron 0,5% (v/v) y 1% (v/v) como concentraciones iniciales de hidrocarburo y se empleó una densidad inicial de biomasa de 0,2 UA₆₀₀.

Se fijó 5 días, como tiempo límite de biodegradación para todos los ensayos debido a que los resultados de los experimentos de adhesividad del hidrogel sugerían un tiempo de incubación no superior a 6 días.

En primer lugar se ensayó la biodegradación de la concentración más baja de contaminante. En la **Figura 4.22** se observa que cuando se utilizaba una concentración inicial de 0,5% (v/v) de *n*-dodecano, éste era eliminado a una velocidad constante hasta desaparecer, entre el primer y quinto día. La degradación se iniciaba a partir del primer día, puesto que hasta entonces no se observan diferencias entre los ensayos con biomasa libre y los controles de evaporación. Sin embargo, era durante el primer día de cultivo cuando la densidad celular en suspensión crecía hasta el máximo punto, a partir del cual comenzaba a flocular y adherirse a las paredes del matraz. Esto impedía una medición real de la biomasa y dificultaba su posterior cosecha.

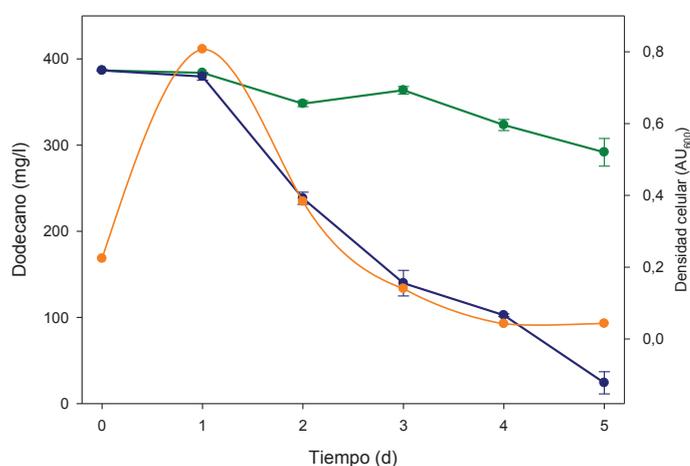


Figura 4.22. Degradación de *n*-dodecano por *A. venustensis* en medio líquido suplementado con 0,5% (v/v) de *n*-dodecano, medida utilizando GLC. Se muestran el control de evaporación (—), la degradación en los cultivos (—) y la densidad de biomasa de los cultivos en cada medida (—).

Se ensayó la biodegradación de *n*-dodecano a la concentración mayor, es decir 1% (v/v) de *n*-dodecano. En la **Figura 4.23** se observa que cuando se utilizaba una concentración superior, el contaminante no desaparecía por completo del medio en los 5 días propuestos para el ensayo. Sin embargo, el *n*-dodecano era degradado rápidamente hasta niveles bajos a partir del primer día de ensayo. Este resultado era similar al obtenido para la concentración de *n*-dodecano de 0,5% (v/v) y también se observaba un importante crecimiento de biomasa. La biomasa en suspensión se reducía drásticamente a partir del tercer día de ensayo, cuando las concentraciones de contaminante eran menores. Entonces, la biomasa floculaba y se adhería al matraz.

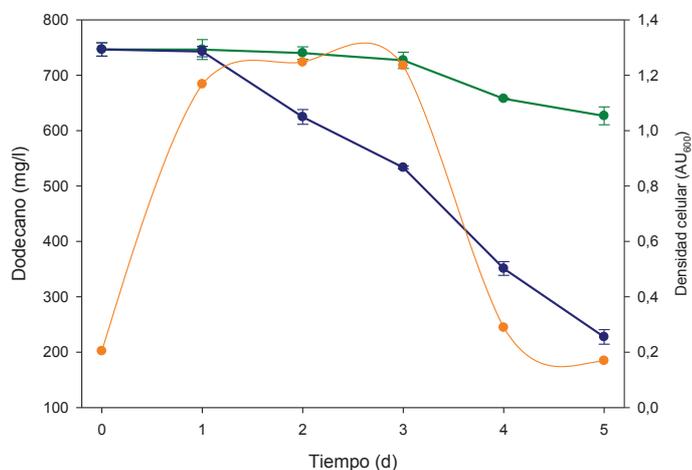


Figura 4. 23. Degradación de *n*-dodecano por *A. venustensis* en medio líquido suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano, medida mediante GLC. Se muestran el control de evaporación (—), la degradación en los cultivos (—) y la densidad de biomasa de los cultivos en cada medida (—).

4.5.2. Eliminación de aceite mineral por biomasa libre de *A. venustensis* en discontinuo en cultivos de 100 ml.

Se ensayó la capacidad de la biomasa de *A. venustensis* crecida en *n*-dodecano para degradar aceite mineral en medio líquido. Para ello, se inocularon cultivos de 100 ml de medio SM1, suplementado con 1% (v/v) de aceite mineral como única fuente de carbono y energía, con 0,2 UA₆₀₀. Para cada medida se usó la extracción con *n*-hexano de un matraz. Se utilizaron dos réplicas biológicas para cada punto, realizándose dos réplicas de cada muestra. Los resultados se muestran en la **Figura 4.24**.

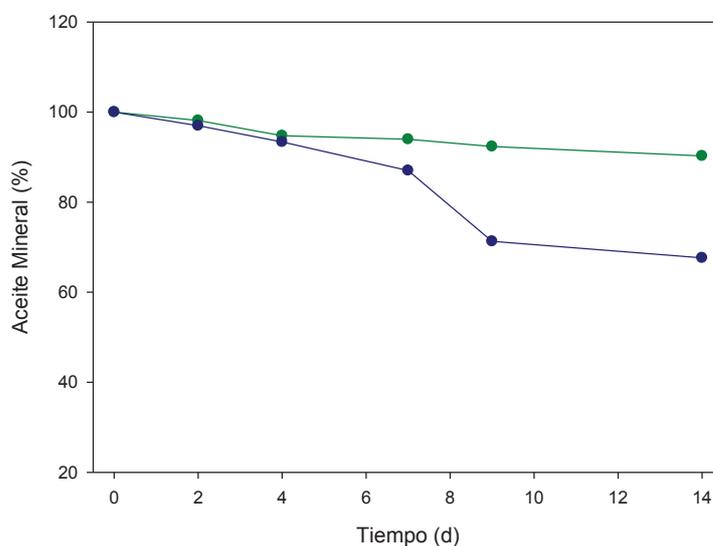


Figura 4.24. Degradación de aceite mineral por *A. venustensis* en medio líquido suplementado con 1% (v/v) de aceite mineral, medida mediante GLC. Se muestran el control de evaporación (—), y la degradación en los cultivos (—).

4.6. Inmovilización de biomasa fresca de *A. venustensis* en hidrogeles de quitosano-goma xantano.

Para estimar el porcentaje de biomasa inmovilizada por atrapamiento respecto al total de la biomasa ofrecida (**Tabla 4.5**), se calculó la biomasa no inmovilizada o liberada del hidrogel, mediante un conteo de unidades formadoras de colonias (ufc). Para ello, se ofrecieron a 0,5 g de hidrogel, 5 ml de cultivo celular concentrado (biomasa ofrecida), cuya densidad celular se calculó mediante plaqueo de diluciones seriadas de la muestra.

De forma posterior a la inmovilización, los tubos en los que se había llevado a cabo el atrapamiento se lavaron vigorosamente con medio de cultivo y se sembraron en placas de LB agar (no inmovilizada). Además, el hidrogel con células *A. venustensis* inmovilizadas, se lavó durante 30 minutos, en medio líquido con agitación media (biomasa liberada).

Para estos ensayos de inmovilización se utilizaron los concentrados celulares que aparecen en el apartado 4.6.3.

Tabla 4.5. Estimación de la biomasa inmovilizada por atrapamiento, utilizando medio marino SM1 en la rehidratación del hidrogel.

	Biomasa (ufc)	Porcentaje del total (%)	Error Std
Ofrecida	$1,324 \times 10^8$	100	$\pm 0,02$
Inmovilizada	$1,322 \times 10^8$	99,84	$\pm 0,01$
No inmovilizada	$1,531 \times 10^5$	0,11	$\pm 0,01$
Liberada	$5,166 \times 10^4$	0,04	$\pm 4 \times 10^{-3}$

Como muestra la **Tabla 4.5**, tanto las bacterias no inmovilizadas como las liberadas tras el lavado del hidrogel no superaban el 0,2% del total de las bacterias ofrecidas, es decir la tasa estimada de inmovilización era del 99,8%, cuando se utilizaba medio de cultivo SM1 para llevar a cabo la rehidratación. La tasa de inmovilización por atrapamiento es muy alta, demostrando que se trata de un sistema de inmovilización robusto.

4.6.1. *Efecto de la salinidad y el pH sobre la inmovilización de A. venustensis.*

Para evaluar el efecto de la ausencia o la presencia de una elevada concentración salina en el medio a la hora de realizar el proceso de inmovilización, se prepararon medios SM1 en ausencia de NaCl, por un lado y en presencia de 1 M de dicha sal por otro. Tanto el medio marino SM1, como el agua de mar, poseen concentraciones de cloruro sódico que se encuentran dentro del intervalo marcado por estas disoluciones. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.6**.

Tabla 4.6. Estimación de la biomasa inmovilizada por atrapamiento, utilizando medio marino SM1 con diferentes concentraciones de NaCl en la rehidratación del hidrogel.

Biomasa	Sin NaCl			1M NaCl		
	Biomasa (ufc)	Porcentaje del total (%)	Error Std	Biomasa (ufc)	Porcentaje del total (%)	Error Std
Ofrecida	$1,983 \times 10^8$	100	$\pm 15,68$	$1,730 \times 10^8$	100	$\pm 15,25$
Inmovilizada	$1,978 \times 10^8$	99,75	$\pm 0,03$	$1,725 \times 10^8$	99,72	$\pm 0,04$
No inmovilizada	$4,066 \times 10^5$	0,21	$\pm 0,03$	$3,933 \times 10^5$	0,24	$\pm 0,05$
Liberada	$7,333 \times 10^4$	0,04	$\pm 5 \times 10^{-3}$	$6,333 \times 10^4$	0,03	$\pm 2 \times 10^{-3}$

Como se puede observar, tanto la ausencia, como una concentración 1 M de NaCl, reduce ligeramente la estimación de la biomasa inmovilizada hasta valores muy similares. En ambos casos, el proceso que se ve afectado es el de la inmovilización inicial y no tanto el de la liberación de la biomasa previamente atrapada en el hidrogel. En ambas situaciones, las células que no han sido inmovilizadas se duplican, lo que sin embargo no afecta a la estimación, ya que en las dos situaciones experimentales el valor de biomasa estimada en el hidrogel se encuentra por encima de 99,7% del total ofrecido.

Otro factor que puede afectar a la inmovilización o a la reestructuración del hidrogel es el valor de pH del medio utilizado. Por ello se decidió evaluar su efecto utilizando un intervalo de valores en torno al valor promedio del agua de mar, que se encuentra entre 7,5 y 8,5 (Cheremisinoff, 1995). Para ello se prepararon disoluciones tamponadas de Tris-HCl 150 mM y 0,4 M de NaCl a pH 7, 8 y 9. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.7**.

Tabla 4.7. Efecto del pH sobre la inmovilización por atrapamiento de *A. venustensis* en hidrogeles de quitosano-xantano.

Biomasa	Biomasa (ufc)	Porcentaje del total (%)	Error Std
pH7			
Ofrecida	$1,513 \times 10^8$	100	$\pm 12,40$
Inmovilizada	$1,510 \times 10^8$	99,82	$\pm 0,05$
No inmovilizada	$1,733 \times 10^5$	0,12	$\pm 0,02$
Liberada	$8,333 \times 10^4$	0,06	$\pm 0,02$
pH8			
Ofrecida	$1,563 \times 10^8$	100	$\pm 19,64$
Inmovilizada	$1,558 \times 10^8$	99,64	$\pm 0,08$
No inmovilizada	$4,033 \times 10^5$	0,28	$\pm 0,07$
Liberada	$1,200 \times 10^5$	0,08	$\pm 0,02$
pH9			
Ofrecida	$1,536 \times 10^8$	100	$\pm 4,83$
Inmovilizada	$1,533 \times 10^8$	99,78	$\pm 0,09$
No inmovilizada	$2,266 \times 10^5$	0,15	$\pm 0,08$
Liberada	$9,666 \times 10^4$	0,06	$\pm 0,01$

Los resultados obtenidos muestran que el efecto del pH sobre el proceso de inmovilización es muy pequeño. A pH 7, similar al del medio SM1, la estimación de la biomasa inmovilizada, se aproxima mucho a la obtenida con el medio de cultivo. Sin embargo a pH 9, la biomasa no inmovilizada aumenta ligeramente y a pH 8, ésta casi se triplica. Sin embargo, no supone en ninguno de los casos más del 0,3% del total de biomasa ofrecida. Por ello se puede concluir que, si bien es significativo el efecto del pH sobre la biomasa no inmovilizada, es despreciable sobre la inmovilización.

*4.6.2. Efecto del agua de mar sobre la inmovilización de *A. venustensis* en hidrogeles*

Puesto que tanto el aumento de la salinidad como del pH del medio con el que se llevaba a cabo la inmovilización, no parecían tener un efecto significativo en los resultados, se evaluó si era posible realizar la inmovilización de *A. venustensis* utilizando agua de mar, lo que rebajaría en gran medida los costes económicos del material para la biorremediación. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.8**.

Tabla 4.8. Estimación de la biomasa inmovilizada por atrapamiento, utilizando agua de mar en la rehidratación del hidrogel.

Biomasa	Biomasa (ufc)	Porcentaje del total (%)	Error Std
Ofrecida	$1,258 \times 10^8$	100	$\pm 0,08$
Inmovilizada	$1,252 \times 10^8$	99,58	$\pm 0,09$
No inmovilizada	$5,10 \times 10^5$	0,38	$\pm 0,09$
Liberada	$4,125 \times 10^4$	0,03	$\pm 4 \times 10^{-3}$

Los resultados obtenidos se corresponden con lo esperado. Tanto la salinidad como el pH es mayor en el agua de mar utilizada para estos experimentos (0,6 M NaCl, $\text{pH} \approx 8,3$) que los del medio SM1, por lo que se esperaba un aumento en la biomasa no inmovilizada. Se observa un incremento considerable de la biomasa no inmovilizada, sin embargo, ésta sigue suponiendo menos del 0,4% del total de la biomasa ofrecida, por lo que se sugiere que una manera de reducir los costes económicos podría ser el uso de agua marina, en vez de un medio compuesto, químicamente complejo.

4.7. Eliminación de hidrocarburos por biomasa fresca inmovilizada de *A. venustensis*.

*4.7.1. Eliminación de n-dodecano por biomasa fresca de *A. venustensis* inmovilizada.*

Se ensayó la capacidad para biodegradar hidrocarburos de células de *A. venustensis* inmovilizadas a partir de cultivos frescos. Para ello, se cosecharon las células de cultivos de 100 ml con medio SM1 suplementado con 1% (v/v) de *n*-dodecano. La biomasa se lavó varias veces para eliminar restos de *n*-dodecano, se resuspendió en 15 ml de medio SM1 y finalmente se inmovilizó en 3 muestras de hidrogel. Con esto, la biomasa había sido concentrada sólo unas 6 veces.

Como muestra la **Figura 4.25**, se observó una ligera degradación de *n*-dodecano, tras un periodo de incubación de 18 días, sin observarse diferencias significativas respecto al control en las muestras anteriores. Estos resultados indicaban que no se podía utilizar esta tecnología de inmovilización para biorremediación *in situ* con el soporte del que se disponía, utilizando cantidades tan pequeñas de biomasa, puesto que se debían reducir los periodos de tratamiento por debajo de una semana.

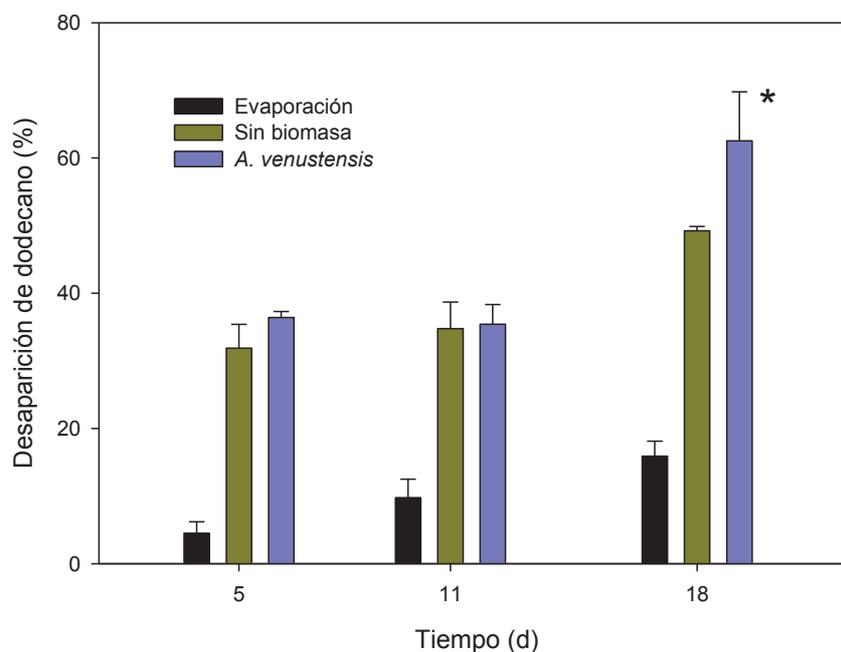


Figura 4.25. Degradación de *n*-dodecano utilizando biomasa de *A. venustensis* crecida en cultivos de 100 ml. Cada cultivo se utilizó para realizar 3 experimentos. Se muestra en negro el control de desaparición de *n*-dodecano mediante procesos abióticos, en verde la adsorción del *n*-dodecano al hidrogel y en azul la degradación usando biomasa inmovilizada. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

Puesto que se había comprobado que la biomasa de *A. venustensis* era capaz de degradar *n*-dodecano, aunque sin la velocidad necesaria, se concluyó que era necesario aumentar la cantidad de biomasa inmovilizada en el soporte, a fin de aumentar la tasa de degradación del alcano y por tanto reducir los periodos de incubación del producto.

4.7.2. Eliminación de aceite mineral por biomasa fresca de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles.

Se ensayó la capacidad para degradar aceite mineral de la biomasa de *A. venustensis* inmovilizada a partir de concentrados celulares. Cuando se obtenían concentrados celulares de una densidad muy elevada, en torno a 140 AU, se obtenían resultados significativos en tan solo 3 días de incubación (**Figura 4.26**). Pero la obtención de estos concentrados resultaba muy limitante puesto que era necesario cosechar 500 ml de cultivo, aproximadamente, para cada muestra.

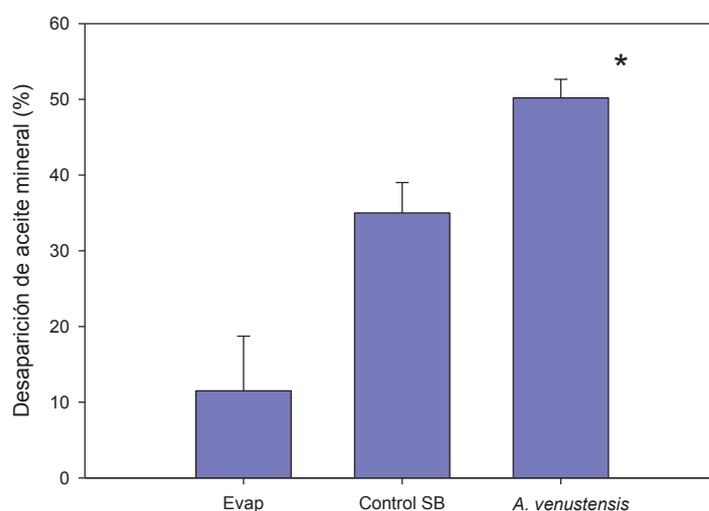


Figura 4.26. Degradación de aceite mineral utilizando biomasa de *A. venustensis* crecida en cultivos de 1 l. La biomasa se cosechó y resuspendió en un volumen pequeño para mejorar el rendimiento de la degradación. Se utilizan para cada experimento 0,5 g de hidrogel y 500 ml del cultivo de *A. venustensis*. Se obtienen resultados significativos tras 3 días de incubación. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

La cosecha de *A. venustensis*, se encontraba dificultada por la tendencia de las células a situarse en la interfase hidrocarburo-agua, a pesar de los procesos de centrifugación. Por esta razón fue necesario buscar alternativas que permitieran un mayor número de ensayos y un futuro abaratamiento del precio final del producto, manteniendo el rendimiento.

Se ensayó la capacidad degradativa de concentrados celulares con una densidad menor, en torno a 90 AU, lo que permitía realizar un número mayor de ensayos, ya que era necesario menos volumen de cultivo, aproximadamente la mitad. El tiempo de degradación se elevó de los 3 a los 5 días, pero se obtenían resultados similares (**Figura 4.27**)

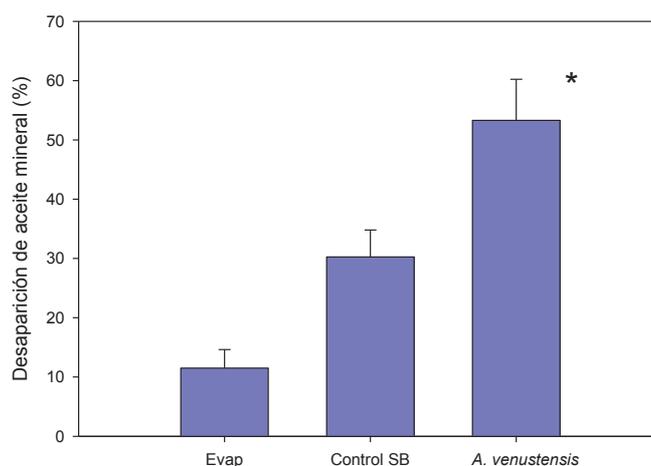


Figura 4.27. Degradación de aceite mineral utilizando biomasa de *A. venustensis* crecida en cultivos de 1 l. La biomasa se cosechó y resuspendió en un volumen pequeño para aumentar la velocidad de la degradación. Se utilizan para cada experimento 0,5 g de hidrogel y 250 ml del cultivo de *A. venustensis*. Se obtienen resultados significativos tras 5 días de incubación. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

Para experimentos posteriores, el tiempo de ensayo se estableció en 5 días, utilizando los concentrados de menor densidad celular, debido a las limitaciones a la hora de cosechar las células y a las características de adhesividad del soporte.

También se estudió si la degradación de aceite mineral se hacía de manera inespecífica, es decir, todos los alcanos desaparecían por igual o se degradaban sólo algunos de ellos. Los espectros de GLC/MS del aceite mineral antes y después de la degradación muestran que no existen diferencias importantes entre el perfil inicial y final de los alcanos presentes (**Figura 4.28**).

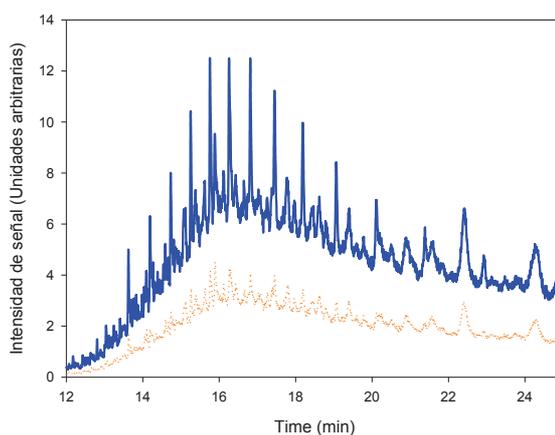


Figura 4.28. Espectro de GLC/MS de aceite mineral antes (—) y después de la incubación con biomasa inmovilizada (—). Se observa la reducción inespecífica de los picos de todos los hidrocarburos, sin diferencias apreciables entre alcanos de cadena par o impar.

Resultaba imposible medir la desaparición individual de cada alcano si se utilizaba en los experimentos aceite mineral como fuente de carbono y energía para la biomasa. Sin embargo, esto nos permitía calcular la cantidad de aceite mineral como el área bajo la curva entre 12 y 25 minutos.

4.7.3. Efecto de la temperatura.

Se caracterizó el efecto de la temperatura sobre la degradación de aceite mineral por células de *A. venustensis* inmovilizadas en hidrogeles. Para ello, se comparó la degradación a temperatura ambiente (22 °C) frente a la correspondiente a una temperatura elevada para un clima costero (37 °C) y una temperatura baja (4 °C).

Se realizaron controles de degradación abiótica y adsorción del hidrocarburo al hidrogel para cada temperatura. En la **Figura 4.29** se observa que tanto a 4 °C como a temperatura ambiente, se produce una degradación similar y estadísticamente diferente de los controles. Sin embargo, a 37 °C, no se produce biodegradación de aceite mineral. Los procesos de adsorción al soporte se mantienen constantes, aunque los procesos abióticos de degradación aumentan a 37 °C, debido a la mayor evaporación de los alcanos.

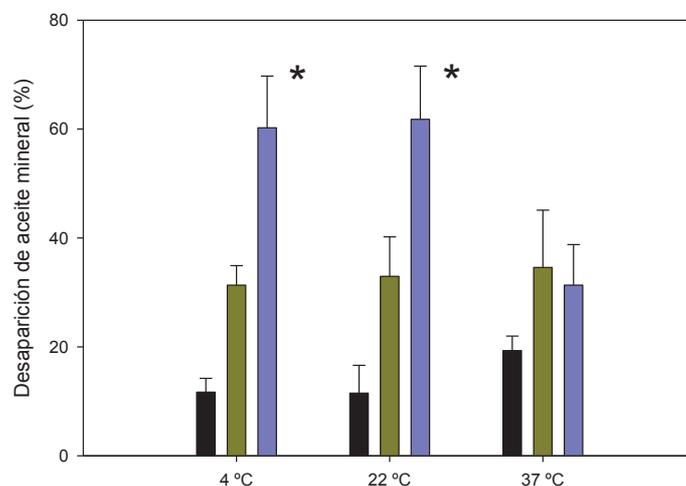


Figura 4.29. Efecto de la temperatura sobre la degradación de aceite mineral mediante biomasa de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles (en azul). Se han realizado controles de evaporación (en negro) y adsorción al hidrogel para cada una de las temperaturas (en verde). *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

El intervalo de temperatura de crecimiento de *A. venustensis*, oscila ente 4-40 °C (Fernández-Martínez *et al.*, 2003), aunque su temperatura óptima de crecimiento se reduce a 23-25 °C (Liu and Shao, 2005). *A. venustensis* resulta interesante, porque es la representante del género *Alcanivorax* que posee la temperatura de crecimiento más baja, y es la única capaz de crecer a 4 °C, aunque su crecimiento a altas temperaturas se encuentra limitado (Liu and Shao, 2005). Es posible que la desecación del soporte tenga también un efecto negativo sobre la degradación. A pesar de las continuas rehidrataciones del sistema, el soporte se deshidrata rápidamente, incluso cuando el ambiente está saturado de agua.

Si tomamos como referencia la costa gallega, como emplazamiento para la aplicación del producto, tenemos que la temperatura media en superficie es de aproximadamente unos 14 °C (www.aemet.es), y que la media de las temperaturas máximas mensuales más altas corresponden a Agosto con 22 °C, y la más baja de las mínimas a Enero, con 7 °C (periodo 1971-2000). Todos estos datos se encuentran dentro del intervalo de temperaturas de biodegradación de aceite mineral por *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles.

4.7.4. *Efecto del uso de agua de mar en la inmovilización y de la salinidad*

Se examinó la capacidad de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles para degradar aceite mineral, cuando el proceso de inmovilización se lleva a cabo con agua de mar. Además se estudió el efecto de la dilución del agua marina utilizada en el proceso. El medio de cultivo contiene 23 g/l de NaCl (además de otros iones cloruro y sodio), el agua de mar 35 g/l y su dilución a la mitad por tanto, 17,5 g/l.

En la **Figura 4.30** se muestra que células *A. venustensis* inmovilizadas son capaces de degradar aceite mineral en los tres casos. Aunque se observa cierta tendencia directa entre la concentración de sal y la degradación, puesto que la mayor biodegradación se produce utilizando agua marina, ésta no resulta estadísticamente significativa.

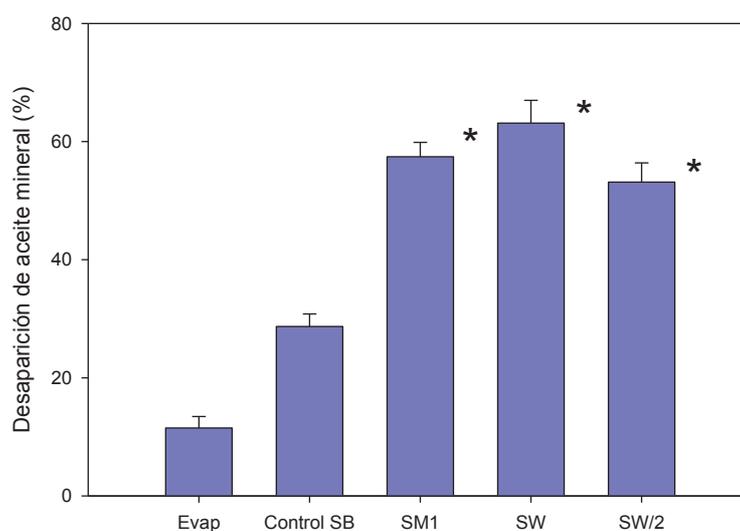


Figura 4. 30. Efecto del uso de agua de mar como disolución de inmovilización sobre la degradación de aceite mineral utilizando biomasa de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

El intervalo de salinidad en el que *A. venustensis* puede crecer está entre 1% y 20% (p/v), aunque su valor óptimo se encuentre entre 3% y 10% (p/v) (Liu and Shao, 2005). Los requerimientos salinos de esta especie son complejos, de manera que la presencia de NaCl no compensa la ausencia de otras sales, sin embargo sí que es posible que otras sales aporten iones salinos al medio. Por ello, *A. venustensis* crece de manera óptima en un medio que contiene tan solo 23 g/l de NaCl, puesto que presenta además una importante cantidad de otras sales con iones de sodio como de cloruro.

Esto otorga una gran variabilidad de aplicación del sistema para la biorremediación de sistemas marinos. Existen además connotaciones económicas importantes en el uso de agua de mar para la reestructuración del producto, puesto que esta posibilidad reduce de manera importante los costes de aplicación. Ya no sería necesario el uso de un medio de cultivo químicamente puro y controlado, y por tanto costoso.

4.7.5. *Efecto de la fuente de nitrógeno*

A pesar de que no se habían obtenido resultados positivos para el crecimiento de *A. venustensis* en medios con otras fuentes de nitrógeno diferentes al nitrato, la bibliografía relata el uso del amonio por parte de estos microorganismos (Fernández-Martínez *et al.*, 2003; Liu and Shao, 2005). Por ello, se estudió el efecto de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de *A. venustensis* para degradar aceite mineral cuando se encontraba inmovilizada en hidrogeles (**Figura 4.31**). Con este fin, la biomasa lavada y concentrada se resuspendió en medio SM1 variando en su caso la fuente nitrogenada. Se sustituyó el nitrato por cloruro amónico o acetato amónico. El pH de los medios modificados se ajustó al del medio original.

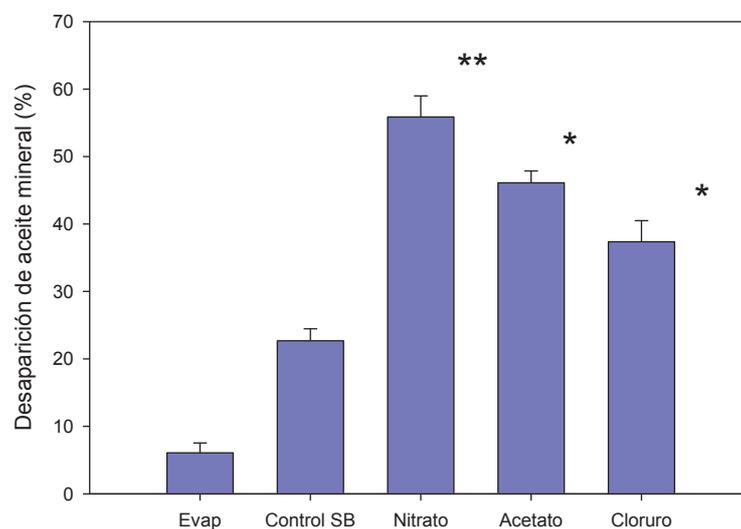


Figura 4.31. Efecto de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de inmovilización sobre la degradación de aceite mineral utilizando biomasa de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico. **Significativamente diferentes a los controles y al resto de muestras.

En la **Figura 4.31** se observa que *A. venustensis* inmovilizada en el soporte es capaz de degradar aceite mineral utilizando acetato amónico o cloruro amónico como fuente de nitrógeno. Sin embargo la tasa de degradación es menor que la obtenida cuando se utiliza nitrato sódico, que es la fuente de nitrógeno original del medio marino SM1. Además del bajo crecimiento de la biomasa utilizando amonio como fuente de nitrógeno, se estableció la hipótesis de que las cargas libres del hidrogel afectarían negativamente a la distribución iónica en el interior del hidrogel.

4.7.5.1. Permeabilidad del hidrogel a colorantes iónicos.

Para confirmar la hipótesis de que las cargas libres en el hidrogel influyesen en la distribución de los iones en el interior del mismo, se estudió la capacidad de dos colorantes cargados uno negativa y otro positivamente para distribuirse en el interior del hidrogel: el verde Janus, cargado positivamente y el azul de bromofenol cargado negativamente.

Se reestructuraron 0,5 g de hidrogel en tampón Tris 150 mM, pH 7,5. Se prepararon disoluciones 100 mM de cada uno de los colorantes y 0,6 M de NaCl en el tampón anterior. Se añadieron 10 ml de una de las dos disoluciones coloreadas a cada 0,5 g de hidrogel. Se siguió la desaparición de cada uno de los colorantes.

Tras 12 horas de incubación se puede observar que el azul de bromofenol ha penetrado en el hidrogel (**Figura 4.32a**), sin embargo el hidrogel no permitía el paso del colorante cargado positivamente (**Figura 4.32b**). Tras 72 horas de incubación la diferencia era mucho más acusada (**Figura 4.32c y 4.26d**). Incluso el colorante Verde Janus precipitaba por la ausencia de cloruro en el medio, que se distribuía en el interior del hidrogel (**Figura 4.32e**), puesto que tras la adición de HCl, el colorante se disolvía de nuevo en el tampón. Esto imposibilita el seguimiento de la desaparición de verde Janus ya que la aparición de los precipitados se producía rápidamente.

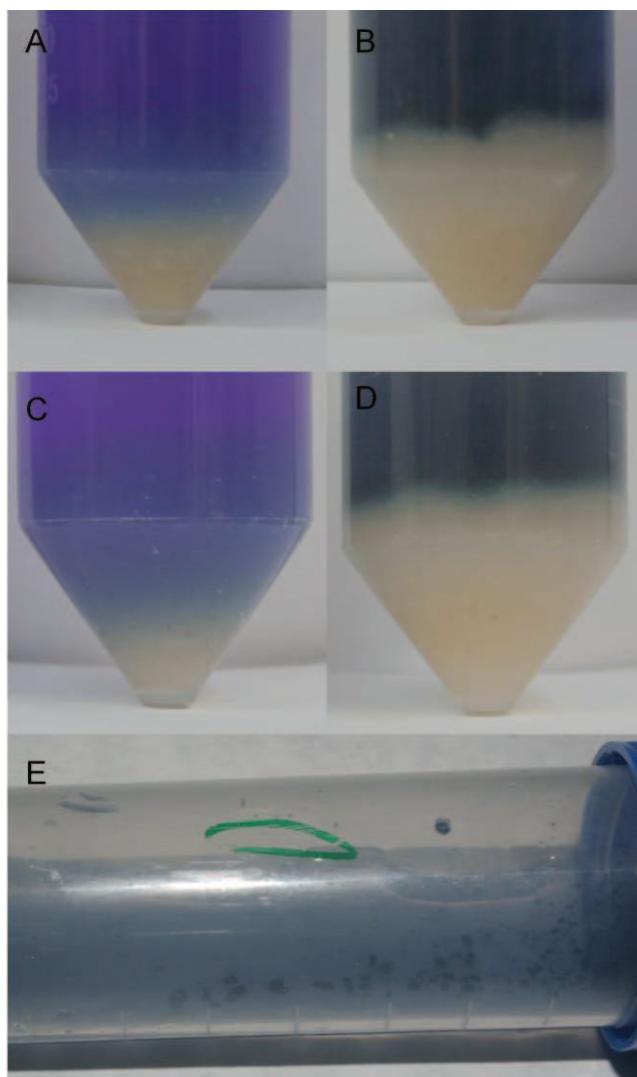


Figura 4.32. Difusión de iones de carga neta positiva (verde Janus) o negativa (azul de bromofenol) a través del hidrogel empleado como soporte de inmovilización de la biomasa, para estudiar la accesibilidad de las células a los nutrientes polares. Se muestran fotografías de hidrogeles incubados con colorantes a diferentes tiempos, (A) 12 horas con azul de bromofenol (B) y con verde Janus (C) y 72 horas con azul de bromofenol y (D) con verde Janus. Se muestra en (E) el precipitado de verde Janus cuando se reduce la concentración de iones Cl^- en el medio.

Estos resultados, apoyados en los datos teóricos de cargas libres en el soporte tras su polimerización, confirman la hipótesis del impedimento electrostático que sufren los iones cargados positivamente para distribuirse en el interior del hidrogel.

4.8. Eliminación de hidrocarburos por biomasa liofilizada inmovilizada de *A. venustensis*.

4.8.1. Biodegradación por biomasa liofilizada

Se evaluó la capacidad de la biomasa inmovilizada de *A. venustensis* procedente de líofilos para biodegradar aceite mineral. Se utilizó el sistema experimental habitual, sustituyendo en la inmovilización los concentrados celulares por biomasa liofilizada. Se disponía de biomasa liofilizada con dos criopreservantes diferentes, peptona de soja y sacarosa (**Figura 4.33**).

Se utilizó directamente la biomasa liofilizada, sin un proceso previo de hidratación. El periodo de incubación fue de 5 días, a 24 °C, con las mismas dosis de humectación del sistema. Se ensayaron 4 cantidades de biomasa inmovilizada: 50, 100, 300 y 500 mg, por cada muestra de 0,5 g (peso seco) de hidrogel.

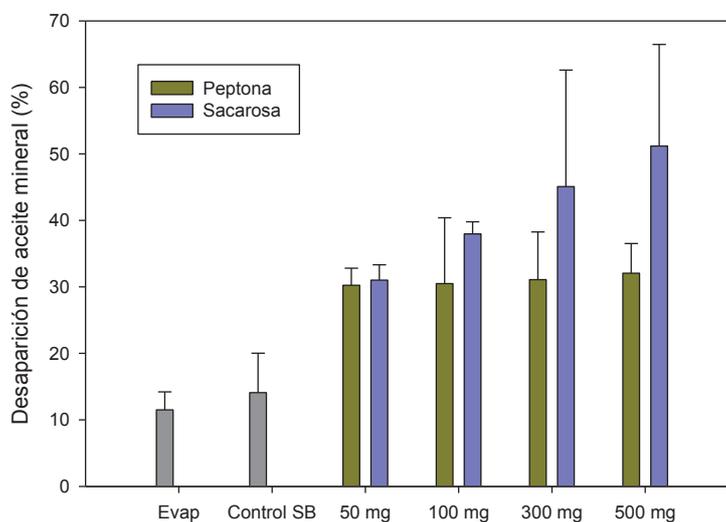


Figura 4.33. Relación entre la cantidad de biomasa liofilizada de *A. venustensis* y la degradación de aceite mineral. Se muestra en verde el liófilo con peptona de soja como criopreservante y en azul el liófilo que contiene sacarosa. En gris se muestran los controles de evaporación y del soporte sin biomasa inmovilizada.

En la **Figura 4.33** se muestra que la tasa degradativa de aceite mineral de la biomasa de *A. venustensis* es muy reducida en el caso del liófilo con peptona de soja. En el caso del que contiene sacarosa como crioprotector, la tasa es mayor y creciente con el aumento de la biomasa, sin embargo, también el error que se observa en el tratamiento de los datos entre cada muestra es muy elevado, haciendo que no existan diferencias estadísticamente significativas.

4.8.2. Tiempo de rehidratación de la biomasa

Existen referencias de procesos degradativos llevados a cabo mediante biomasa liofilizada sin procesos de hidratación previos (Erable *et al.*, 2005). Sin embargo, los procesos en los que se utilizan células liofilizadas, habitualmente requieren un paso previo en el que se lleva a cabo la rehidratación y revitalización de las mismas. El estudio de rehidratación de la biomasa se abordó desde dos estrategias diferentes. Era necesario conocer el momento en el que las células recuperaban su actividad respiratoria tras su inactivación. Por lo que se estudió la respiración del liófilo durante el periodo de rehidratación (**Figura 4.34**).

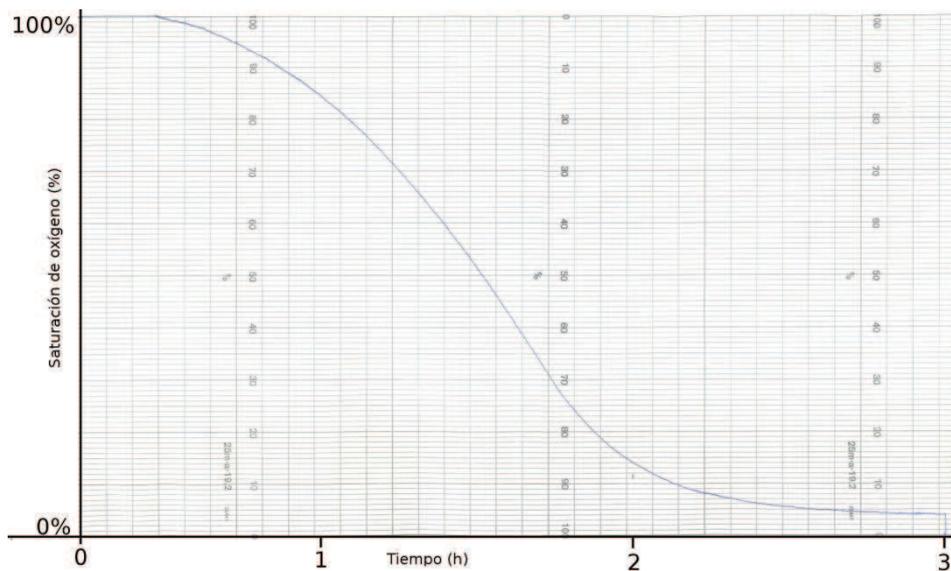


Figura 4.34. Curva de consumo de oxígeno durante la rehidratación de 0,5 g de liófilo de *A. venustensis* con 6 ml de medio SM1.

Se midió mediante un electrodo de oxígeno el estado respiratorio celular, utilizando 500 mg de biomasa liofilizada en 6 ml de medio. En la **Figura 4.34** se muestra que tras aproximadamente 20 minutos de incubación las células liofilizadas comienzan a consumir oxígeno. Este consumo empieza a estabilizarse tras 1 hora de incubación, aproximadamente, y se mantiene constante hasta las 2 horas. De estos resultados se puede extraer la conclusión de que las células necesitan al menos 30 minutos de hidratación para comenzar a respirar. Es necesario evaluar el tiempo óptimo de hidratación en base a la capacidad degradativa de la biomasa inmovilizada.

Para comprobar las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos mediante el estudio de la actividad respiratoria de los liófilos, se midió la actividad degradadora de hidrocarburos de la biomasa inmovilizada de *A. venustensis* en función del tiempo previo de rehidratación de las células liofilizadas. Se estudiaron 4 tiempos de rehidratación diferentes y se compararon con la degradación producida por el liófilo sin hidratar (**Figura 4.35**).

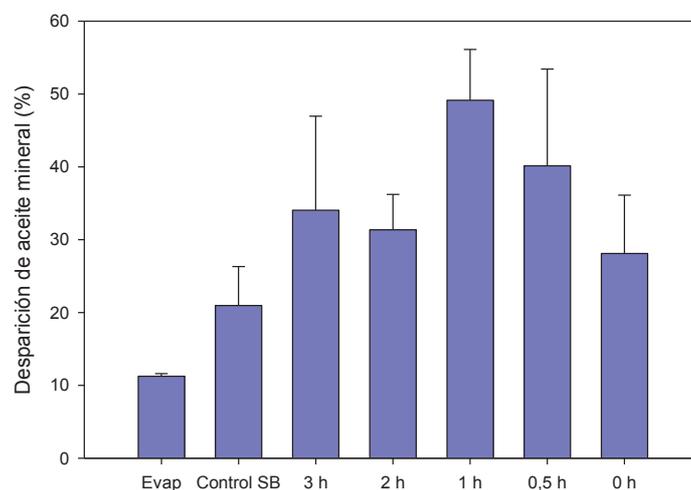


Figura 4.35. Efecto sobre la degradación de aceite mineral de la rehidratación previa a la inmovilización de la biomasa liofilizada. El tiempo de incubación de la muestra con aceite mineral es de 2 días.

En este momento del proyecto surgió un problema de posible contaminación fúngica del hidrogel, puesto que es un producto rico en carbono y nitrógeno, que fácilmente puede actuar como nicho de diversos microorganismos. Hasta este momento la irradiación con UV, era suficiente para neutralizar el crecimiento fúngico. Pero en los nuevos lotes de hidrogel la contaminación fúngica persistía, impidiendo el análisis de las muestras. Para solucionar el problema se redujo el tiempo de incubación a sólo dos días, lo que además, aseguraría la persistencia del soporte adherido a las rocas durante la acción bacteriana.

En la **Figura 4.35** se puede observar que los resultados se corresponden a lo esperado tras el análisis del estado respiratorio celular. Es con 1 hora de hidratación cuando se obtienen los mejores resultados en la degradación de aceite mineral. En el resto se obtienen algunas muestras con elevada degradación pero otras con una degradación ligeramente superior a los controles. Esta escasa reproducibilidad en los resultados indica que esas condiciones están lejos del óptimo, por lo que se utilizó un tiempo de hidratación de una hora para el resto de experimentos.

4.8.3. *Cantidad óptima de liófilo*

Una vez conocido el tiempo óptimo para la rehidratación de la biomasa, se procedió al estudio comparativo de la degradación de diferentes cantidades de liófilo inmovilizado. Se prepararon muestras con 100, 300 y 500 mg de liófilo y se ensayó su capacidad degradativa (**Figura 4.36a**).

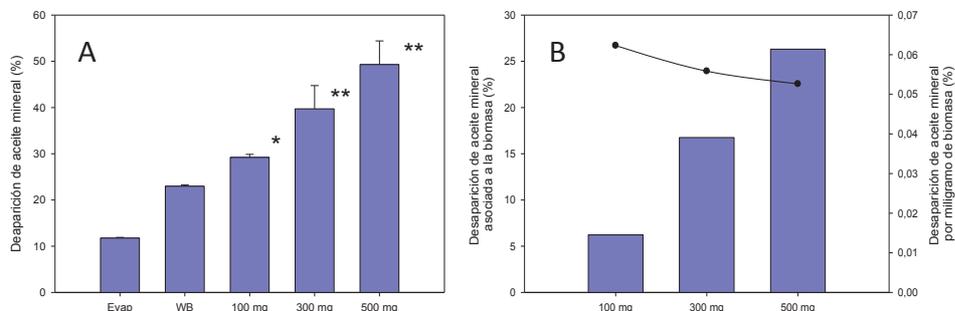


Figura 4.36. Estudio de la cantidad óptima de liofilo para la degradación de aceite mineral. (A) Degradación de aceite mineral utilizando 100, 300 y 500 mg de biomasa liofilizada. (B) Degradación de aceite mineral asignable a la biomasa en barras grises y degradación por unidad de peso con puntos. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico. **Significativamente diferentes a los controles y al resto de muestras.

Se observa que el aumento de biomasa conlleva un aumento en la desaparición de aceite mineral. Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas entre la inmovilización de 300 o de 500 mg de liofilo, la media de la degradación es mayor, y en todas las muestras con 500 mg excepto una, la degradación es mayor, por lo que se utilizó esta cantidad de liofilo para experimentos posteriores.

Además, cuando se compara la biodegradación media entre las tres diferentes cantidades (**Figura 4.36.b**) se observan diferencias notables, aunque no aparezcan como estadísticamente significativas. Si se observa la degradación específica, por cada miligramo de liofilo, ésta es menor con el aumento de la biomasa, sin embargo, entre las muestras de 300 y 500 mg, con las que se obtiene una mayor desaparición de contaminante, las diferencias son escasas, lo que apoya el uso de 500 mg de biomasa por cada 500 mg de hidrogel.

4.8.4. Efecto de la temperatura.

Se ha evaluado la capacidad de la biomasa de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles para degradar aceite mineral a diferentes temperaturas. Se han utilizado las mismas temperaturas que en la caracterización de la degradación de las bacterias inmovilizadas a partir de concentrados celulares, la temperatura óptima de crecimiento de *A. venustensis*, una temperatura relativamente fría (4 °C) y una temperatura que podemos asociar a los días muy calurosos en la costa (37 °C).

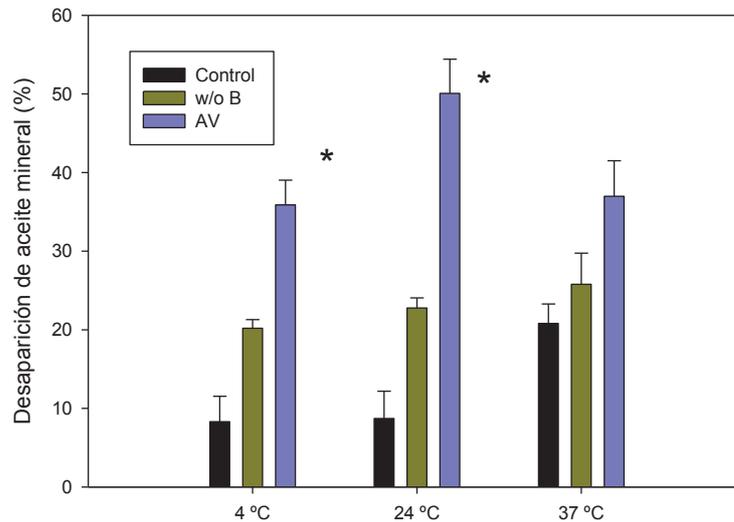


Figura 4.37. Efecto de la temperatura en la degradación de aceite mineral por biomasa liofilizada de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles. Se han realizado controles de evaporación y adsorción al hidrogel para cada una de las temperaturas. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

En la **Figura 4.37** se puede observar que la biomasa inmovilizada es capaz de degradar hidrocarburos del aceite mineral a cualquiera de las temperaturas empleadas, pues aumenta la desaparición media del contaminante en los tres casos. Sin embargo, a 37 °C este aumento no resulta significativo desde el punto de vista estadístico. Se observa un aumento considerable, aunque nos encontremos lejos de la temperatura óptima para la actividad bacteriana.

4.8.5. *Efecto de la fuente de nitrógeno.*

Se estudió el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la degradación de aceite mineral. Para las células liofilizadas, la presencia de nitrógeno en el medio continúa siendo limitante para la degradación de aceite mineral, puesto que si utilizamos un medio sin nitrógeno, la biomasa no es capaz de degradar hidrocarburos (**Figura 4.38**). Cuando se utiliza una fuente de nitrógeno diferente al nitrato (que es la habitual), la degradación se reduce ligeramente. Esto podría estar relacionado con la permeabilidad del hidrogel a los iones como se comentó anteriormente. Sin embargo, en este caso la biomasa es incubada en el medio antes de la adición del hidrogel, por lo que estos resultados indican que la biomasa es incapaz de almacenar nitrógeno, o al menos, que las condiciones de incubación no son suficientes para que la célula comience a producir reservorios de este elemento.

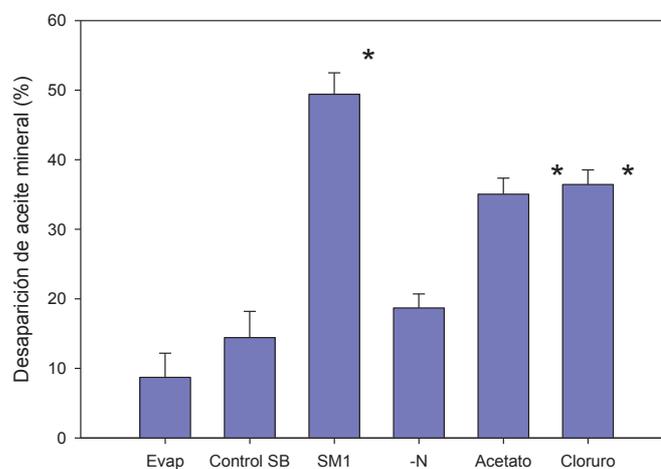


Figura 4.38. Efecto de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de inmovilización sobre la degradación de aceite mineral utilizando biomasa liofilizada de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

Observando estos resultados, se puede concluir que es necesario un aporte continuo de nitrógeno a las células, ya que estas no lo almacenan, y que éste ha de hacerse en forma de nitratos. Los nitratos, cargados negativamente, atraviesan fácilmente la matriz porosa del soporte, accediendo rápidamente al interior celular para su asimilación.

4.8.6. *Efecto del uso de agua de mar y agua potable*

Se estudió el efecto sobre la degradación de aceite mineral que tenía el uso, como medio de rehidratación, del agua de mar, agua de mar diluida o agua potable corriente. El desarrollo de un producto comercial implica un estudio de costes y en este caso el uso de medios baratos y accesibles es casi obligado para una futura comercialización, por lo que se ensayaron este tipo de medios de rehidratación. Por ello se utilizaron para rehidratar la biomasa antes de la inmovilización agua de mar, accesible y sin costes en una zona costera, agua de mar diluida, para reducir la salinidad, aunque también se diluyan los nutrientes y agua potable corriente, que a menudo tiene gran cantidad de sales, aunque también presenta alta concentración de cloro.

Como se puede observar en la **Figura 4.39**, *A. venustensis* no es capaz de degradar hidrocarburos cuando se utiliza agua potable para rehidratar la biomasa. Además, con el agua de mar y el agua de mar diluida, se obtienen resultados significativamente diferentes a los controles, pero la degradación es mucho menor que cuando se usa medio SM1 para la degradación.

Estos resultados limitan el uso de la biomasa liofilizada a la rehidratación de la biomasa con medio marino SM1, no pudiendo usarse los otros medios ensayados con la misma efectividad.

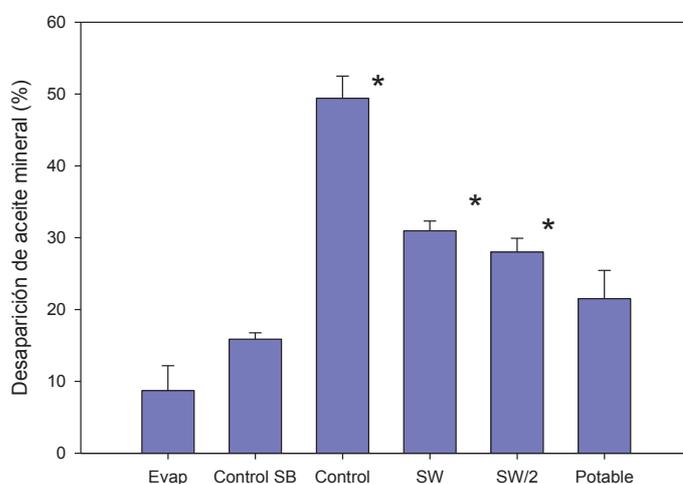


Figura 4.39. Efecto del uso de agua de mar y de agua potable como medio de inmovilización sobre la degradación de aceite mineral mediante biomasa liofilizada de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

4.8.7. Efecto de la suplementación de agua de mar

Con el fin de mejorar la degradación de aceite mineral usando agua de mar, para reducir los costes de la aplicación del producto, se suplementó el agua de mar, con compuestos inorgánicos de nitrógeno o de fósforo. Para ello, se usaron nitrato sódico o fosfato di-sódico. Cuando se suplementa con nitrato, no se mejoran los resultados, sin embargo al añadir el fosfato sódico, éste acidifica el agua de mar en el sistema experimental, debido al bajo poder tamponador del agua de mar, lo que probablemente dificulta la actividad degradativa de la biomasa inmovilizada (**Figura 4.40**).

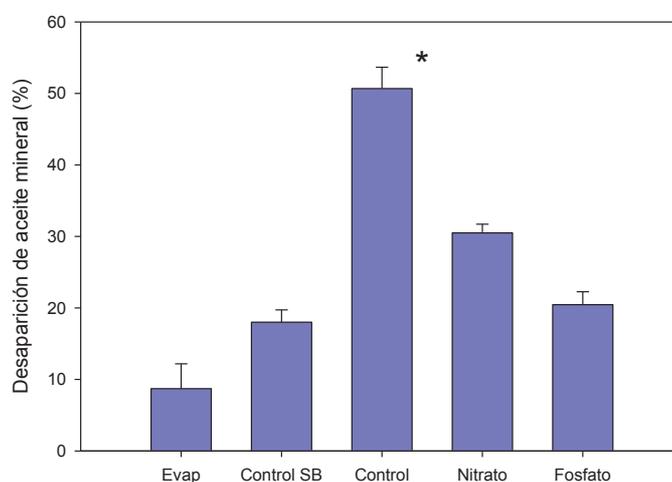


Figura 4.40. Efecto de la suplementación de agua de mar con nitrato sódico y fosfato sódico sobre la degradación de aceite mineral utilizando biomasa liofilizada de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

4.8.8. *Uso de fertilizantes para la degradación de hidrocarburos mediante biomasa inmovilizada.*

Aunque no se había producido crecimiento bacteriano usando fertilizantes comerciales para suplementar el agua de mar, se ensayó la degradación de aceite mineral usando bacterias inmovilizadas, usando fertilizantes en el medio de inmovilización. Se ensayó la degradación de bacterias cultivadas en el laboratorio, cosechadas y resuspendidas en agua de mar suplementada y bacterias liofilizadas con agua de mar suplementada para la rehidratación (**Figura 4.41**).

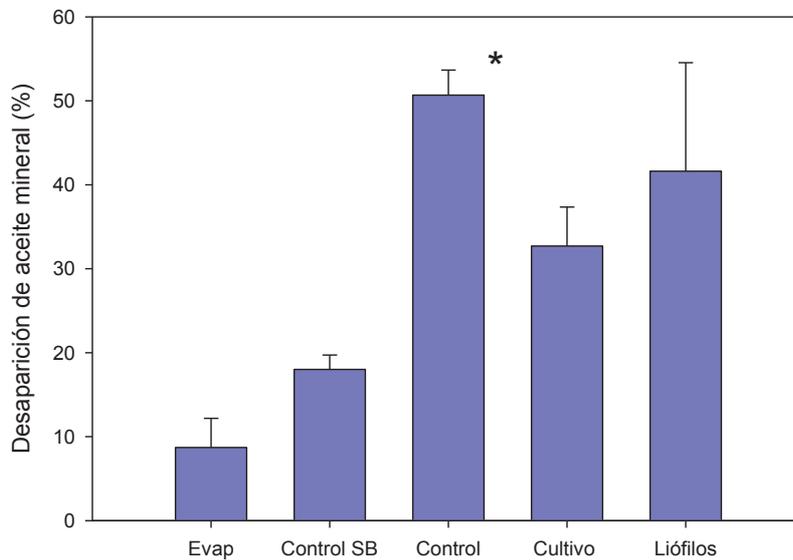


Figura 4.41. Efecto sobre la degradación de aceite mineral del uso de fertilizantes en la inmovilización. *Se han calculado como significativamente diferentes a los controles utilizando ANOVA como estudio estadístico.

Los resultados muestran que la biomasa cultivada en el laboratorio no es capaz de degradar aceite mineral de manera significativa cuando se resuspende en agua de mar con fertilizantes, y que la biomasa liofilizada degrada de media ligeramente más que la cultivada, pero la gran tasa de error que produce invalida su uso como producto de biorremediación.

4.9. Evaluación de la biomasa liofilizada de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles de quitosano-goma xantano.

Tras haber seleccionado las mejores condiciones para la degradación de aceite mineral mediante biomasa de *A. venustensis* liofilizada inmovilizada, se evaluó la eficiencia del proceso de inmovilización en hidrogeles de quitosano-xantano. Se utilizaron 0,5 g de biomasa, rehidratada durante 1 h con 6 ml de medio SM1. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.9**.

Tabla 4.9. Estimación de la biomasa liofilizada inmovilizada por atrapamiento, utilizando medio marino SM1 en la rehidratación del hidrogel.

Biomasa	Biomasa (ufc)	Porcentaje del total (%)	Error Std
Ofrecida	$4,491 \times 10^{10}$	100	$\pm 7,20$
Inmovilizada	$4,3543 \times 10^{10}$	96,94	$\pm 7,70$
No inmovilizada	$1,120 \times 10^9$	2,49	$\pm 0,10$
Liberada	$2,533 \times 10^8$	0,56	$\pm 0,06$

Como muestran los resultados, la biomasa ofrecida es dos órdenes de magnitud mayor, y el porcentaje de inmovilización estimada se reduce en varios puntos. Sin embargo, éste aún se mantiene a un nivel alto, en torno al 97%. Esto permite afirmar que el método de inmovilización para biomasa liofilizada se mantiene eficaz. Los resultados demuestran que este nuevo sistema de inmovilización utilizando biomasa y soporte liofilizados, es sencillo, rápido, económico y eficaz.

5. DISCUSIÓN GENERAL

El petróleo y sus derivados son contaminantes habituales a pequeña escala del medio marino, a través de diferentes procesos. Sin embargo, debido a su transporte vía marítima, y en muchos casos a su extracción del fondo sedimentario oceánico, periódicamente se producen grandes vertidos con consecuencias catastróficas para los ecosistemas implicados. En concreto, este trabajo se ve enmarcado en un momento en el cual la costa norte de la Península Ibérica acaba de sufrir una catástrofe ecológica sin precedentes en la zona.

Existen diferentes métodos para remediar estos vertidos en mar abierto, donde el crudo puede ser recuperado, o incluso en las playas, donde la arena contaminada es recogida y tratada. Sin embargo, en las zonas rocosas y acantilados costeros la contaminación con crudo de petróleo es persistente y a menudo los métodos físico-químicos utilizados no son eficaces. Este tipo de ambientes no permiten procesos de remediación *ex situ*, ya que las grandes rocas no pueden ser transportadas para su tratamiento.

Por ahora, y en concreto en el caso del desastre del *Prestige*, se han aplicado diferentes métodos, pero sin resultados concluyentes. Por ejemplo, se ha utilizado un producto de bioaumentación, L1800 (Bio-System Co., EEUU), que consiste en un consorcio bacteriano que combina bacterias aerobias y anaerobias facultativas, junto con micronutrientes y un surfactante biodegradable. Su aplicación se ha realizado utilizando agua a alta presión y los resultados ha sido poco reproducibles (Fernández-Álvarez *et al.*, 2006).

Por ello, en este trabajo se pretendía desarrollar un sistema o producto biotecnológico capaz de adherirse a las rocas de estos ecosistemas, dañados por vertidos de crudo, y mantener en contacto con el contaminante a células bacterianas capaces de biodegradar hidrocarburos, ubicuas en ambientes marinos de todo el planeta. Para este desarrollo era necesaria la selección de un soporte para la inmovilización celular, que fuera adhesivo, biodegradable, de bajo coste y que permitiera el intercambio de nutrientes entre el entorno y la biomasa inmovilizada. Además, era necesario seleccionar una cepa bacteriana que cumpliera unos requisitos concretos. La cepa debía haber sido aislada en el medio marino, ser completamente inocua para el ser humano y los seres vivos del medio, no debía encontrarse modificada genéticamente (para que pudiera ser introducida en un ecosistema abierto como el marino) y debía de ser capaz de degradar hidrocarburos de manera eficaz, tanto en forma libre como inmovilizada. Además, debíamos ser capaces de obtener gran cantidad de biomasa de forma sencilla y económica, y además debíamos asegurarnos de que la introducción de este producto no alteraría el equilibrio bacteriano del ecosistema.

Para la selección del soporte de inmovilización se eligió utilizar hidrogeles poliméricos, debido a su alta permeabilidad a sustratos, su compatibilidad biológica y biodegradabilidad. Se han publicado en numerosas ocasiones los usos biotecnológicos de hidrogeles de este tipo, (Chia-Hong *et al.*, 1996; Magnin *et al.*, 2001; Degiorgi *et al.*, 2002; Magnin *et al.*, 2003; Cunningham *et al.*, 2004; Farris *et al.*, 2009). Se escogió la combinación de goma xantano y quitosano, ya que ésta se encuentra ampliamente descrita y además, estos compuestos son de uso común en la industria alimentaria, por lo que cabía la posibilidad de obtener estos materiales de forma económica y sencilla.

Hasta ahora, en la bibliografía consultada, se había utilizado entre otros el polivinil alcohol como soporte de inmovilización, sin embargo, este soporte necesita la presencia

Además de la adhesión a superficies sólidas, era necesario caracterizar la capacidad del soporte para inmovilizar biomasa. En un producto biotecnológico pensado para el desarrollo comercial, el método de inmovilización ha de ser sencillo, por lo que se optó por la desecación y triturado del soporte, para realizar más tarde la reestructuración del mismo en presencia de biomasa. Una de las opciones más comunes de inmovilización de células enteras es la incursión de las mismas en el proceso de formación del soporte (Kaya and Picard, 1996; Song *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2006; Fierro *et al.*, 2008). Pero en este caso, la presencia de ácido acético podía influir negativamente en la viabilidad de la biomasa, por lo que se optó por realizar un proceso de reestructuración del soporte una vez eliminado el ácido acético.

Primero se comprobó mediante SEM que el proceso de reestructurado no modificaba sustancialmente la estructura aparente del hidrogel. Se observa que no existen diferencias evidentes de su estructura a nivel microscópico. Posteriormente, se comprobó mediante DSC la presencia en el soporte de la cantidad de agua suficiente para que la biomasa sea capaz de revitalizarse para llevar a cabo su actividad. En los ensayos de DSC se observa que el hidrogel desecado y reestructurado es capaz de retener mayor cantidad de agua, sin embargo, permite la presencia de un 70% de agua libre, una cantidad importante y suficiente para la viabilidad y actividad metabólica bacteriana.

Una vez seleccionado el soporte para la inmovilización celular, era necesario seleccionar una entre las diferentes cepas bacterianas estudiadas capaces de degradar hidrocarburos. El proceso selectivo comenzó con cuatro cepas, todas ellas del grupo de riesgo biológico 1, de las cuales era necesario escoger una en base a dos criterios previos. Las bacterias degradadoras de hidrocarburos incrementan rápidamente su número durante procesos como los grandes vertidos de crudo, pero su presencia disminuye hasta niveles por debajo de la detección cuando no hay petróleo en el medio, por lo que son muy útiles para procesos de biorremediación, puesto que no se comportan como un elemento artificial introducido en el medio (Rojo, 2009).

Para desarrollar un producto de descontaminación comercial es necesaria la obtención de biomasa en grandes cantidades, y esta biomasa ha de ser capaz de degradar la mayor gama posible de alcanos o compuestos de petróleo. Además, ha de ser capaz de hacerlo cuando se encuentra inmovilizada en el soporte. *A. venustensis* era capaz de degradar alcanos de cadena media como el *n*-dodecano y de cadena larga como los componentes del aceite mineral. Además, el cultivo en medio mineral permitía la obtención de las mayores cantidades de biomasa. *M. hydrocarbonoclasticus* poseía una capacidad degradativa mayor que *A. venustensis*, sin embargo, la cantidad de biomasa que podía conseguirse era mucho menor, por lo que se eligió para este estudio la cepa de *A. venustensis*.

El principal problema para la obtención de biomasa, tanto de *A. venustensis* como de *M. hydrocarbonoclasticus*, es que estas cepas bacterianas, cuando crecen en presencia de hidrocarburos han de modificar la polaridad de su membrana para poder entrar en contacto con la fuente de carbono (Sekelsky and Shreve, 1999; Olivera *et al.*, 2009). Esto implica, en primer lugar, que existe contacto directo entre la biomasa y el contaminante, por lo que resulta complicada la separación por centrifugación de la biomasa de la epifase orgánica, y por tanto su cosecha. Además, esa modificación de la polaridad de la membrana hace que la biomasa disminuya su capacidad para permanecer en suspensión en medio acuoso y flocule durante el crecimiento.

La floculación es mayor en *M. hydrocarbonoclasticus* que en las demás bacterias estudiadas, tanto que su uso como producto comercial es inviable, ya que la gran mayoría de la biomasa se sitúa en la interfase entre la fase acuosa y el hidrocarburo, a pesar de que su eficacia a escala de laboratorio es elevada, incluso mayor que la de *A. venustensis*. Aunque el estudio de crecimiento se ha realizado con las cuatro cepas bacterianas y el estudio de biodegradación se ha llevado a cabo con *M. hydrocarbonoclasticus* y *A. venustensis*, solo se incluyen en este trabajo los resultados obtenidos con esta última.

Se ha estudiado el crecimiento de la biomasa tanto en función de la fuente de carbono, como en función de su fuente de nitrógeno, ya que este último elemento es limitante en el crecimiento bacteriano. Se ha comprobado que *A. venustensis* es capaz de crecer utilizando sustratos como *n*-dodecano o aceite mineral, pero además es capaz de crecer en medio rico como LB siendo capaz de utilizar acetato y fructosa para crecer. Sin embargo, la biomasa no aclimatada a hidrocarburos es incapaz de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía de forma inmediata, por lo que se necesita adicionarlos en el medio de cultivo, con los problemas para la cosecha de la biomasa que conlleva. Esta situación se solventó con el uso de mayores volúmenes de cultivo.

Una interesante opción para la obtención de biomasa de *A. venustensis* de manera económica era el uso de fertilizantes comerciales como medio de cultivo, con un coste económico mucho menor que el de los reactivos químicos utilizados en la preparación del medio SM1, para suplementar agua de mar. Sin embargo, solamente la biomasa crecida en medio SM1, con *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía ha podido ser utilizada posteriormente para la degradación de hidrocarburos, ya sea por la baja producción de biomasa de algunos medios, o por la baja actividad degradativa de las bacterias crecidas en otros medios.

De los ensayos de biodegradación se deduce que para degradar aceite mineral es necesaria la presencia de una mayor cantidad de biomasa inicial, ya que cultivos inoculados con la misma densidad bacteriana eran capaces de degradar 1% (v/v) de *n*-dodecano hasta niveles muy bajos en tan solo 5 días. En cambio, cuando el contaminante presente en los cultivos es de cadena más larga, como en el caso del aceite mineral, a la misma concentración celular, éste se reduce apenas un 30% en 2 semanas. Este hecho queda de manifiesto de nuevo, cuando es necesario concentrar varias veces los cultivos cosechados antes de ser inmovilizados. Si estos cultivos no se concentraban al menos 50 veces, no se observaba degradación significativa en los plazos necesarios.

Puesto que se habían seleccionado soporte y cepa bacteriana, se procedió a caracterizar la inmovilización de la biomasa al soporte seleccionado. Dado que los métodos directos e indirectos habían resultado de escasa utilidad, se realizó una estimación de la biomasa inmovilizada. Aunque el método no sea exacto, sí que revela una alta reproducibilidad, e indica que el método de inmovilización parece independiente del medio usado para llevarla a cabo. En ninguno de los casos estudiados la biomasa no inmovilizada es superior al 0,5% del total ofrecido, por lo que el método parece fiable y robusto. La biomasa queda atrapada en el interior del soporte poroso, durante la reestructuración del hidrogel, es decir durante la formación de la red tridimensional que forma el soporte hidratado. El proceso además es sencillo y rápido, lo que favorece su posible uso comercial.

Si bien el pH, la salinidad o el uso de agua de mar no son relevantes para el proceso de inmovilización en este caso, sí que lo son para la degradación de alcanos. Cuando se ha estudiado la capacidad de *A. venustensis* inmovilizada en el soporte para degradar hidrocarburos, ésta era muy sensible a cambios de salinidad, temperatura, fuente de nutrientes y pH.

Como se ha comentado con anterioridad, es necesaria una cantidad de biomasa elevada para que ésta produzca un efecto degradativo significativo sobre la concentración de aceite mineral, si bien ésta no es mayor que la utilizada en otros trabajos (Radwan *et al.*, 2002; Gentili *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2006). Se han empleado aproximadamente del orden de 10^8 ufc por gramo de material de soporte, lo que se encuentra 1 ó 2 órdenes de magnitud por debajo de los trabajos anteriormente citados. Esta reducción en la densidad celular necesaria para observar degradación de aceite mineral, puede deberse a la alta efectividad del soporte para retener alcanos, lo que mantiene en contacto continuo la biomasa con el contaminante, facilitando la degradación.

Para estos ensayos de degradación de aceite mineral se ha desarrollado un sistema experimental simple, que permite mimetizar las condiciones ambientales y modificar algunos parámetros. Era necesario realizar una gran cantidad de ensayos para hacer que los resultados fueran estadísticamente válidos, por lo que el sistema debía de ser sencillo, pequeño y requerir poco material. Este sistema ha resultado ser idóneo para las intenciones de este trabajo. Ya que ha permitido el estudio del efecto de numerosos factores sobre la degradación de alcanos usando biomasa de *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles.

Una vez comprobado que las células inmovilizadas de *A. venustensis* son capaces de degradar aceite mineral con elevada eficacia, se caracterizó el efecto de la temperatura sobre el proceso. Dado que se trata en principio de un producto biotecnológico que pretende aplicarse en un sistema abierto y no controlado, resulta de utilidad conocer el intervalo de temperaturas en el que podría ser eficaz. Este proyecto, como ya se ha comentado, se enmarca en una situación geográfica concreta, aunque no limitada únicamente a ese lugar, por lo que se tomaron como referencia las medidas de temperatura de esa zona en particular. Si bien estas temperaturas son extrapolables a muchas zonas del planeta. Se ha observado que la biomasa es capaz de degradar aceite mineral entre 4 y 24 °C de forma eficaz, y que a medida que aumenta la temperatura, su eficacia disminuye. En este caso, este producto podría ser utilizado sin problemas de temperatura, en la zona para la que fue diseñado, pero además podría ser utilizado en cualquier lugar con una temperatura que oscilara entre 4 y 24 °C, que es parte importante de las zonas marinas del planeta.

Cuando se examinó el efecto de la salinidad y del uso de agua de mar sobre la degradación de biomasa inmovilizada, los resultados han mostrado que no existe efecto estadísticamente significativo. Así, cuando se inmoviliza biomasa a partir de cultivos líquidos, ésta es capaz de degradar hidrocarburos en un intervalo de concentración de sales relativamente amplio. Así, *A. venustensis* es capaz de crecer en un intervalo salino entre 1% y 20%, aunque la concentración óptima de sal se encuentre entre 3% y 10% (Liu and Shao, 2005). Esto hace de *A. venustensis* una cepa bacteriana atractiva con una elevada versatilidad en cuanto a la presencia de sales en el medio. Además, el uso de agua de mar permite una reducción importante del costo de aplicación del producto biotecnológico para la biorremediación de hidrocarburos.

Dado que la bibliografía recoge el uso de compuestos de amonio para el crecimiento de *A. venustensis* (Fernández-Martínez *et al.*, 2003; Liu and Shao, 2005), resultaba necesaria la evaluación del proceso de biodegradación en presencia de iones amonio. Los resultados han sido relativamente negativos, lo que se explica en parte por el bajo rendimiento del crecimiento de *A. venustensis* en presencia de amonio, y por la distribución de cargas eléctricas en el hidrogel. Los ensayos realizados con colorantes cargados eléctricamente han mostrado que los iones negativos tienen una mayor penetrabilidad que los positivos. Dado que el nitrógeno es un elemento esencial para la actividad bacteriana, éste ha de suministrarse en forma de iones negativos (nitrato).

Este proceso de limitación en la difusión de algunos compuestos podría afectar a la disponibilidad de oxígeno atmosférico, esencial para la respiración y la biodegradación aerobia de hidrocarburos. Sin embargo, este efecto puede reducirse o anularse si la aplicación del producto se realiza adecuadamente. Para ello, es necesario extender lo más posible el producto en una fina lámina, ya que cuanto menor sea el espesor que el gas ha de atravesar, menor será la resistencia del hidrogel. Este efecto se produce para todos los compuestos, incluido el sustrato a hidrolizar, por lo que la correcta aplicación del producto será esencial para su eficacia. Todos los ensayos se han llevado a cabo utilizando una delgada capa de producto.

Así, se ha desarrollado un producto biotecnológico capaz de degradar alcanos de cadena media y larga, usando como solución para la inmovilización tanto medio marino sintético como agua de mar. Sin embargo, el producto no puede aplicarse de forma continua, puesto que la biomasa húmeda es difícilmente conservable y a menudo requiere congelarse para mantener su actividad. Además, el manejo de cultivos líquidos o concentrados celulares a gran escala no es adecuado para un producto que pretende una aplicación rápida, directa y lo más generalizada posible. Para solventar el problema de aplicación, se diseñó un sistema novedoso de inmovilización de biomasa utilizando tanto el soporte como la biomasa liofilizados, lo que implica el uso de dos productos sólidos en estado de polvo que han de ser rehidratados.

Inicialmente se planteó el uso de una mezcla del soporte y la biomasa liofilizados para ser rehidratados en el mismo momento de su empleo. Sin embargo, los resultados indican que es necesario rehidratar la biomasa con anterioridad, ya que tanto las células liofilizadas como el soporte compiten por el agua disponible del medio de rehidratación. Además, cuando el soporte ha sido secado y triturado, éste demanda una cantidad mayor de agua asociada, por lo que se hace indispensable la rehidratación previa de la biomasa. De esta manera se solventa el problema del mantenimiento del producto en perfectas condiciones, ya que la biomasa liofilizada es capaz de degradar hidrocarburos cuando se inmoviliza, incluso en menor tiempo que los concentrados celulares y además su conservación es sencilla.

Además se ha demostrado que el proceso de inmovilización celular es igualmente eficaz y robusto cuando se han utilizado tanto la biomasa como el soporte en estado sólido deshidratado. Si bien se reduce la eficiencia general del proceso, la carga bacteriana del hidrogel puede ser mayor cuando se utiliza biomasa liofilizada, ya que la cantidad de biomasa que es posible utilizar es sensiblemente mayor.

A pesar de su mejor conservación, la biomasa que ha sido liofilizada es más sensible a los efectos tanto de la temperatura como de la salinidad del medio, lo que limita su aplicación en cierta medida. Cuando se examinó el efecto de la temperatura sobre la degradación de aceite mineral, se observó que a pesar de mantener cierta actividad degradativa a 4 °C y a 37 °C, ésta era menor que la producida a temperatura óptima. Esto difiere de lo esperado y de lo que se había obtenido en los ensayos con biomasa fresca concentrada a partir de cultivos líquidos. Es necesario tener en cuenta que esta degradación se ha llevado a cabo en tan solo 3 días de incubación, frente a los 5 días que habían empleado las muestras con concentrados.

El efecto más crítico sobre la degradación de hidrocarburos se presenta cuando se utiliza agua de mar para rehidratar la biomasa. En este caso, la biomasa es incapaz de degradar aceite mineral de forma eficaz en comparación con el control usando medio SM1. Esto limita de forma considerable la aplicación del producto con un costo reducido, puesto que es necesario utilizar un medio sintético. Además, la suplementación del agua de mar con sales inorgánicas con fósforo o nitrógeno no ha producido resultados positivos.

De este modo, se ha demostrado que *A. venustensis* inmovilizada en hidrogeles de quitosano y goma xantano es capaz de degradar hidrocarburos, que existe la posibilidad de liofilizar la biomasa para mejorar su conservación y facilitar su aplicación. Además, esta tecnología podría utilizarse como producto biotecnológico para la biorremediación de zonas contaminadas con hidrocarburos. Si bien, la biomasa liofilizada forma un producto menos robusto para la biorremediación de hidrocarburos en zonas rocosas.

Además, de cara a conocer las razones por las cuales no es posible obtener biomasa activa para la degradación de hidrocarburos utilizando algunos medios de cultivo ricos con los que se obtiene gran cantidad de biomasa, se ha estudiado el carácter aparentemente inducible de la degradación de hidrocarburos por parte de *A. venustensis*. El genoma de esta especie bacteriana no se ha secuenciado, por lo que la identificación de polipéptidos se ha llevado a cabo utilizando su parentesco filogenético con *A. borkumensis* cuyo genoma está completamente secuenciado. De este modo, la identificación de polipéptidos es más difícil ya que la posibilidad de que exista alguna diferencia significativa de la homología de secuencia entre las proteínas de ambas especies reduce la probabilidad de identificación.

Aún así, se ha encontrado que algunas proteínas de *A. venustensis* del ciclo del glioxilato se encuentran sobreexpresadas en células que han crecido en presencia de *n*-dodecano. Si bien esto no explica el retraso en la degradación de alcanos, cuando la biomasa no está aclimatada a alcanos, indica que existen diferencias en la expresión proteica entre ambas condiciones de cultivo, tal y como se ha demostrado anteriormente con *A. borkumensis* (Sabirova *et al.*, 2006). En la inducción del sistema degradativo de *A. borkumensis*, uno de los procesos metabólicos sobreexpresados es precisamente el ciclo del glioxilato, que permite a la célula la biosíntesis *de novo* de macromoléculas a partir de intermediarios de dos átomos de carbono.

El estudio del proteoma a nivel de membrana, sólo ha permitido identificar dos proteínas implicadas en la degradación de hidrocarburos, el citocromo P-450, una proteína soluble implicada directamente en la oxidación de alcanos a ácidos grasos, que posee en su estructura una posible zona de interacción con la membrana. La otra proteína identificada está relacionada con dos familias de proteínas encargadas de la degradación del tolueno y el transporte de ácidos grasos, si bien su presencia en el género *Alcanivorax* aun no ha sido descrita. Esto podría sugerir la presencia en *A. venustensis* de cierta actividad degradadora de hidrocarburos aromáticos.

6. CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en esta Memoria, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En este trabajo, se ha seleccionado y empleado *Alcanivorax venustensis* (CECT 5388), como microorganismo degradador de hidrocarburos por reunir las siguientes características:
 - a. Es una bacteria hidrocarbonoclasta capaz de degradar alcanos cuando sus células se encuentran tanto en forma libre como inmovilizada a soportes.
 - b. Se puede cultivar en medio mineral suplementado con *n*-dodecano como única fuente de carbono y energía, tanto a escala de laboratorio en matraces agitados como en fermentador de 200 l.
 - c. La biomasa obtenida se puede liofilizar para su conservación, manteniendo su actividad degradadora de hidrocarburos.

2. Además, la expresión de la capacidad hidrocarbonoclasta de *A. venustensis* se induce por la presencia de algún hidrocarburo en el medio de cultivo, como el *n*-dodecano. Este reajuste metabólico se refleja en el análisis de su proteoma, en donde se detecta un incremento de la expresión del citocromo P-450, que sugiere que la degradación de alcanos está asociada a este citocromo, y de un posible sistema de degradación de tolueno, que podría indicar su capacidad para utilizar hidrocarburos aromáticos.

3. Como soporte para inmovilizar por atrapamiento las células de *A. venustensis* se ha sintetizado y caracterizado un hidrogel formado por quitosano y goma xantano en relación 2:1 (p/p). Este soporte es biodegradable, biocompatible con las células inmovilizadas y capaz de mantenerse adherido a la superficie de las rocas durante varios días.
4. Se ha desarrollado y optimizado una estrategia de inmovilización por atrapamiento en hidrogeles de la biomasa de *A. venustensis* que permite:
 - a. Obtener rendimientos de inmovilización superiores al 99% y 95% cuando se emplea biomasa de células frescas o liofilizadas respectivamente, sin que en ningún caso se detecte disminución en sus capacidades para degradar alcanos.
 - b. Emplear un sistema de confinamiento celular sencillo, robusto y reproducible, que además es independiente del pH y de la salinidad del medio utilizado para la inmovilización de la biomasa.
5. Se ha desarrollado un novedoso producto biotecnológico que puede ser de utilidad para la biorremediación de zonas costeras contaminadas con vertidos de hidrocarburos y que:
 - a. Es eficaz para degradar hidrocarburos en el laboratorio en un amplio intervalo de temperaturas, que va desde 4°C hasta 24°C, incluso hasta 37°C en ocasiones.

- b. Necesita el uso de medio marino sintético SM1 para que sea completamente activo cuando se inmoviliza biomasa liofilizada, pudiendo utilizarse agua marina cuando la biomasa es fresca.
- c. Necesita que la fuente de nitrógeno se suministre en forma de nitrato para que este ión pueda difundir y acceder a las células.
- d. Se ha demostrado que es eficaz para degradar hidrocarburos a escala de laboratorio. Con este fin y para seguir la degradación, se ha diseñado un sistema experimental que mimetiza en placas de Petri las condiciones ambientales que se podrían dar para la biorremediación *in situ*.

7. BIBLIOGRAFÍA

-
- Alajbeg, I., Krnjevic-Pezic, G., Alajbeg, I., Smeh-Skrbin, A. and Vrzogic, P. (2000) Comparison of the composition of some petroleum samples which may be applied for skin and mucous membrane treatment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **22**, 75-84.
- Alonso-Álvarez, C., Pérez, C. and Velando, A. (2007) Effects of acute exposure to heavy fuel oil from the Prestige spill on a seabird. *Aquatic Toxicology* **84**, 103-110.
- Atlas, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews* **45**, 180-209.
- Atlas, R.M. (1995a) Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* **35**, 317-327.
- Atlas, R.M. (1995b) Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* **31**, 178-182.
- Babu, G.J., Wheeler, D., Alzate, O. and Periasamy, M. (2004) Solubilization of membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis: identification of sarcoplasmic reticulum membrane proteins. *Analytical Biochemistry* **325**, 121-125.
- Banks, A.N., Sanderson, W.G., Hughes, B., Cranswick, P.A., Smith, L.E., Whitehead, S., Musgrove, A.J., Haycock, B. and Fairney, N.P. (2008) The Sea Empress oil spill (Wales, UK): Effects on Common Scoter *Melanitta nigra* in Carmarthen Bay and status ten years later. *Marine Pollution Bulletin* **56**, 895-902.
- Bergmaier, D., Champagne, C.P. and Lacroix, C. (2003) Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1049-1057.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brakstad, O.G. and Bonaunet, K. (2006) Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5 degrees C) and bacterial communities associated with degradation. *Biodegradation* **17**, 71-82.

- Bruns, A. and Berthe-Corti, L. (1999) *Fundibacter jadensis* gen. nov., sp. nov., a new slightly halophilic bacterium, isolated from intertidal sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49** 441-448.
- Bunai, K. and Yamane, K. (2005) Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *Journal of Chromatography* **815**, 227-236.
- Colwell, R.R. (1977) Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Critical Reviews in Microbiology* **5**, 423-445.
- Couceiro, S.R., Forsberg, B.R., Hamada, N. and Ferreira, R.L. (2006) Effects of an oil spill and discharge of domestic sewage on the insect fauna of Cururu stream, Manaus, AM, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **66**, 35-44.
- Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina, M.S. and Philp, J.C. (2004) Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**, 167-174.
- Chellat, F., Tabrizian, M., Dumitriu, S., Chornet, E., Rivard, C.H. and Yahia, L. (2000) Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *Journal of Biomedical Materials Research* **53**, 592-599.
- Cheremisinoff, P.N. (1995) Handbook of water and wastewater treatment technology. **New York**: Marcel Dekker.
- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquie, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J. and Rabilloud, T. (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 1901-1909.
- Chia-Hong, C., Hitoshi, K. and Kozo, N. (1996) Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Applied Polymer Science* **60**, 1041-1047.
- d'Ayala, G.G., Malinconico, M. and Laurienzo, P. (2008) Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules* **13**, 2069-2106.

- Degiorgi, C.F., Pizarro, R.A., Smolko, E.E., Lora, S. and Carenza, M. (2002) Hydrogels for immobilization of bacteria used in the treatment of metal-contaminated wastes. *Radiation Physics and Chemistry* **63**, 109-113.
- Deshusses, J.M., Burgess, J.A., Scherl, A., Wenger, Y., Walter, N., Converset, V., Paesano, S., Corthals, G.L., Hochstrasser, D.F. and Sanchez, J.C. (2003) Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. *Proteomics* **3**, 1418-1424.
- Díez, S., Sabatte, J., Vinas, M., Bayona, J.M., Solanas, A.M. and Albaiges, J. (2005) The prestige oil spill. I. Biodegradation of a heavy fuel oil under simulated conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**, 2203-2217.
- Ding, K.-l., Li, S.-y., Yue, C.-t. and Zhong, N.-n. (2008) A simulation on the formation of organic sulfur compounds in petroleum from thermochemical sulfate reduction. *Journal of Fuel Chemistry and Technology* **36**, 48-54.
- Erable, B., Maugard, T., Goubet, I., Lamare, S. and Legoy, M.D. (2005) Biotransformation of halogenated compounds by lyophilized cells of *Rhodococcus erythropolis* in a continuous solid-gas biofilter. *Process Biochemistry* **40**, 45-51.
- Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P.Y. and Schroeder, E.D. (1999) Principios de biorrecuperación: tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y fisico-químicos. **Madrid**: McGraw-Hill.
- Farris, S., Schaich, K.M., Liu, L., Piergiovanni, L. and Yam, K.L. (2009) Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in Food Science & Technology* **20**, 316-332.
- Fernández-Álvarez, P., Vila, J., Garrido-Fernández, J.M., Grifoll, M. and Lema, J.M. (2006) Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *Journal of Hazardous Materials* **137**, 1523-1531.
- Fernández-Martínez, J., Pujalte, M.J., García-Martínez, J., Mata, M., Garay, E. and Rodríguez-Valeral, F. (2003) Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 1 21 78T (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 331-338.

- Fernández-Varela, R., Andrade, J.M., Muniategui, S., Prada, D. and Ramírez-Villalobos, F. (2008) The comparison of two heavy fuel oils in composition and weathering pattern, based on IR, GC-FID and GC-MS analyses: Application to the Prestige wreck. *Water Research* **43**, 1015-1026.
- Fierro, S., Del Pilar Sanchez-Saavedra, M. and Copalca, C. (2008) Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresource Technology* **99**, 1274-1279.
- Freeman, A. and Lilly, M.D. (1998) Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology* **23**, 335-345.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernández, L., Acquaviva, M., Bonin, P. and Bertrand, J.C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 568-576.
- Gentili, A.R., Cubitto, M.A., Ferrero, M. and Rodríguez, M.S. (2006) Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **57**, 222-228.
- Gómez Gesteira, J.L., Dauvin, J.C. and Salvande Fraga, M. (2003) Taxonomic level for assessing oil spill effects on soft-bottom sublittoral benthic communities. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 562-572.
- Gómez Gesteira, J.L. and Dauvin, J.C. (2005) Impact of the Aegean Sea oil spill on the subtidal fine sand macrobenthic community of the Ares-Betanzos Ria (Northwest Spain). *Marine Environmental Research* **60**, 289-316.
- González-Doncel, M., González, L., Fernández-Torija, C., Navas, J.M. and Tarazona, J.V. (2008) Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* **87**, 280-288.
- Gorg, A., Weiss, W. and Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-3685.
- Grosjean, E., Love, G.D., Stalvies, C., Fike, D.A. and Summons, R.E. (2009) Origin of petroleum in the Neoproterozoic-Cambrian South Oman Salt Basin. *Organic Geochemistry* **40**, 87-110.

-
- Haines, J.R. and Alexander, M. (1974) Microbial degradation of high-molecular-weight alkanes. *Applied Microbiology* **28**, 1084-1085.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. and Shutsubo, K. (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**, 63-70.
- Head, I.M. and Swannell, R.P. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 234-239.
- Head, I.M., Jones, D.M. and Larter, S.R. (2003) Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* **426**, 344-352.
- Henry, J.A. (1998) Composition and toxicity of petroleum products and their additives. *Human & Experimental Toxicology* **17**, 111-123.
- Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 660-663.
- Jiménez, N., Vinas, M., Sabate, J., Díez, S., Bayona, J.M., Solanas, A.M. and Albaiges, J. (2006) The Prestige oil spill. 2. Enhanced biodegradation of a heavy fuel oil under field conditions by the use of an oleophilic fertilizer. *Environmental Science & Technology* **40**, 2578-2585.
- Jiménez, N., Vinas, M., Bayona, J.M., Albaiges, J. and Solanas, A.M. (2007) The Prestige oil spill: bacterial community dynamics during a field biostimulation assay. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**, 935-945.
- Jin, Y.-L. and Alex Speers, R. (1998) Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International* **31**, 421-440.
- Jirků, V. (1999) Whole cell immobilization as a means of enhancing ethanol tolerance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **22**, 147-151.
- Joly-Turquin, G., Dubois, P., Coteur, G., Danis, B., Leyzour, S., Le Menach, K., Budzinski, H. and Guillou, M. (2009) Effects of the Erika oil spill on the common starfish *Asterias rubens*, evaluated by field and laboratory studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **56**, 209-220.
- Jorgensen, K.S., Puustinen, J. and Suortti, A.M. (2000) Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* **107**, 245-254.

- Junter, G.A. and Jouenne, T. (2004) Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. *Biotechnology Advances* **22**, 633-658.
- Karel, S.F., Libicki, S.B. and Robertson, C.R. (1985) The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science* **40**, 1321-1354.
- Kawamoto, S., Tanaka, A., Yamamura, M., Teranishi, Y. and Fukui, S. (1977) Microbody of n-alkane-grown yeast. Enzyme localization in the isolated microbody. *Archives of Microbiology* **112**, 1-8.
- Kaya, V.M. and Picard, G. (1996) Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. *Bioresource Technology* **56**, 147-155.
- Kenney, J.F., Kutcherov, V.A., Bendeliani, N.A. and Alekseev, V.A. (2002) The evolution of multicomponent systems at high pressures: VI. The thermodynamic stability of the hydrogen-carbon system: the genesis of hydrocarbons and the origin of petroleum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10976-10981.
- King, R.W. (1988) Petroleum: its composition, analysis and processing. *Occupational Medicine* **3**, 409-430.
- Klein, B., Grossi, V., Bouriat, P., Goulas, P. and Grimaud, R. (2008) Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane-water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Research in Microbiology* **159**, 137-144.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R. and Koutinas, A.A. (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* **21**, 377-397.
- Langrock, U. and Stein, R. (2004) Origin of marine petroleum source rocks from the Late Jurassic to Early Cretaceous Norwegian Greenland Seaway evidence for stagnation and upwelling. *Marine and Petroleum Geology* **21**, 157-176.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* **54**, 305-315.
- Leenen, E.J.T.M., Dos Santos, V.A.P., Grolle, K.C.F., Tramper, J. and Wijffels, R. (1996) Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research* **30**, 2985-2996.

- Liu, C. and Shao, Z. (2005) *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1181-1186.
- Lobon, C.M., Fernández, C., Arrontes, J., Rico, J.M., Acuna, J.L., Anadon, R. and Monteoliva, J.A. (2008) Effects of the 'Prestige' oil spill on macroalgal assemblages: large-scale comparison. *Marine Pollution Bulletin* **56**, 1192-1200.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Magnin, D., Dumitriu, S., Magny, P. and Chornet, E. (2001) Lipase immobilization into porous chitoxan beads: activities in aqueous and organic media and lipase localization. *Biotechnology Progress* **17**, 734-737.
- Magnin, D., Dumitriu, S. and Chornet, E. (2003) Immobilization of enzymes into a polyionic hydrogel: ChitoXan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **18**, 355-373.
- Martin-Skilton, R., Saborido-Rey, F. and Porte, C. (2008) Endocrine alteration and other biochemical responses in juvenile turbot exposed to the Prestige fuel oil. *Science of the Total Environment* **404**, 68-76.
- Martins-de-Souza, D., Menezes de Oliveira, B., dos Santos Farias, A., Horiuchi, R.S., Crepaldi Domingues, C., de Paula, E., Marangoni, S., Gattaz, W.F., Dias-Neto, E. and Camillo Novello, J. (2007) The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **6**, 70-75.
- Matthiesen, R., Bunkenborg, J., Stensballe, A., Jensen, O.N., Welinder, K.G. and Bauw, G. (2004) Database-independent, database-dependent, and extended interpretation of peptide mass spectra in VEMS V2.0. *Proteomics* **4**, 2583-2593.
- Matthiesen, R., Trelle, M.B., Hojrup, P., Bunkenborg, J. and Jensen, O.N. (2005) VEMS 3.0: algorithms and computational tools for tandem mass spectrometry based identification of post-translational modifications in proteins. *Journal of Proteome Research* **4**, 2338-2347.

- Meintanis, C., Chalkou, K.I., Kormas, K.A. and Karagouni, A.D. (2006) Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegradation* **17**, 105-111.
- Molloy, M.P., Phadke, N.D., Maddock, J.R. and Andrews, P.C. (2001) Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis* **22**, 1686-1696.
- Niederweis, M., Maier, E., Lichtinger, T., Benz, R. and Kramer, R. (1995) Identification of channel-forming activity in the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology* **177**, 5716-5718.
- Okada, H., Ueda, M. and Tanaka, A. (1986) Purification of peroxisomal malate synthase from alkane-grown *Candida tropicalis* and some properties of the purified enzyme. *Archives of Microbiology* **144**, 137-141.
- Olivera, N.L., Nievas, M.L., Lozada, M., del Prado, G., Dionisi, H.M. and Siñeriz, F. (2009) Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. *Research in Microbiology* **160**, 19-26.
- Paschoa, A.S. (1997) Naturally occurring radioactive materials (NORM) and petroleum origin. *Applied Radiation and Isotopes* **48**, 1391-1396.
- Passeri, A., Schmidt, M., Haffner, T., Wray, V., Lang, S. and Wagner, F. (1992) Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from marine bacterial strain MM1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**, 281-286.
- Peterson, G.L. (1983) Determination of total protein. *Methods in Enzymology* **91**, 95-119.
- Pometto, A.L., Oulman, C.S., DiSpirito, A.A., Johnson, K.E. and Baranow, S. (1998) Potential of agricultural by-products in the bioremediation of fuel spills. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **20**, 369-372.
- Postanogova, G.V. (1981) Determination of the fractional composition of petroleum products in the soil. *Gigiena i Sanitariia*, 47-48.
- Prabhu, Y. and Phale, P.S. (2003) Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**, 342-351.

- Prince, R.C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology* **19**, 217-242.
- Quek, E., Ting, Y.P. and Tan, H.M. (2006) *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresource Technology* **97**, 32-38.
- Radwan, S.S., Al-Hasan, R.H., Salamah, S. and Al-Dabbous, S. (2002) Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *International Biodeterioration & Biodegradation* **50**, 55-59.
- Rahman, R.N., Ghaza, F.M., Salleh, A.B. and Basri, M. (2006) Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. *Journal of Microbiology* **44**, 354-359.
- Rivas, R., García-Fraile, P., Peix, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. and Velázquez, E. (2007) *Alcanivorax balearicus* sp. nov., isolated from Lake Martel. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1331-1335.
- Rodríguez-Trigo, G., Zock, J.P. and Montes, I.I. (2007) Health Effects of Exposure to Oil Spills. *Archivos de Bronconeumología* **43**, 628-635.
- Rojo, F. (2009) Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* **11**, 2477-2490.
- Roling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J. and Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5537-5548.
- Ruiz, M., Pasadakis, N. and Kalogerakis, N. (2006) Bioremediation and toxicity determination of natural seawater polluted with weathered crude oil by salt-tolerant consortia in a SBR. *Marine Pollution Bulletin* **52**, 1490-1493.
- Sabirova, J.S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. (2006) Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *Journal of Bacteriology* **188**, 3763-3773.
- Salter, G.J. and Kell, D.B. (1992) New materials and technology for cell immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* **3**, 115-118.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. **New York**: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Sanpera, C., Valladares, S., Moreno, R., Ruiz, X. and Jover, L. (2008) Assessing the effects of the Prestige oil spill on the European shag (*Phalacrocorax aristotelis*): Trace elements and stable isotopes. *Science of the Total Environment* **407**, 242-249.
- Scow, K.M. and Hicks, K.A. (2005) Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 246-253.
- Schenk, H.J., Di Primio, R. and Horsfield, B. (1997) The conversion of oil into gas in petroleum reservoirs. Part 1: Comparative kinetic investigation of gas generation from crude oils of lacustrine, marine and fluviodeltaic origin by programmed-temperature closed-system pyrolysis. *Organic Geochemistry* **26**, 467-481.
- Sekelsky, A.M. and Shreve, G.S. (1999) Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology and Bioengineering* **63**, 401-409.
- Sharma, S.L. and Pant, A. (2000) Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus* sp. *Biodegradation* **11**, 289-294.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**, 850-858.
- Simoneit, B.R.T., Lein, A.Y., Peresykin, V.I. and Osipov, G.A. (2004) Composition and origin of hydrothermal petroleum and associated lipids in the sulfide deposits of the Rainbow field (Mid-Atlantic Ridge at 36°N). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**, 2275-2294.
- Singh, S., Kang, S.H., Mulchandani, A. and Chen, W. (2008) Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 437-444.
- Smith, R.M. (2004) Understanding mass spectra: a basic approach. **Hoboken, N.J.:** Wiley Interscience.
- Soares, E.V. and Vroman, A. (2003) Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 325-330.

- Song, S.H., Choi, S.S., Park, K. and Yoo, Y.J. (2005) Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. *Enzyme and Microbial Technology* **37**, 567-573.
- Swannell, R.P., Lee, K. and McDonagh, M. (1996) Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews* **60**, 342-365.
- United States Congress, O.T.A. (1991) Bioremediation for marine oil spills. **Washington, D.C.:** Congress of the U.S. .
- van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M. and Witholt, B. (2003) Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment *Oil & Gas Science and Technology* **58**, 427-440.
- van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Rothlisberger, M., Li, Z. and Witholt, B. (2006) Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 59-65.
- van Beilen, J.B. and Funhoff, E.G. (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 13-21.
- van Veen, J.A., van Overbeek, L.S. and van Elsas, J.D. (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 121-135.
- Varela, M., Bode, A., Lorenzo, J., Álvarez-Ossorio, M.T., Miranda, A., Patrocínio, T., Anadón, R., Viesca, L., Rodríguez, N., Valdés, L., Cabal, J., Urrutia, A., García-Soto, C., Rodríguez, M., Álvarez-Salgado, X.A. and Groom, S. (2006) The effect of the "Prestige" oil spill on the plankton of the N-NW Spanish coast. *Marine Pollution Bulletin* **53**, 272-286.
- Wang, Z., Fingas, M., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Landriault, M., Sigouin, L., Foght, J., Semple, K. and Westlake, D.W.S. (1998) Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *Journal of Chromatography A* **809**, 89-107.
- Wu, Y., Lai, Q., Zhou, Z., Qiao, N., Liu, C. and Shao, Z. (2009) *Alcanivorax hongdengensis* sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **59**, 1474-1479.

Bibliografía

- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R., Abraham, W.R., Lunsdorf, H. and Timmis, K.N. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48** 339-348.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 257-266.
- Zhang, J.-l. (2008) Debate over the origin of petroleum: A reply to WAN Lan-sheng's paper. *Petroleum Exploration and Development* **35**, 124-128.
- Zobell, C.E. (1946) Action of Microorganisms on Hydrocarbons. *Bacteriological Reviews* **10**, 1-49.
- Zuberogoitia, I., Martínez, J.A., Iraeta, A., Azkona, A., Zabala, J., Jiménez, B., Merino, R. and Gómez, G. (2006) Short-term effects of the prestige oil spill on the peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Marine Pollution Bulletin* **52**, 1176-1181.

