

Treball de recerca

Gener de 2011



DEGRADACIÓ MICROBIANA D'HIDROCARBURS DERIVATS DEL PETROLI



ÍNDIX

1	Introducció	2
2	Objectius i fonts d'informació	4
3	Antecedents	5
3.1	Concepte i contaminants objectiu	5
3.2	Medi i cultiu de microorganismes	7
3.2.1	Requeriments nutricionals dels microorganismes	7
3.2.2	L'especificitat del medi i del tractament	7
3.2.3	Complexitat del sòl	8
3.2.4	Cultiu de microorganismes	8
3.2.5	L'obtenció del consorci no definit	9
3.3	Fenòmens derivats de la biodegradació	10
3.4	Factors que condicionen la biodegradació d'hidrocarburs	11
3.4.1	Factors relacionats amb el contaminant	11
3.4.2	Factors relacionats amb el creixement	13
3.5	Estratègies de bioremediació	15
3.5.1	Població autòctona de microorganismes	15
3.5.2	Estimulació del creixement de la població microbiana autòctona	16
3.5.3	Bioaugmentació	16
3.5.4	Fitoremediació	18
3.5.5	Organismes manipulats genèticament	19
3.6	Tècniques de bioremediació	21
3.7	Discussió	22
4	Pràctica experimental	24
4.1	Plantejament inicial	24
4.2	Disseny	25
4.3	Tècnica analítica per a l'obtenció de dades	30
4.3.1	Descripció del fonament i equipament de la tècnica	30
4.3.2	Preparació prèvia a la cromatografia	32
4.4	Resultats. Interpretació i discussió	33
5	Conclusions	39
6	Bibliografia	40
7	Agraïments	45
8	Annexos	i

1 INTRODUCCIÓ

Un problema...

Els hidrocarburs derivats del petroli són compostos químics d'ús habitual en la nostra vida quotidiana: s'usen com a combustibles, lubricants, dissolvents, asfalts, espelmes, components farmacèutics, etc. No és estrany, doncs, que llur permanent cicle de producció, emmagatzematge, distribució i consum constitueixi una de les principals fonts de contaminació del nostre entorn; un entorn afectat, però, moltes vegades no perceptible a la vista, atès que acostuma a tractar-se de casos de contaminació del subsòl o d'aigües subterrànies. Aquest tipus de contaminació, de gran importància degut a que té lloc persistentment i incessant, no és la que habitualment surt als telenotícies, ni la que busca repercussió mediàtica per vendre més diaris.

Sembla ser que la consciència pública sobre el medi que ens envolta només s'ha despertat i ha començat a fer-se perceptible després d'un seguit de grans desastres mediambientals. Enrere queden noms de petrolers com *Amoco Cadiz*, *Exxon Valdez* o *Prestige*, les conseqüències dels vessaments de petroli dels quals encara avui són visibles. Són exemples d'esdeveniments que en el seu dia van aconseguir una gran publicitat i van augmentar la consciència i percepció mediambiental de la gent. Són casos significatius de contaminació que no deixen de ser, però, esdeveniments aïllats. La nostra vida quotidiana és la principal causadora de la contaminació ambiental existent. La percepció d'un medi eternament invariable i capaç d'absorbir qualsevol quantitat de pol·lució i contaminació ja ha quedat obsoleta. Ara hem de fer un pas endavant i ser capaços de reconèixer que els vessaments de petroli, que tractats de forma sensacionalista aconseguen una gran repercussió mediàtica, constitueixen només una minúscula font de la gran quantitat de contaminants derivats de l'activitat humana emesos al medi.

...una solució

Els aficionats a la ciència ficció saben que els éssers extraterrestres podrien tenir una composició química que diferís força respecte de la dels habitants a la terra i que, per tant, poguessin respirar i menjar substàncies que a nosaltres ens causarien la mort. Aquests alienígenes serien molt útils si, per exemple, es mengessin els fertilitzants químics i/o orgànics que inunden els aqüífers, els metalls pesants abocats als rius i que sedimenten a les desembocadures o, com en el cas que ens ocupa, cru de petroli o

gasolina. No obstant això, la participació d'éssers procedents d'altres planetes la composició dels quals pugui ser utilitzada amb fins de purificació de l'ambient sembla que no serà de menester. Molts bacteris tenen requeriments dietètics molt semblants als dels humans, motiu pel qual provoquen el deteriorament dels aliments, però n'hi ha d'altres capaços de processar químicament substàncies com el petroli.

La bioremediació és un camp d'estudi i, actualment, també de treball de la biotecnologia¹ que, de forma progressiva, va guanyant més acceptació com a tecnologia tècnicament i econòmicament viable i competitiva. La bioremediació es basa en l'ús de processos microbiològics per degradar contaminants. Tot i que aquests processos de degradació ja s'esdevenen de forma natural als aqüífers, originant, així, un descens dels nivells de contaminació, solen estar limitats per alguna mancança del medi, de manera que el grau de degradació assolit en aquestes condicions no ens permet recuperar l'emplaçament fins als nivells desitjats. Mitjançant l'optimització i acceleració d'aquests processos podríem reduir i, fins i tot, eliminar un gran percentatge dels contaminants en un temps raonable.

¹ Aplicació de principis científics i d'enginyeria al processament de materials mitjançant agents biològics per a proveir béns i serveis (definició de l'OECD, Organització per la Cooperació Econòmica i el Desenvolupament)

2 OBJECTIUS I FONTS D'INFORMACIÓ

El present treball té per fi introduir-se a les arrels de la bioremediació i aprofundir la comprensió sobre l'ús d'aquesta tecnologia biològica de remediació. A grans trets es presenten dos objectius que corresponen, al seu torn, a les seccions teòrica i pràctica, respectivament.

L'explicació teòrica del treball, elaborada a base de literatura científica –guies i articles científics, llibres...- té la funció de revisió bibliogràfica. Amb això es pretén aportar informació en matèria de:

- Concepte i tecnologies de bioremediació,
- avantatges i inconvenients que comporta l'ús d'aquesta tècnica,
- factors que condicionen el procés,
- estratègies que incrementen l'eficiència del tractament i
- altres.

El pes del treball, però, recau primordialment sobre una part experimental dissenyada a partir dels coneixements i orientacions rebuts en les entrevistes amb professionals de l'àmbit de la gestió de la contaminació i en visites a centres de reconegut prestigi.

En la secció pràctica es plantegen dos objectius; eminentment són:

- Comprovar i demostrar el fenomen de la bioremediació i
- determinar la influència de l'aportació de nutrients sobre l'activitat microbiana degradadora.

Malgrat la marginació dels aspectes més tècnics relacionats amb la tècnica de la bioremediació a la secció dels annexos, la matèria objecte d'estudi aquí, de caire científic-tècnic, obliga l'ús d'un llenguatge especialitzat, algunes vegades, que es procura explicar detalladament per a la plena comprensió del text al glossari; vegeu l'annex 11. Les paraules definides en el glossari es destaquen en el text amb un asterisc com a superíndex.

3 ANTECEDENTS

3.1 CONCEPTE I CONTAMINANTS OBJECTIU

La bioremediació es fonamenta en l'ús d'agents biològics per extreure o neutralitzar contaminants del medi mitjançant la seva degradació; en altres paraules, aprofita la versatilitat metabòlica² dels microorganismes per transformar contaminants biodegradables en altres compostos més senzills –i menys contaminants- que formen part del metabolisme* del microorganisme.

Cada dia es descobreixen nous compostos susceptibles de ser degradats biològicament, el que obre noves perspectives d'aplicació a la bioremediació. D'entre els compostos més degradables, i dels que major coneixement se'n té, destaquen els hidrocarburs* derivats del petroli tipus gasolines, gasoils i olis lleugers, així com altres hidrocarburs de pes molecular* major, com els olis lubricants i els fuels. Totes aquestes famílies d'hidrocarburs són també les més habituals en casos de contaminació, principalment per la seva abundància i ampli ús. Per aquest motiu aquest treball es focalitza en l'aplicació de tecnologies de bioremediació per **hidrocarburs derivats del petroli**.

La descomposició microbiana del petroli i els seus derivats és de considerable importància econòmica i ambiental. Atès que el petroli és una font molt rica de compostos orgànics* i els hidrocarburs que el formen són fàcilment atacats, en presència d'oxigen, per una gran varietat de microorganismes, no és estrany que quan el petroli queda en contacte amb l'aire i la humitat sigui sotmès a l'atac dels microorganismes.

Els principals microorganismes degradadors d'hidrocarburs són els fongs* i, especialment, els bacteris*. Així doncs, aquest treball se centra en la biodegradació bacteriana d'hidrocarburs³.

Per a entendre la capacitat natural que tenen alguns microorganismes per degradar hidrocarburs atendrem a la teoria biogènica, que prediu l'origen del cru de petroli.

² El terme 'metabolisme' fa referència al conjunt de processos químics que s'esdevenen en els éssers vius. En aquest cas, s'al·ludeix a les reaccions de degradació de molècules complexes a molècules simples.

³ Cal tenir present que quan parlem de biodegradació microbiana d'hidrocarburs ens referim al fet que els microorganismes poden créixer a partir de la utilització d'aquests compostos químics.

L'origen del cru de petroli i la conseqüent adaptació dels microorganismes a la seva presència

La seva formació i la del gas natural, principalment constituït de metà, deriva de la degradació i transformació de compostos biològics. Així, la sedimentació i descomposició de restes d'animals marins i de vegetals terrestres en zones lacustres, pantanoses i marines precedia el cobriment d'aquestes per altres sediments; intenses pressions, altes temperatures i l'acció de bacteris en absència d'oxigen generaven petroli i gas; i, finalment, per desplaçament, els hidrocarburs passaven a impregnar roques poroses i permeables i s'acumulaven formant bosses de cru. Aquesta informació es veu detallada i desenvolupada a l'annex número 6.

La presència d'hidrocarburs a la biosfera* al llarg de la història explica perquè molts microorganismes han adquirit capacitats metabòliques per usar aquests compostos com a font de nutrients. Al llarg de milions d'anys, en determinats microorganismes s'han seleccionat enzims que han aparegut per mutació* o intercanvi genètic, de manera que són capaços de metabolitzar hidrocarburs.

En atenció a això, no és estrany que existeixi un fenomen de bioremediació que tingui lloc de forma natural, és a dir, que no hagi de menester l'aplicació de la biotecnologia. És la coneguda com a bioremediació intrínseca, que es fonamenta en l'ús que fan els microorganismes dels substrats i nutrients que es troben de forma natural en el lloc i depèn completament de l'existència de microorganismes que puguin transformar el contaminant en qüestió. La bioremediació intrínseca, doncs, no necessita de la intervenció de l'home per tenir lloc i depèn de la quantitat primitiva de microorganismes actius en l'emplaçament contaminat. Sòls, sediments i aqüífers contenen microorganismes que actuen sobre els contaminants, però degut a la baixa densitat de població, el grau de descontaminació és molt baix.

Tot i que la bioremediació intrínseca no accelera la biodegradació, impedeix la propagació de contaminants –com els hidrocarburs– des de la seva zona original.

3.2 MEDI I CULTIU DE MICROORGANISMES

3.2.1 Requeriments nutricionals dels microorganismes

El creixement microbià requereix la presència en el medi de tot un seguit de substàncies imprescindibles per a la generació d'energia per a la síntesi de materials cel·lulars. Aquestes substàncies es denominen nutrients.

Com a font de carboni requerida pel seu propi creixement, els organismes poden incorporar matèria orgànica* o matèria inorgànica, segons si presenten autotròfia* o heterotròfia*, respectivament. La importància del carboni en el creixement microbià rau en el fet que aquest element constitueix l'estructura bàsica de la matèria viva; és necessari per a tots els compostos orgànics que formen una cèl·lula. Els microorganismes heteròtrofs, que obtenen el carboni de compostos orgànics, constitueixen el principal grup d'actuació bioremediadora. Els hidrocarburs, principals constituents del cru de petroli i dels seus derivats, són compostos orgànics del carboni. Atenent-nos a aquesta exposició, s'aprofita que els heteròtrofs solament poden obtenir carboni d'una font orgànica per fer-los-hi metabolitzar i degradar el contaminant hidrocarbur (del petroli).

D'altra banda, tots els organismes vius necessiten nitrogen, sofre i fòsfor per a la síntesi del material cel·lular. Cal fer notar que, en l'experiment que s'ha dut a terme i que es pot veure detallat en la secció *Pràctica experimental*, s'han introduït diverses sals inorgàniques contenedores de nitrogen i altres elements imprescindibles només a determinades mostres de cultiu per comprovar si la degradació global del contaminant era major en aquests casos.

Finalment, cal mencionar que quasi tots els nutrients que obtenen els microorganismes han d'estar en solució abans de poder ser incorporats i assimilats; per tant, els microorganismes requereixen aigua per créixer. Aquest aspecte també ha estat considerat en el disseny experimental elaborat.

3.2.2 L'especificitat del medi i del tractament

S'ha explicat que certs microorganismes són capaços de metabolitzar substàncies orgàniques i degradar-les en altres menys tòxiques (descomposició a un estadi intermedi) o fins a innòcues per al medi, el què constitueix el procés de mineralització, és a dir, la degradació completa a diòxid de carboni, aigua i altres compostos inorgànics. Se'n deriva, doncs, que la bioremediació compta amb un elevat potencial atesos el seu baix cost i l'ampli ventall de contaminants que poden ser tractats.

La bioremediació, però, no és una tècnica de descontaminació exempta de riscos ja que existeixen rutes metabòliques* que transformen les substàncies contaminants originals en altres encara més tòxiques.

Tal com es tractarà en el següent capítol, la capacitat de biodegradar* els hidrocarburs depèn de molts factors i cada zona contaminada té unes característiques específiques que afecten el procés de bioremediació. Abans d'aplicar qualsevol mesura sobre el terreny convé estudiar les condicions que ens ofereix el medi contaminat amb l'objectiu d'optimitzar el procés de tractament.

3.2.3 Complexitat del sòl

La població de bacteris del sòl sobrepasa tant en nombre com en varietat a tots els altres grups de microorganismes –fongs, algues, protozous, virus- que cohabituen el sòl. Els comptes directes revelen que hi ha alguns bilions de bacteris per gram de sòl; en canvi, en els medis de cultiu aquesta quantitat és menor, ja que cap situació de cultiu, per si sola, no pot proporcionar un medi i els nutrients necessaris per suportar el desenvolupament de l'àmplia varietat de microorganismes que viuen al sòl.

3.2.4 Cultiu de microorganismes

Un **cultiu axènic** o cultiu pur consisteix en una sola espècie bacteriana, i s'ha generat a partir d'una sola cèl·lula; a la natura són molt estranys. En medis naturals, com ara el sòl, l'aigua o el cos humà, trobem **cultius mixtos**, on viuen plegades moltes espècies diferents de bacteris.

L'elevada complexitat de la composició del cru de petroli i derivats implica l'existència d'una àmplia varietat de bacteris si es pretén aconseguir una degradació significativa del cru o derivats. Tot i que la majoria dels hidrocarburs són biodegradables, una única soca de microorganismes serà capaç de degradar una sèrie molt limitada d'hidrocarburs. Així doncs, la biodegradació al medi es duu a terme per grups de microorganismes i, per aquest motiu, no ens interessa obtenir un cultiu pur si el que volem és aconseguir el major grau de degradació possible.

En els cultius mixtos varies espècies mantenen una relació simbiòtica, de manera que la interacció entre aquestes els produeix un benefici recíproc. En una mescla de poblacions els bacteris que intervenen com a consumidors primaris inicien el procés de degradació i els que actuen com a consumidors secundaris utilitzen els productes metabòlics dels primers per a degradar-los. D'altra banda, poden facilitar el creixement dels primaris

mitjançant el subministrament de nutrients (producte del seu metabolisme), l'eliminació de tòxics o l'intercanvi de material genètic.

Els cultius mixtos poden classificar-se en consorcis definits i consorcis no definits:

- Consorcis definits: són combinació de soques bacterianes, aïllades al laboratori, que degraden hidrocarburs de forma complementària. Es requereix un gran nombre de soques diferents per aconseguir una degradació extensa.
- Consorcis no definits: són poblacions de bacteris obtingudes en zones de contaminació; no es tracta de soques prèviament aïllades, sinó de poblacions microbianes seleccionades de forma natural. Són més eficients en la degradació de compostos -coneguts i desconeguts- que un consorci definit.

3.2.5 L'obtenció del consorci no definit

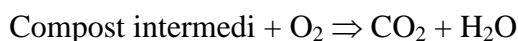
Així doncs, l'obtenció d'un consorci no definit requereix la prèvia exposició del conjunt de microorganismes a un medi sotmès a processos directes d'enriquiment o de contaminació; en el cas que ens ocupa parlem d'episodis recurrents de contaminació per hidrocarburs. Un taller mecànic és un medi d'enriquiment* ideal si pretenem usar els bacteris per degradar derivats del petroli. Recordem que el terra d'un taller mecànic és sotmès a contínues gotes d'oli mineral de cotxe o de moto durant l'intercanvi d'oli en els vehicles. En la pràctica que hem realitzat, doncs, obteníem del medi –sòl del taller mecànic- una mostra directa de sediments.

Tal com s'explicava anteriorment, per tal d'assolir el major grau de degradació no ens interessa obtenir un conjunt de bacteris molt reduït. L'oli mineral usat constitueix una font de carboni poc selectiva, ja que està format per molts compostos diferents. Aquesta diversitat en la composició de la font possibilitarà la supervivència d'una gran varietat de microorganismes, ja que una única espècie bacteriana només podrà degradar uns tipus limitats d'hidrocarburs.

Tot i que la font d'enriquiment -l'oli- proveeix molts bacteris de l'energia i del carboni per a la seva activitat, cal tenir present que en el sòl continua existint una gran varietat de microorganismes que utilitza altres fonts d'energia i de carboni incontrolables. Per exemple, havent trepitjat un escarabat és inevitable que existeixin microorganismes en els sediments que recollim per l'experiment que s'alimentin de la matèria orgànica que formava part del seu esquelet i que cohabitin amb els bacteris que realment sí utilitzen l'oli com a font d'energia i de carboni. És a dir, no tots els microorganismes degradaran hidrocarburs.

3.3 FENÒMENS DERIVATS DE LA BIODEGRADACIÓ

Fins ara hem vist com determinats microorganismes presents en aire, aigua i sòl, segons les seves capacitats catabòliques*, són capaços de descompondre compostos orgànics que, per a la majoria dels éssers vius, resulten tòxics. Aquest procés de descomposició, però, normalment no es produeix en un sol pas, en una única transformació. La següent correlació mostra, d'una manera molt simple, la descomposició en presència d'oxigen d'aquestes molècules complexes en compostos intermedis*, que finalment són transformats en CO₂ i H₂O:



Aquesta és una representació força simplificada dels processos metabòlics que es realitzen durant la biodegradació d'hidrocarburs, però que ens serveix per veure les elevades necessitat d'oxigen que tenen els microorganismes degradadors.

Cal tenir present que existeix la possibilitat que, després de la descomposició d'un hidrocarbur complex en un metabòlit intermedi*, aquest últim no pugui ésser degradat per cap altre microorganisme atesa l'absència d'una ruta metabòlica que en permeti l'assimilació. Aquest fenomen resulta perillós si el compost intermedi resultant és més tòxic que l'inicial (**activació**). En canvi, si un compost intermedi no pot ser degradat, però aquest no resulta tòxic pel medi que el conté, o n'és menys que el compost orgànic inicial, s'esdevé el procés de **desintoxicació**. Activació i desintoxicació s'engloben dins el fenomen de **degradació parcial**. Finalment, quan es produeix una degradació completa a diòxid de carboni, aigua i/o altres compostos inorgànics, es parla de **mineralització**.

Cal afegir que a major variabilitat dins la població de microorganismes afectada per la contaminació, major varietat i complementarietat de rutes metabòliques -per tant, més possibilitats de degradació de metabòlits intermedis- i més facilitat d'assolir una degradació completa.

3.4 FACTORS QUE CONDICIONEN LA BIODEGRADACIÓ D'HIDROCARBURS

El destí dels compostos orgànics del medi depèn de diversos factors que han estat agrupats segons dos criteris; primerament, distingim els factors imposats pel mateix compost i, en segon lloc, aquells que afecten el creixement i el metabolisme dels microorganismes.

3.4.1 Factors relacionats amb el contaminat

Els factors imposats pel mateix compost són els següents: l'estructura molecular* del compost orgànic, la seva disponibilitat i/o solubilitat* i la seva concentració* i toxicitat*.

Estructura molecular

L'estructura molecular dels compostos determina la seva solubilitat, polaritat* i reactivitat*, entre altres característiques, de manera que afecta importantment la seva degradabilitat.

En general, els compostos orgànics d'elevat pes molecular tenen un comportament recalcitrant* major que aquells compostos formats per un nombre reduït d'àtoms. Els hidrocarburs alifàtics* més simples –especialment els que contenen menys de 28 carbonis- i els aromàtics monocíclics* són fàcilment degradables, en contraposició a estructures més complexes com poden ser-ho els PAHs⁴, hidrocarburs de menor biodegradabilitat degut als elevats pesos moleculars i a la baixa solubilitat.

Si el compost o els productes de descomposició intermedis resulten tòxics, de manera integral o no per a la població microbiana, la persistència del contaminant en el medi augmentarà.

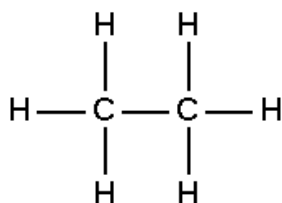


Diagrama 1 Hidrocarbur alifàtic (età: C₂H₆).

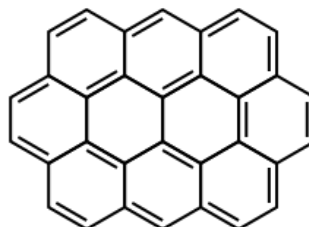


Diagrama 2 PAH (ovalè).

⁴ Hidrocarburs aromàtics policíclics.

Biodisponibilitat i solubilitat

Un altre factor transcendental és la disponibilitat del contaminant o, en altres paraules, l'accés que tenen els microorganismes al contaminant. Gran part dels contaminants del sòl –inclosos els compostos que formen el cru de petroli- són insolubles en aigua, així que, si es pretén degradar-los o extreure'ls, els haurem de fer accessibles als microorganismes. Recordem que, tal com es comentava en l'apartat *Requeriments nutricionals dels microorganismes*, gairebé la totalitat dels nutrients que obtenen els microorganismes han d'estar en dissolució de forma prèvia a la incorporació a l'organisme. En un medi terrestre, l'estructura, la porositat i la composició del sòl, a més de la solubilitat del mateix compost contaminant, determinaran la disponibilitat. En un medi marí, el principal factor que intervé és la solubilitat.

En aquest aspecte podem citar, per exemple, l'absorció de diverses substàncies a l'argila, que convertiria el contaminant en invulnerable a la degradació degut a la inaccessibilitat per als microorganismes. Per tal de procurar un millor accés a les substàncies contaminants s'obtenen unes molècules emulsionants i dispersants anomenades surfactants. L'addició d'aquestes molècules al medi ha demostrat incrementar la degradació de certs compostos mitjançant l'augment de la disponibilitat del producte. Vegeu l'annex 10 per a més informació relacionada amb els surfactants, la seva obtenció i el seu funcionament.

Concentració i toxicitat

Una elevada concentració de contaminant pot produir una disminució de la capacitat de degradació dels microorganismes i, en conseqüència, la inhibició del desenvolupament microbià.

Anàlogament cal tractar la possible generació de metabòlits intermedis tòxics associats a la biodegradació de contaminants. Es tracta de molècules que poden resultar més tòxiques que el contaminant original, fins i tot per als propis microorganismes. D'aquesta manera, l'eficàcia del tractament de bioremediació dependrà, en part, de la presència i el grau de toxicitat dels productes finals presents en el medi.

Finalment, cal tenir present que tota població microbiana degradadora necessita un percentatge mínim de concentració de contaminant per desenvolupar-se, és a dir, que requereix un mínim de concentració per sota del qual no creix.

3.4.2 Factors relacionats amb el creixement

Els següents factors poden afectar el creixement dels microorganismes:

- (1) presència d'altres productes orgànics biodegradables,
- (2) presència de compostos contenidors de nitrogen i/o fòsfor,
- (3) nivell d'oxigen,
- (4) temperatura,
- (5) pH,
- (6) presència d'aigua i/o humitat del sòl,
- (7) nombre i tipus de microorganismes autòctons i
- (8) presència de metalls pesants.

(1) Es pot estimular la degradació del contaminant a partir de l'addició d'una segona font de carboni, que complementa les aportacions nutricionals del contaminant i milloren la biodegradació (cometabolisme).

D'altra banda, també pot esdevenir-se el fenomen contrari al cometabolisme, és a dir, que la presència d'un altre substrat, a més de l'hidrocarbur, provoqui que els microorganismes deixin d'utilitzar el contaminant com a font de carboni i energia. En aquest cas, el nou substrat pren el lloc del contaminant com a font d'aliment.

(2) La població microbiana també pot haver de menester suplementes de nitrogen i fòsfor perquè les cèl·lules puguin desenvolupar llurs funcions vitals*.

(3) La degradació aeròbica d'hidrocarburs és considerablement més ràpida que l'anaeròbica; així que, per tal de mantenir les condicions aeròbiques i assegurar una major rapidesa de degradació, serà necessari el subministrament continu d'oxigen al medi contaminat. Vegeu la *comparació dels processos de biodegradació aeròbic i anaeròbic* a l'annex 2. Un sòl d'estructura oberta permet la ventilació i la renovació d'oxigen, mentre que un sòl inundat tindrà l'efecte contrari. En el nostre experiment, aquest aspecte està plenament regulat.

(4) La temperatura afecta el creixement microbià, de manera que, en general, a baixes temperatures el grau de degradació és menor. D'aquesta manera, s'ha demostrat que l'addició de fertilitzants suplementaris de nitrogen i fòsfor en medis contaminats i a temperatura ambient incrementa la degradació d'hidrocarburs. Aquesta millora no s'obté a temperatures inferiors als 10°C, segurament perquè a aquestes condicions de temperatura l'activitat dels enzims és escassa i ineficient.

- (5) El pH del sòl afectarà el creixement, la solubilitat –i biodisponibilitat- del compost a degradar i els possibles nutrients afegits. Es considera òptim el rang de pH 6-8 per als bacteris heteròtrofs.
- (6) D'una banda, els sòls saturats d'aigua limiten la disponibilitat d'oxigen impossibilitant, així, els processos aeròbics que, com es comentava anteriorment, són els que ens interessin; d'altra banda, els sòls amb absència d'aigua inhibeixen el creixement a l'impedir l'absorció de nutrients. La humitat adequada es troba en l'interval 30-80%.
- (7) La presència natural en el sòl d'un gran nombre i varietat de microorganismes degradadors d'hidrocarburs representarà clarament un avantatge. En aquest cas, l'èxit del tractament de bioremediació radica en la complementació de les rutes metabòliques de les diferents espècies microbianes.
- (8) En alguns casos la contaminació d'hidrocarburs pot estar associada a alts nivells de metalls pesants*, que poden inhibir el creixement microbià.

3.5 ESTRATÈGIES DE BIOREMEDIACIÓ

Actualment i majoritària la neteja d'emplaçaments contaminats es realitza mitjançant mètodes fisicoquímics. Aquests són els tractaments d'immobilització, extracció, tèrmics i amb dissolvents. No obstant això, els avenços en biotecnologia han permès el desenvolupament de mètodes biològics per a la degradació i l'extracció de contaminants, uns processos englobats dintre el camp de la bioremediació. Potencialment, la bioremediació és més econòmica que les opcions químiques o físiques i pot tractar amb més eficàcia amb concentracions reduïdes de contaminants, encara que el tractament pot requerir més temps.

Les estratègies de bioremediació tant en sòls com en aigua són les que segueixen.

- Ús de la població microbiana autòctona.
- Estimulació de la població autòctona.
- Bioaugmentació.
- Fitoremediació.
- Addició de microorganismes modificats genèticament.

3.5.1 Població autòctona de microorganismes

Els sòls contenen una gran varietat de microorganismes que poden incloure, al seu torn, bacteris i fongs capaços d'utilitzar hidrocarburs. Tal com es comentava en l'apartat corresponent, la descontaminació realitzada per aquesta població de microorganismes, que existeix de forma natural, no és apreciable a curt termini atesa la baixa densitat de població.

Aquests microorganismes representen l'1% del total de la població de 10.000 a 1 milió de cèl·lules per gram de sòl. A més a més, s'han identificat certes espècies d'algues i cianobacteris capaces de degradar hidrocarburs. En el medi aquós, com pot tractar-se del mar, existeix una població microbiana que també compta amb microorganismes degradadors d'hidrocarburs.

L'estudi de les condicions del medi contaminat i l'anàlisi dels factors que condicionen la bioremediació, tractats en el capítol anterior, permeten un disseny més adequat per a cada tractament de bioremediació i, en conseqüència, un augment en el rendiment del procés.

3.5.2 Estimulació del creixement de la població microbiana autòctona

La biodegradació de compostos orgànics, hidrocarburs inclusivament, està associada al creixement i al metabolisme microbià i, en conseqüència, qualsevol factor que influeixi sobre el creixement o el metabolisme de la població també ho farà, encara que de forma indirecta, sobre la degradació. Existeix un gran nombre de factors que intervenen i afecten l'activitat dels microorganismes sobre els contaminants. La bioremediació es basa en el coneixement d'aquests factors de forma que es puguin optimitzar la velocitat i el grau de degradació (bioestimulació). D'aquesta manera, els *factors que condicionen la bioremediació d'hidrocarburs* exposats en la secció homònima, han de servir de fonament per a la comprensió de l'estimulació del creixement poblacional microbià.

3.5.3 Bioaugmentació

La bioaugmentació consisteix en l'addició d'organismes seleccionats, genèticament manipulats* o no, a medis contaminats per tal de complementar l'activitat de la població microbiana autòctona i accelerar el procés de degradació. En general, les poblacions de bacteris introduïdes es redueixen i deterioren. Aquest fet probablement sigui degut a la incompetència entre les poblacions autòctona i introduïda, que es veuen obligades a lluitar pel mateix aliment. Aquesta tècnica, però, pot esdevenir més efectiva si realment s'aconsegueix que les diferents poblacions es complementin. Sabem que el petroli és una mescla molt complexa de compostos orgànics. La caracterització d'aquesta àmplia gamma d'hidrocarburs i dels requeriments energètics de cada població, és a dir, dels compostos que poden metabolitzar, és condició *sine qua non* per aconseguir una adequada degradació a partir de la complementació de les rutes metabòliques.

Altres possibles causes que expliquin el mal funcionament de la bioaugmentació són:

- una concentració de contaminant insuficient per sostenir el creixement,
- el medi pot contenir substàncies inhibidores del creixement,
- les condicions de cultiu al laboratori poden no correspondre's a les de l'emplaçament contaminat i que es pretén netejar,
- el contaminant pot no ésser accessible als microorganismes introduïts,
- depredació de protozous sobre els microorganismes afegits i
- els microorganismes introduïts poden usar altres substrats* del medi, en lloc del contaminant.

En les últimes experiències de bioremediació, la bioaugmentació ha resultat ser una tècnica més útil quan s'han introduït *sòls activats* en lloc de *cultius purs*. Els *sòls activats* són aquells que contenen poblacions microbianes autòctones prèviament exposades al contaminant. La tècnica aconsegueix introduir poblacions desenvolupades de forma natural i no cultivades fora del sòl; a més, es tracta de poblacions mixtes, de manera que les diferents espècies complementen llurs vies metabòliques i s'aconsegueix una major degradació global. La supervivència de la població en el tractament de sòl activat, assegura la funcionalitat de la població en el tractament real de bioremediació.

En el nostre experiment ens hem basat en aquest principi a l'hora d'obtenir la població degradadora d'hidrocarburs derivats del petroli, de manera que obtinguérem una població de microorganismes que prèviament hagués estat exposada al contaminant que preteníem degradar en l'experiment.

Els bacteris no són els únics microorganismes emprats en bioaugmentació; els fongs també són vastament usats, atès que:

- poden desenvolupar-se amb facilitat tot i la manca d'aigua,
- són presents tant en aigua com en sòls i
- les hifes* poden penetrar el sòl, tornant el contaminant accessible per a la degradació.

Fins ara s'han realitzat diverses aplicacions reeixides de bioaugmentació per mitjà de fongs; a destacar, els inòculs* de fongs emprats pel bioaugment de sòls contaminats amb pentaclorofenol, amb un resultat d'eliminació del 80-90% del total de contaminant, en un termini 4 setmanes.

La informació genètica corresponent a un gran nombre de vies metabòliques per a la conseqüent degradació de substàncies contaminants es troba en els plasmidis* o altres elements mòbils (transposons*). L'ús d'aquests elements per produir noves rutes metabòliques per a la degradació de contaminants és una possible estratègia de bioaugmentació. Per exemple, s'està treballant amb l'afegiment de la varietat de bacteri *Enterobacter agglomerans* DK3, contenidora del plasmidi conegut com a RP4 Tn4371, el qual conté un gen que codifica per a la degradació del compost orgànic bifenil. S'ha comprovat que, quan la varietat de bacteri contenidora del plasmidi és afegida al sòl, aquesta desapareix ràpidament, és a dir, que no sobreviu. No obstant, el bacteri té temps

de transferir el plasmidi a altres microorganismes del sòl, els que, finalment, expressen el gen i, per tant, poden assimilar i degradar el bifenil.

Algunes de les noves vies metabòliques de degradació estudiades recentment semblen haver estat resultat d'associacions a l'atzar de gens transferits horitzontalment* i es pensa que aquests processos de transferència tenen lloc de manera natural en medis contaminats. En bioaugmentació, el subministrament de plasmidis pot ser útil quan el factor limitant* per la degradació del contaminant és l'absència d'una ruta metabòlica adequada.

La bioaugmentació, però, presenta un possible defecte derivat de la introducció de microorganismes aliens a un medi: la desestabilització de l'ecosistema. La intervenció de noves espècies en les cadenes tròfiques* dels organismes autòctons pot provocar l'extinció de les espècies natives.

3.5.4 Fitoremediació

La fitoremediació és una tecnologia emergent basada en l'ús de plantes per la neteja d'emplaçaments contaminats. Les tecnologies de fitoremediació són reconegudes com a mètodes econòmicament rentables per a l'extracció de contaminants i de metalls tòxics del medi atès que el cost relacionat amb el seu ús representa solament una fracció del cost vinculat a altres tecnologies convencionals, com la solidificació o la substitució de sòl. A més a més, el perjudici causat al sòl és mínim i ofereix la possibilitat de reutilitzar metalls. Per contra, els tractaments de fitoremediació poden ser més lents que altres mètodes de bioremediació i els contaminants poden afectar negativament el creixement de les plantes, les que, al seu torn, poden constituir un perill per a la flora i la fauna* de la zona i per a les cadenes alimentàries a les que pertanyen.

Una planta emprada en fitoremediació ha de ser tolerant al contaminant, disposar d'un sistema d'arrels abundant que permeti el seu emmagatzematge i tenir un factor de bioconversió⁵ elevat.

Les plantes capaces d'acumular altes concentracions de metalls es coneixen com a *hiperacumuladores* i poden emmagatzemar entre 50 i 100 vegades més metall que les plantes normals. La figura 1 sintetitza els processos de fitoremediació.

⁵ El factor de bioconversió és la concentració del contaminant a la planta en comparació de la del medi. La majoria de plantes tenen un factor de bioconversió menor a 1. En fitoremediació, el factor de bioconversió ha de ser 20 o major.

D'altra banda, existeixen diferents processos de bioremediació relacionats amb plantes aquàtiques o microorganismes associats a aquestes. La rizosfera és l'estreta regió del sòl immediata a les arrels de les plantes, en la que aquestes mantenen una relació de simbiosi o benefici recíproc amb els microorganismes que s'hi associen. Així, p. e., la rizosfera conté bacteris capaços d'absorbir substàncies perjudicials per les arrels, com el ferro, i d'aprofitar, en forma de nutrients, les secrecions tòxiques que emeten les plantes. Vegeu també la figura 1, adjuntada seguidament.

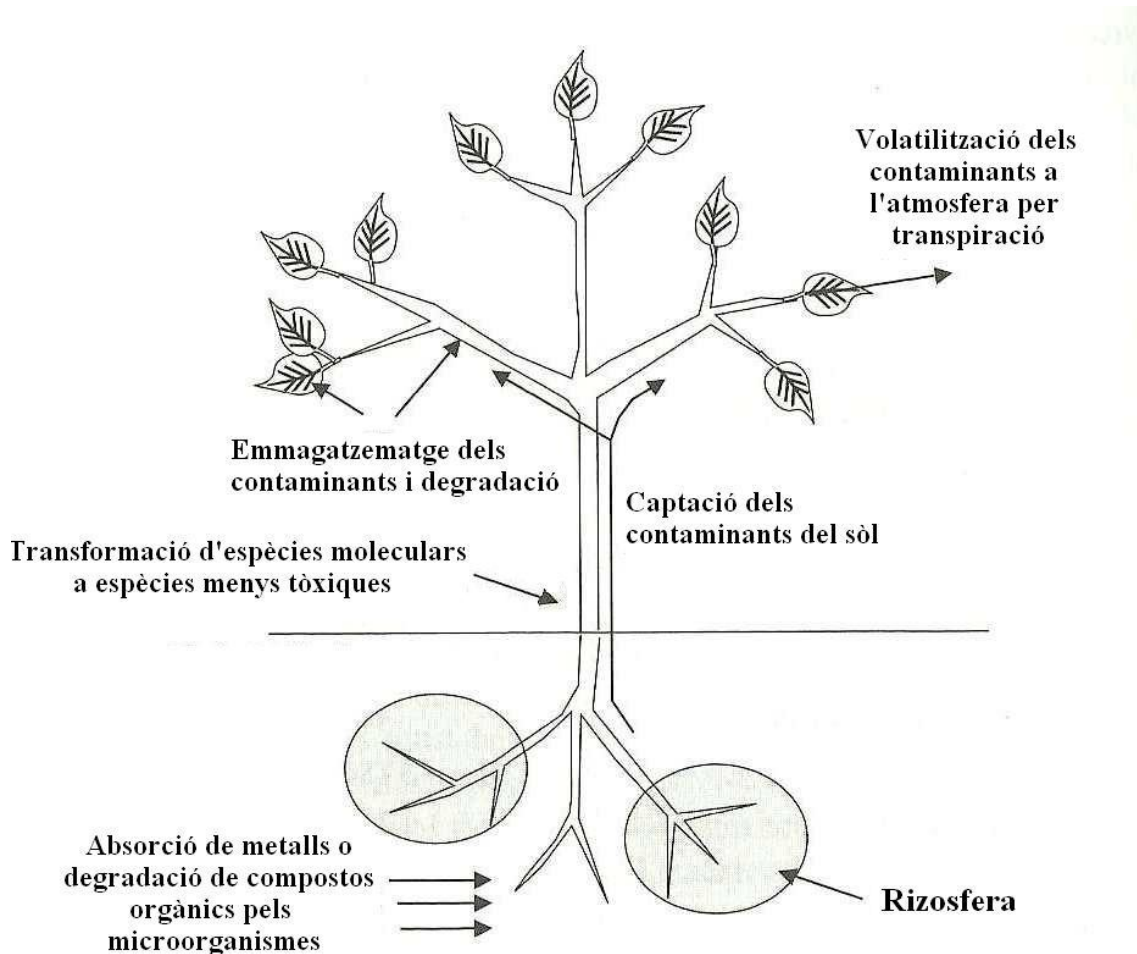


Figura 1 Síntesi dels processos de fitoremediació i de biodegradació a la rizosfera.
Adaptat de: Scragg (2005).

3.5.5 Organismes manipulats genèticament

La fabricació de microbis multidegradadors a partir de la manipulació genètica constitueix un altre camp de treball molt important dintre de les estratègies per millorar les condicions de bioremediació. El 1971, A. M. Chackrabarty (Índia, 1938) esdevenia la primera persona en produir un microbi multidegradador d'hidrocarburs mitjançant la tècnica del DNA recombinant*. La combinació de diferents plasmidis donà lloc a una

varietat de bacteri capaç de degradar càmfora, xilè, naftalè i octanol. L'experiment, que donà lloc a la primera concessió als Estats Units d'una patent per la construcció i ús de la varietat de bacteri, consistia en la introducció i combinació de gens de bacteris capaços de metabolitzar algun dels compostos que formen el cru de petroli en plasmidis, tal com s'explica en l'esquema següent:

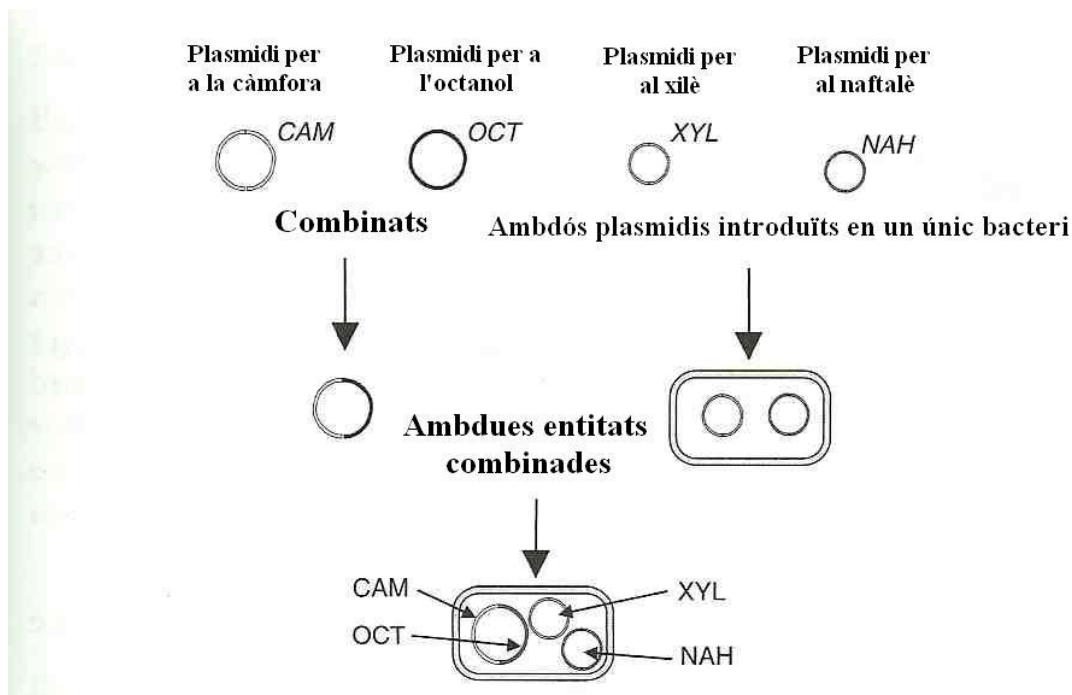


Figura 2 La construcció d'un bacteri degradador d'hidrocarburs mitjançant la combinació de quatre plasmidis de quatre bacteris diferents, contenidors de gens per a la degradació de càmfora (CAM), octanol (OCT), xilè (XYL) i naftalè (NAH). Els gens degradadors de càmfora i octanol es combinen en un plasmidi, mentre que els gens del xilè i el naftalè són afegits com a plasmidis separats en un bacteri contenidor de plasmidis. S'obté un organisme modificat genèticament capaç de degradar quatre hidrocarburs diferents. *Font:* Scragg (2005)

Cal afegir que aquesta varietat de bacteri, coneguda científicament com a *Pseudomonas putida*, ha estat emprada com a bioremei en diversos vessaments de petroli, d'entre els quals destaca el de l'Exxon Valdez.

En el capítol de descobriments recents, és interessant destacar la construcció d'“el bacteri sintètic” per l'equip de J. Craig Venter. Aquesta informació es veu analitzada en detall a l'annex 8.

La manipulació genètica en bioremediació planteja, però, problemes deguts a la incertesa dels efectes a llarg termini que poden produir els microorganismes modificats sobre l'ecosistema, a causa del creixement incontrolat o a la transferència d'informació genètica.

3.6 TÈCNiques DE BIOREMEDIACIÓ

Fonamentalment existeixen dos procediments de treball en bioremediació, segons si els productes contaminants són tractats en el seu emplaçament original –bioremediació *in situ*-, o no –bioremediació *ex situ*-.

En general, en parlar de tecnologies de bioremediació ens referim als processos d'enginyeria aplicada, que es basen en l'ús de tècniques apropiades per subministrar productes que millorin l'eficiència del sistema. Cal fer notar que el principal objectiu de qualsevol tipus de tractament de bioremediació d'enginyeria aplicada és incrementar significativament el percentatge de biotransformació*, de manera que es redueixi el temps emprat en la biodegradació i neteja del contaminant. D'aquesta manera, la bioremediació d'enginyeria aplicada pot ser molt rentable.

Tecnologies de bioremediació

Existeixen diferents tecnologies de bioremediació, l'efectivitat d'implantació de les quals dependrà tant de les característiques del medi com de les dels contaminants. L'estudi dels factors condicionadors de la tecnologia de bioremediació ens ha de ser útil per seleccionar la tecnologia a aplicar. Es dedica l'annex 4 a l'exposició de les diferents tecnologies de bioremediació: bioventing, biosparging i bioaugmentació/estimulació, en el cas de les tecnologies *in situ*; i bombeig, landfarming, compostatge, biopiles i bioreactor, en el cas de les *ex situ*.

3.7 DISCUSSIÓ

La bioremediació constitueix un nou enfocament en el tractament de residus contaminants i aborda les estratègies que poden ésser usades per eliminar contaminants biològicament. De fet, els tractaments biològics tenen diversos avantatges respecte dels processos convencionals de tractaments de residus. Alguns d'ells es mencionen seguidament:

- Mentre que els tractaments fisicoquímics poden extreure un sol contaminant o, com a molt, un petit grup dintre d'un ampli conjunt, els tractaments biològics separen una gran varietat de contaminants en un sol pas.
- Mentre les condicions meteorològiques són favorables, els processos de tractament biològic consumeixen menys energia.
- En tractaments biològics, els riscos d'explosió, corrosió, fugues de gas tòxic, etc. són mínims.
- Com menys complex és l'equipament requerit per mantenir les condicions desitjades pel procés de tractament biològic, la inversió de capital és menor.

Un desavantatge important que tenen els processos de tractament biològic és que requereixen espais molt grans. El temps de tractament també acostuma a ser força elevat.

La bioremediació ens permet afrontar un ampli ventall de contaminants de forma econòmica, eficient i poc intrusiva. Un dels principals avantatges n'és, precisament, la mateixa degradació de contaminants, atesa la petita quantitat de subproductes o residus que afecten el medi generada. D'altra banda, els sòls i les aigües contaminades poden ser purificades in situ, tal com es descrivia en l'apartat anterior, evitant d'aquesta manera el trasllat forçat dels contaminants i, potser, part del medi. En cas que no existeixin les condicions adequades per l'aplicació de la bioremediació es poden crear. Això resulta molt pràctic, per exemple, en el cas de les aigües subterrànies, ja que no es fa indispensable l'excavació i el posterior bombeig de la substància contaminada a la superfície. Això, en conseqüència, contribueix a que els treballadors que realitzen la descontaminació no hagin de contactar directament amb medis contaminats.

Si es crea un medi favorable mitjançant el subministrament de productes deficients com nutrients i oxigen, la densitat de població dels microorganismes augmentarà, el que resultarà en un augment de la velocitat del procés de descontaminació. Aquest és el

principi en el qual es basa la bioremediació. Un bon coneixement d'aquests factors ens permetrà bioestimar els microorganismes existents i augmentar la biodegradació.

D'altra banda, existeix un possible efecte advers derivat de la introducció de determinats microorganismes aliens a un medi (bioaugmentació); es tracta de la desestabilització de l'ecosistema ja prèviament afectat pel contaminant.

La contínua recerca per a la millora dels processos de remediació propicia l'aparició de noves aplicacions per fer front a contaminants recalcitrants o compostos químics no biodegradables. En relació a aquest aspecte de la bioremediació, podeu consultar la degradació de *xenobiòtics* a l'annex 3.

Un camp d'aplicació de la biodegradació d'hidrocarburs derivats del petroli és el tractament de vessaments de cru de petroli, que es pot veure ampliat en l'annex 7.

4 PRÀCTICA EXPERIMENTAL

4.1 PLANTEJAMENT INICIAL

Problema

Se suposa un fenomen de contaminació per derivats d'hidrocarburs i es planteja la pregunta: existeixen microorganismes capaços d'eliminar del medi aquests elements contaminants?

El disseny experimental té l'objectiu de comprovar-ho i, també, demostrar-ho. Es realitzen 2 tractaments distints.

Un segon problema es planteja en la següent pregunta: quin efecte té la presència de sals inorgàniques sobre l'activitat degradant dels microorganismes?

En aquest aspecte també s'elaboren 2 tractaments diferents, segons la variable descrita.

Hipòtesis

- 1- Existeixen microorganismes que poden degradar derivats dels hidrocarburs.
- 2- La presència de sals inorgàniques influeix sobre la degradació microbiana.

Deducció

- 1- Suposem que hi ha microorganismes –bacteris, principalment- capaços d'assimilar i degradar hidrocarburs; llavors si els exposem a un medi que contingui algun producte format per derivats dels hidrocarburs, aleshores observarem que la quantitat inicial de producte disminueix.
- 2- Suposem que la presència de sals inorgàniques influeix sobre la degradació microbiana; llavors si en subministrem a la població de microorganismes, aleshores veurem que la quantitat de producte contaminant degradat difereix segons la presència o absència de sals. En aquest aspecte es preveu que les sals emulsionin el contaminant facilitant-ne la degradació i que siguin emprades com a font de nutrients, de fòsfor i nitrogen principalment.

Variables

- INDEPENDENTS: La presència de microorganismes i la presència de sals inorgàniques.
- DEPENDENT: La reducció de la quantitat d'oli, mesurada per cromatografia de gasos. / La degradació microbiana del contaminant.

4.2 DISSENY

Primerament es descriu l'obtenció del sòl contenidor dels microorganismes i de l'oli mineral, contaminant objectiu derivat d'hidrocarburs; es prossegueix amb el muntatge físic de la pràctica.

Obtenció prèvia

La mostra de sòl que s'ha d'utilitzar ha de contenir microorganismes –bacteris, essencialment- a fi que aquests puguin consumir l'oli que se'ls subministra i, en conseqüència, el degradin. La citada mostra és extreta d'un emplaçament sotmès a episodis recurrents de contaminació per hidrocarburs similars als que formen l'oli que pretenem degradar. Un taller mecànic és un medi ideal d'obtenció del sòl. Recordem que el terra d'un taller mecànic està exposat a contínues gotes d'oli mineral de cotxe o de moto durant l'intercanvi d'oli en els vehicles. Un pas previ a la preparació dels diferents tractaments dissenyats és, doncs, aquesta obtenció dels sediments que continguin els bacteris necessaris. Això s'aconseguí rasant el terra del taller amb una paleta.

Òbviament també es necessita la font d'energia i de carboni per aquests bacteris. Es tracta d'oli mineral de màquina usat en els cotxes. Es caracteritza visualment per ser líquid, negre i viscos; és una mescla extremadament complexa i variable formada per diversos milers de compostos, majoritàriament hidrocarburs (en un 50-98%), i en un menor grau metalls –ferro, vanadi, níquel...-.

Muntatge físic⁶

Es preparen 4 tractaments per duplicat. S'etiqueten els 8 pots de què precisem per distingir els diferents tractaments. Així, marquem els pots de l'1 al 4 per identificar els tractaments i A o B per identificar les rèpliques dels originals. Obtenim la relació següent de pots:

Originals: 1-A, 2-A, 3-A, 4-A.

Rèpliques: 1-B, 2-B, 3-B, 4-B.

A cada un dels pots s'hi posen 125ml d'aigua destil·lada -fent ús d'una proveta- i 5,5g d'oli mineral de cotxe –emprant una balança, un vas de precipitats i una espàtula-.

⁶ Vam obtenir el muntatge físic complet en la data de 14 d'octubre de 2010.

L'aigua és el medi de dissolució dels nutrients perquè aquests puguin ser incorporats i assimilats pels microorganismes.

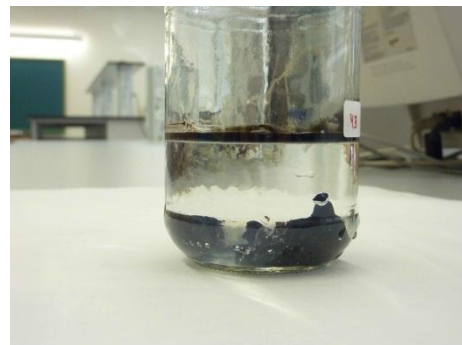
Tal i com s'explicava en el segon objectiu marcat anteriorment, els diferents tractaments són sotmesos a condicions distintes. D'aquesta manera, el pot 1-A i la seva rèplica, 1-B, només contindran l'aigua i l'oli, constituint el control de l'experiència. Als pots 2-A i 2-B s'hi afegeix una barreja de sals inorgàniques en la següent proporció:

- 0,25g de fosfat amònic
- 0,05g de sulfat amònic
- 0,25g de fosfat potàssic
- 1,25g de clorur sòdic

Per realitzar aquest procés s'utilitzen una balança, paper de plata i espàtules –diferents per cada producte-.

Als pots 3-A i 3-B s'hi afegeixen 5g de la mostra de sòl, respectivament. S'empren una balança, plaques de Petri i espàtules.

Als pots 4-A i 4-B s'hi afegeixen les sals inorgàniques i la mostra de sòl (en les mateixes proporcions i seguint el mateix procediment). En la fotografia del marge dret, corresponent al tractament 4-B al començament de l'experiment, es distingeixen clarament una fase superior que correspon a l'oli mineral i una fase aquosa més densa a baix, a la part inferior de la qual es dipositen els sediments contenidors de microorganismes.



Il·lustració 1 El tractament 4-B a l'inici de l'experiment (14/10/10).

Es tanquen els pots amb les seves respectives tapes, per tal de reduir la vaporització durant el tractament. A aquestes tapes, preliminarment, se'ls haurà fet un forat -amb un trepant- a través del qual es pugui fer passar un tub d'aquari i mitjançant el qual es puguin subministrar oxigen de forma contínua. Aquests tubs d'aquari tindran, en l'extrem que quedi dintre del pot, un difusor que permeti el repartiment d'oxigen més homogeni possible. L'altre extrem del tub quedarà unit a una de les quatre vies de la clau, acoblada, al seu torn, a un airejador, connectat al corrent elèctric. Aquest airejador

serà, en últim terme, l'encarregat de proporcionar les condicions aeròbiques (amb oxigen) als bacteris degradadors durant tot el tractament, de manera que estarà permanentment connectat al corrent.

La següent taula mostra la relació de components presents segons el tractament:

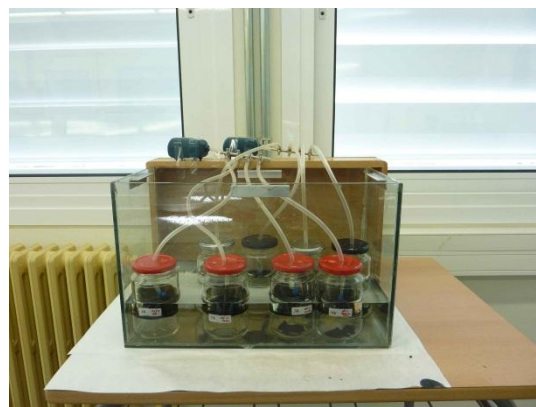
	TRACTAMENTS			
	1	2	3	4
Volum d'aigua	125 ml	125 ml	125 ml	125ml
Massa d'oli	5,5 g	5,5 g	5,5 g	5,5 g
Presència de sals		X		X
Massa de sòl			5,5 g	5,5 g

Taula 1 Composició inicial dels 4 tractaments.

Finalment es col·loquen els 4 tractaments amb les 4 rèpliques corresponents dins un aquari. S'afegeix a aquest mig pam d'aigua. En les fotografies que es mostren seguidament es pot apreciar el muntatge físic global simplificat en dos passos.



Il·lustració 2 Muntatge global intermedi amb la col·locació dels difusors i els airejadors.



Il·lustració 3 Muntatge complet amb els 4 tractaments i les rèpliques corresponents.

Les variables controlades⁷ són factors, diferents de la variable independent, que podrien influir en els resultats i que, per tant, s'han de mantenir constants. Aquests són:

- La llum: es col·loca qualsevol objecte opac que eviti l'exposició directe dels tractaments a la llum solar.

⁷ Les variables controlades s'acostumen a descriure de forma immediatament posterior a la resta de variables, però per motius de comprensió del text s'han decidit explicar després del disseny experimental.

- La temperatura: l'afegiment del mig pam d'aigua a l'aquari té el fi de mantenir la temperatura constant.
- La composició química de l'aigua: es procura utilitzar la mateixa aigua destil·lada en tots els tractaments.
- L'evaporació: el forat realitzat a la tapa dels pots s'intenta fer el més petit possible per encabir-hi únicament el tub que subministra oxigen i no permetre l'evaporació de l'aigua del pot.

Observacions sobre el comportament dels tractaments

Abans d'explicar el complex procés d'obtenció de dades, és necessari fer notar algunes observacions interessants que s'han apreciat durant l'experiment, que ha durat poc més d'1 mes, del dijous 14 d'octubre de 2010 al dijous 18 de novembre de 2010.

Atès que l'oli mineral és insoluble en aigua i és menys dens, flota fins a la superfície i forma capes; els bacteris oxidants d'hidrocarburs són capaços d'adherir-se a les gotes d'oli insoluble. L'efecte d'aquests bacteris en un determinat moment dona lloc a la descomposició del contaminant i a la dispersió de la capa.

A partir de les dues setmanes de funcionament de l'experiment, ja s'endevina visualment l'activitat de degradació dels bacteris, ja que els tractaments 3 i 4 semblen contenir una menor quantitat d'oli. D'altra banda, l'oli dels tractaments 2 i 4, contenidors de sals inorgàniques, sembla ser menys espès que l'oli dels tractaments 1 i 3. Això podria ser un factor important, almenys si l'experiment s'allargués més temps. Les sals fan que l'oli es disposi en micel·les i, per tant, augmenten la superfície de contacte amb els microorganismes, el que *a priori* permet una major degradació de l'oli. Cal dir que l'oli del tractament 3 també sembla haver esdevingut una mica menys espès en comparació al del tractament 1.

Finalment, s'ha de fer notar un altre aspecte visual que ja s'havia començat a apreciar durant el mes que durat l'experiència. Es tracta de la gradació de colors de la fase aquosa comparant individualment els tractaments. Això és un senyal de l'activitat microbiana. Així, tal i com pot veure's en la foto adjunta, observem el matís més obscur de la fase aquosa del tractament 4 en contraposició al to més clar del tractament 1. Els tractaments 2 i 3 tenen tonalitats intermèdies.



Il·lustració 4 El tractament 1-A a data de 18 de novembre de 2010.



Il·lustració 5 El tractament 2-B (18/11/10).



Il·lustració 6 El tractament 3-A (18/11/10).



Il·lustració 7 El tractament 4-B (18/11/10).

4.3 TÈCNICA ANALÍTICA PER A L'OBTENCIÓ DE DADES

4.3.1 Descripció del fonament i equipament de la tècnica

L'obtenció de dades analitzables per a la gestió de la contaminació per compostos orgànics sovint precisa de la cromatografia de gasos. La cromatografia de gasos permet identificar els compostos existents en una mescla i seguir el procés de bioremediació a partir de l'observació dels canvis que experimenten els cromatogrames* al llarg del temps.

La cromatografia és un mètode físic de separació que permet la caracterització de mescles complexes. Existeix una fase mòbil consistent en un fluid –en la nostra experiència, heli- que arrossega la mostra –l'oli mineral- a través d'una fase estacionària –polímer de siloxà- fixa, a través de la columna⁸ cromatogràfica. Els components de la mescla interaccionen diferentment amb la fase estacionària. Aquesta interacció, que en conseqüència provoca una major o menor retenció del compost, depèn de la naturalesa dels grups funcionals de la fase estacionària i dels de la mostra de lectura. Així, s'aconsegueix que els components travessin la fase estacionària a velocitats distintes i se separin. El temps de pas característic de cada component a través de la columna s'anomena temps de retenció. En atenció a això, si, per exemple, un component interacciona *molt* amb la fase estacionària, tardarà més a recórrer la columna i, per tant, tindrà un temps de retenció major.

Una vegada els components hagin passat per la fase estacionària, separant-se, passen per un detector que transforma el senyal del pas dels components en senyal elèctric – assimilable per un ordinador-. Llavors, la pantalla de l'ordinador ofereix un perfil cromatogràfic amb pics més grans o més petits segons la quantitat proporcional que s'hagi detectat de cada component i el seu temps de retenció.



Il·lustració 8 Imatge del cromatògraf de gasos emprat. Laboratori de la Universitat de Vic.

Cada pic del cromatograma correspon a un compost de la mescla injectada.

⁸ Hem emprat una columna APOLAR DB-5 equivalent a una fase estacionària de 95% dimetil 5% difenil polisiloxà.

La cromatografia, doncs, eminentment s'utilitza amb dos fins. L'un és el de separació dels components d'una mescla; el segon, i el que ens interessa en aquest cas, és el de mesura de les proporcions dels components d'una mescla –finalitat analítica-. En aquest aspecte, la cromatografia ens permet identificar i determinar proporcionalment les quantitats dels components de la mescla.

A mesura que els productes derivats dels hidrocarburs envelleixen o es degraden al medi, el seu perfil cromatogràfic es modifica, i pot mostrar tant el descens o desaparició d'alguns dels pics degut a la degradació total o parcial dels compostos que formaven originàriament la mescla, com l'aparició de pics degut a la formació de metabòlits intermedis relacionats amb el metabolisme microbià.

L'espectrometria de masses és una aplicació molt important vinculada a la cromatografia de gasos. És molt útil per a la caracterització molecular d'una mescla, ja que per mitjà de la fragmentació dels seus components ens aporta informació sobre l'estructura de les molècules que la componen. També en permet la identificació dels compostos.

Aquesta tècnica analítica es basa en la ionització de la mostra i la posterior separació dels ions en funció de la seva relació massa molecular-càrrega elèctrica. Els espectres que s'obtenen són com empremtes digitals dels components de la mescla que s'analitza. Com que podem obtenir una *empremta digital* particular per a cada pic del cromatograma –cada un dels quals correspon a un component determinat de la mescla-, també podem conèixer informació molecular sobre cada un d'aquests components. Això permet, per exemple, determinar la presència de molècules molt contaminants, si en coneixem l'estructura, o de productes propis del metabolisme dels éssers vius.

La cromatografia de gasos, en principi, no havia de ser la tècnica analítica emprada per a l'obtenció de resultats. No obstant això, vam considerar que el mètode proposat originalment no tenia suficient rigor científic, ateses la subjectivitat amb què s'havien d'interpretar els resultats i els numerables factors incontrolables susceptibles d'influir en l'obtenció de resultats. Aquest protocol inicial, doncs, consistia en la mesura del diàmetre d'unes taques d'oli extretes de cada tractament periòdicament, després de l'evaporació de l'aigua arrossegada. Es tractava, seguidament, de valorar l'evolució amb el temps del diàmetre d'aquestes taques i comprovar-ne, en teoria, la seva disminució en els tractaments contenidors de microorganismes.

4.3.2 Preparació prèvia a la cromatografia*

El cromatògraf és l'instrument utilitzat per a dur a terme les anàlisis cromatogràfiques; és un aparell molt sensible, de manera que una concentració molt elevada de fase orgànica/ml d'extracte (oli + solvent) ens saturaria la columna del cromatògraf. Tal i com pot observar-se en la foto del marge, la mostra que pretenem analitzar és encara molt negra, opaca i espessa. Per tant, s'ha de diluir la mostra abans d'analitzar-ne la composició.



Il·lustració 9 Vista aèria del tractament 3A a 18/11/10.

El protocol de dilució de les mostres i els paràmetres i condicions cromatogràfics es descriuen detalladament a l'annex 9.

* Malgrat que havíem preparat i mantingut les 4 rèpliques corresponents als 4 tractaments originals, només es van analitzar per mitjà de cromatografia les 4 mostres originals. Hagués estat necessari comparar els resultats obtinguts amb els de les 4 rèpliques. Les rèpliques permeten descartar que els resultats siguin deguts a l'atzar o a altres factors no tinguts en consideració.

4.4 RESULTATS. INTERPRETACIÓ I DISCUSSIÓ

En primer lloc, cal remarcar que l'estudi i comparació dels cromatogrames obtinguts i corresponents a cada un dels tractaments s'ha dut a terme seguint una metodologia qualitativa, és a dir, s'ha evitat de provar o de mesurar el fenomen de la bioremediació amb dades numèriques. En lloc de valorar els resultats en quant a les quantitats – interpretació que segurament s'escapava de l'abast d'aquest treball- s'ha pretès la descripció de les qualitats dels fenòmens observats i transcrits en forma de cromatograma. D'aquesta manera, ha de bastar la comparació entre els cromatogrames globals que corresponen als diferents tractaments.

Prosseguim amb la discussió de la primera hipòtesi: necessitem comparar els cromatogrames corresponents als tractaments exposats a les mateixes condicions (de sals). Doncs, per tal de facilitar una millor lectura i comparació dels resultats, s'exposen els cromatogrames dels tractaments 1-A i 3-A conjuntament i seguida, des de la pàgina 34; igualment per a 2-A i 4-A.

Recordem que els cromatogrames indiquen la relació entre els temps de retenció (eix d'abscisses) i la quantitat proporcional (eix d'ordenades) de cada component de la mescla analitzada. Sobre els pics més representatius de cada perfil apareixen tres xifres numèriques. El valor superior és l'únic que es valorarà –més endavant- i especifica el temps de retenció exacte dels components detectats en major quantitat.

Sample ID: TROLIS3A-assecada-SiO2-Na2SO4-CH2Cl2-1a F-X SerraHe-1,2ml/min - DB5

Acquired on 16-Dec-2010 at 20:50:42

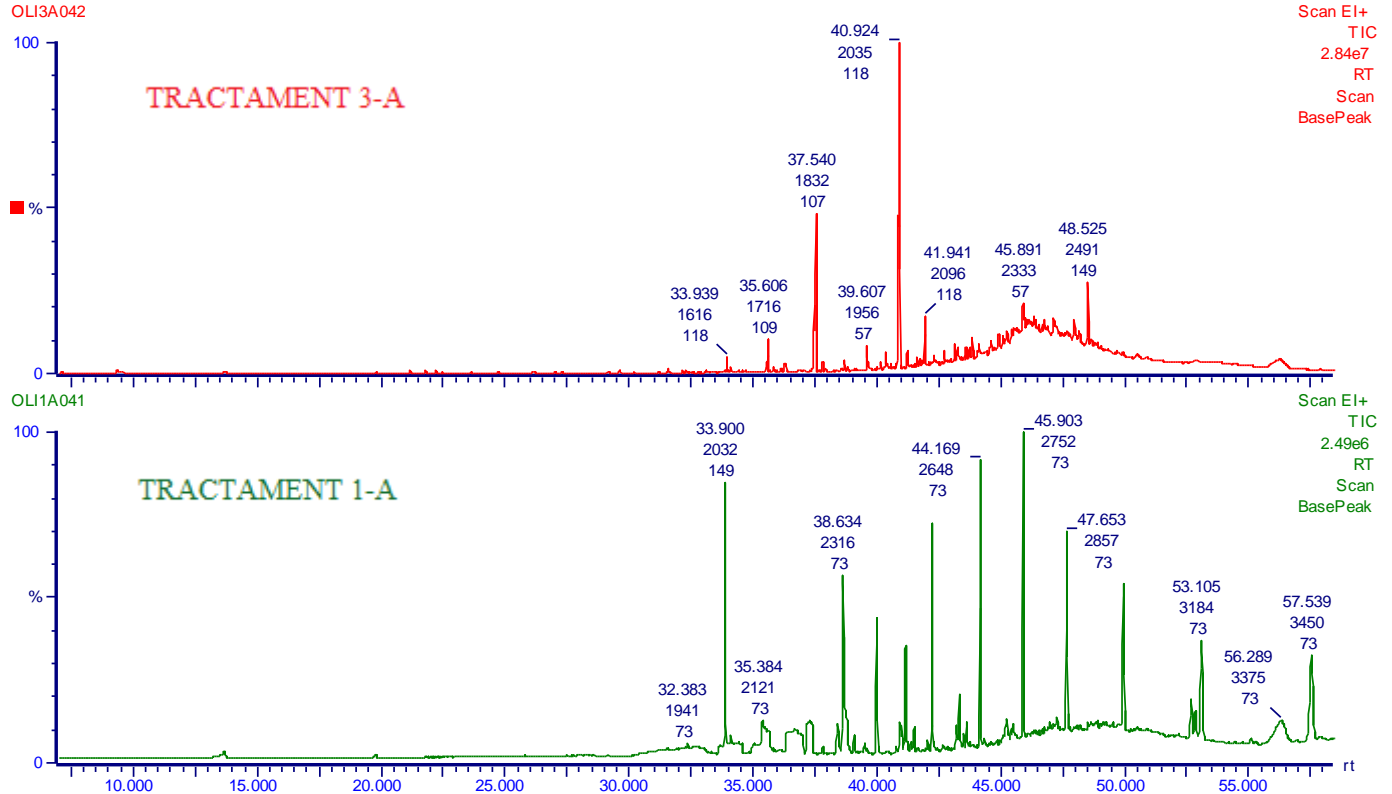


Figura 3 Comparació dels perfils cromatogràfics del temps de retenció 0 al 60 minuts dels tractaments 3-A (a dalt i en vermell) i 1-A (a baix i en verd).

Sample ID: TROLIS4A-Assecada-0.4qSiO2-Na2SO4-CH2Cl2-2a F-XSRHe-1,2ml/min - DB5

Acquired on 23-Dec-2010 at 11:22:25

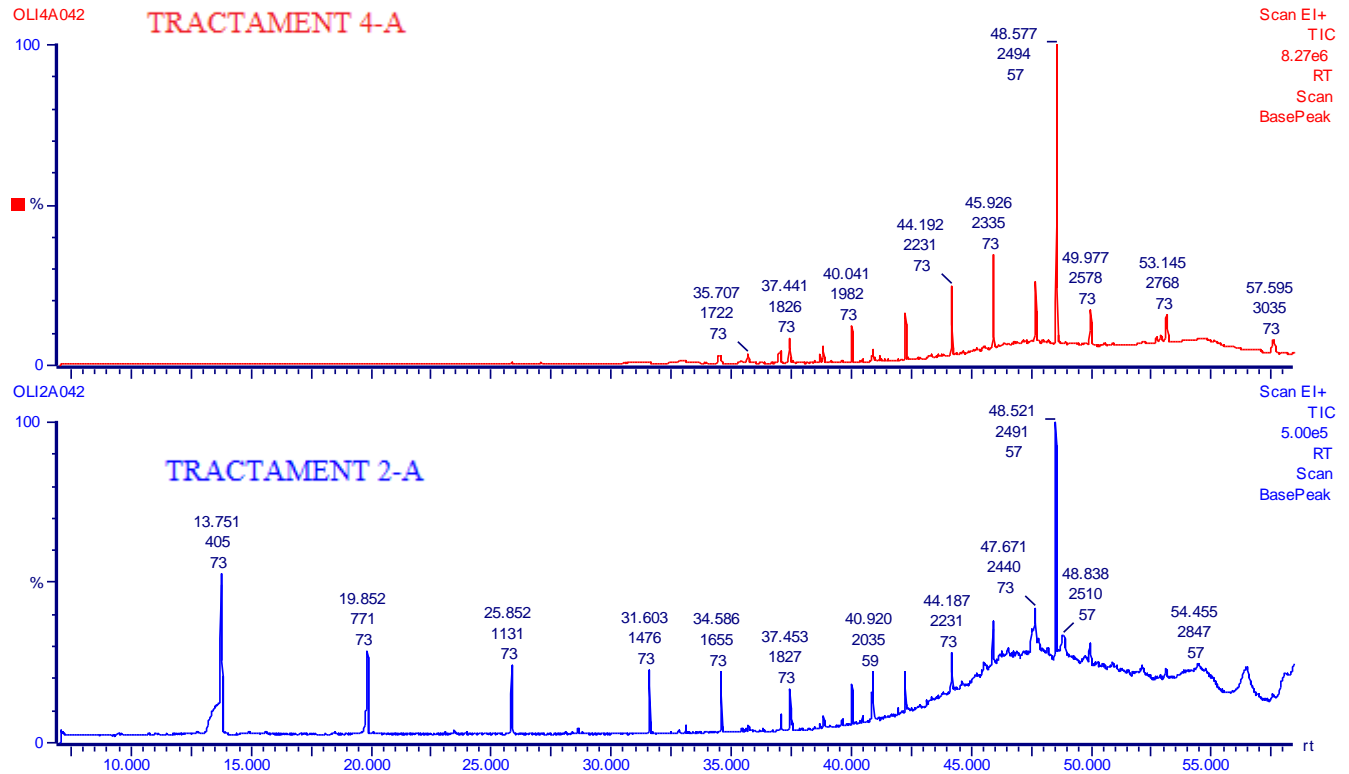


Figura 4 Comparació dels perfils cromatogràfics del temps de retenció 0 al 60 minuts dels tractaments 4-A (a dalt i en vermell) i 2-A (a baix i en blau).

Globalment i igual, en els 4 cromatogrames s'observa una detecció –i, per tant, presència- important de molècules a partir del temps de retenció 35' fins al final. Per mitjà de la comparació de la secció (35-60)' dels cromatogrames dels tractaments 1-A i 3-A d'una banda, i 2-A i 4-A per l'altra, detectem una menor presència de compostos en els tractaments que contenen els sediments amb microorganismes. En atenció a això, acceptem la hipòtesi número 1 referent a l'existència de microorganismes capaços de metabolitzar compostos derivats dels hidrocarburs.

En el cas del tractament 3-A identifiquem la presència d'un gran nombre de pics, encara que relativament petits, repartits al llarg de l'interval 10-30 minuts de temps de retenció. Es tracta d'uns pics la majoria dels quals no apareixien en el cromatograma de l'1-A. Per tant, pot tractar-se de metabòlits intermedis, compostos propis del metabolisme de la població microbiana que no ha estat capaç –per manca de rutes metabòliques- de dur a terme el procés complet de degradació de la matèria orgànica.

En aquest sentit cal aclarir que l'evident presència de pics al tractament 2-A no correspondria a l'existència de metabòlits intermedis. És important mencionar que l'anàlisi corresponent al tractament 2-A no es va realitzar el mateix dia que la resta, el 16 de desembre de 2010, sinó el 23 del mateix mes. Aquests pics que s'observen, especialment en el període (0-35)', serien atribuïbles a la fase estacionària de la columna cromatogràfica, que -ateses les condicions extremes a què sotmetem l'extracte injectat- hauria estat arrossegada essent detectada, en conseqüència, pel detector. Aquest fenomen s'anomena sangrat de columna.

Ara bé, l'aparició de pics *estranyos* –no presents en el gràfic del tractament 2-A- en el del 4-A certament podria ser deguda a la detecció de compostos metabòlics, com en el cas del cromatograma del 3-A.

En la secció *Descripció del fonament i equipament de la tècnica* es definia i comentava l'ús de l'espectrometria de masses. Doncs bé, segons aquesta tècnica, hem pogut esbrinar que els *nous* pics que apareixen en els cromatogrames de les mostres 3-A i 4-A molt probablement pertanyen a compostos del grup dels diàcids. Els diàcids són productes comuns del metabolisme dels animals i altres organismes. L'aparició d'aquests pics, per tant, pot ser resultat de l'activitat metabòlica dels bacteris.

Tot aquest seguit d'observacions reforcen els arguments a favor de la validesa de la hipòtesi 1.

D'altra banda, és molt interessant fer notar la gran correspondència entre els temps de retenció d'una part dels pics dels gràfics comparats. Per exemple, si es comparen els temps de retenció (valor numèric superior dels tres que s'exposen a sobre dels pics més representatius) dels cromatogrames del 2-A i del 4-A observem: 19.852 –en 2A- i 19.853 –en 4A-, 25.852 i 25.855 o 13.751 i 13.719. Aquests temps de retenció tan similars corresponen als mateixos compostos, però detectats en tractaments diferents. Els compostos han interaccionat de manera igual amb la fase estacionària i, per tant, han estat detectats aproximadament en el mateix temps de retenció, independentment del tractament, atès que no han estat degradats en cap dels dos.

També s'han volgut comparar les seccions 10-30 minuts ampliades dels distints tractaments, perquè la biodegradació de molècules complexes en molècules més simples hauria de donar lloc a l'aparició de nous pics corresponents a aquestes últimes molècules especialment en la secció (10-30)'. En aquest aspecte, la comparació entre tractaments es mostra a continuació.

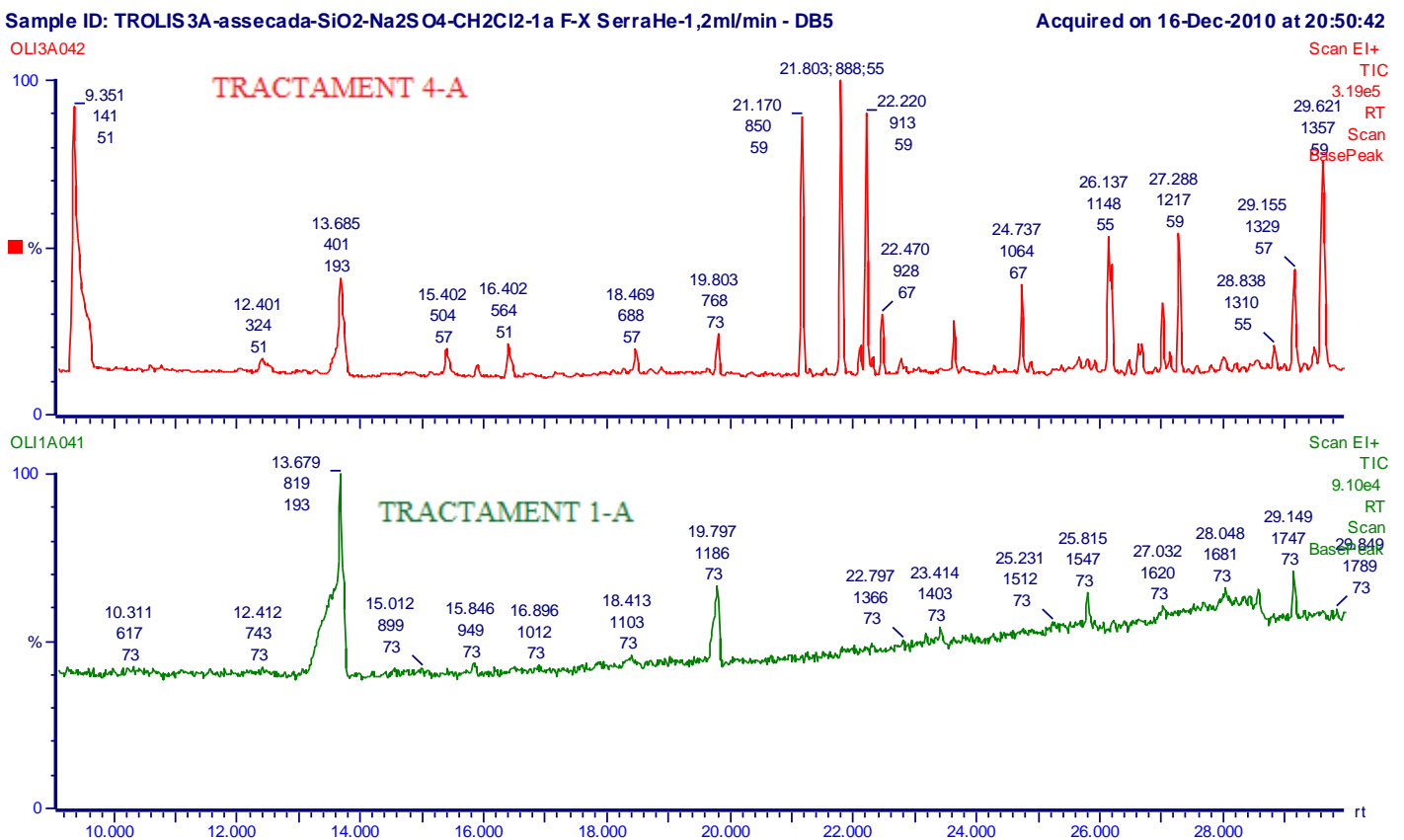


Figura 5 Comparació dels perfils cromatogràfics del temps de retenció 0 al 35 minuts dels tractaments 3-A (a dalt i en vermell) i 1-A (a baix i en verd).

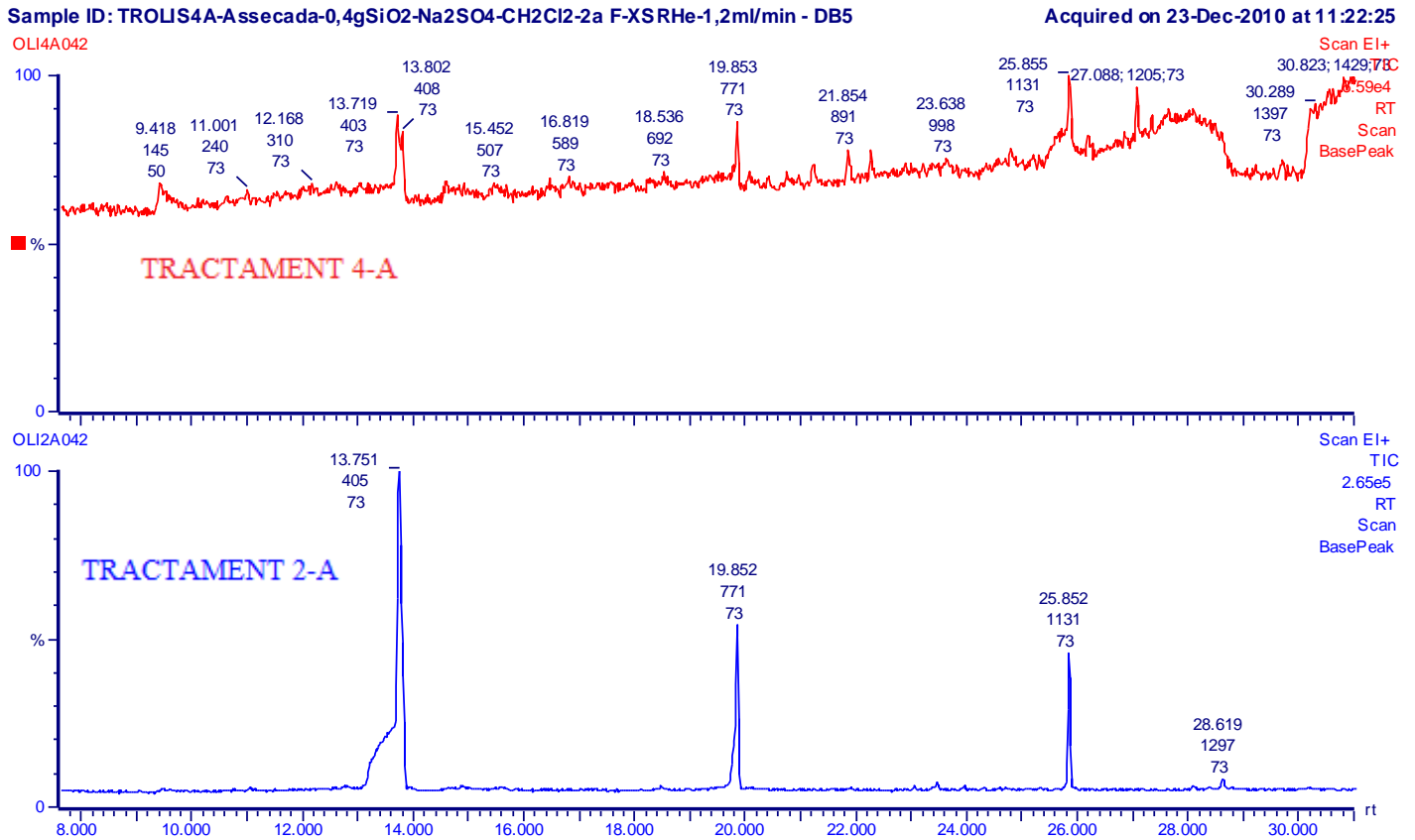


Figura 6 Comparació dels perfils cromatogràfics del temps de retenció 6 al 35 minuts dels tractaments 4-A (a dalt i en vermell) i 2-A (a baix i en blau).

En quant a la segona hipòtesi plantejada inicialment, és important fer notar la necessitat de comparar els gràfics corresponents als tractaments 3-A i 4-A, ambdós contenidors de sediments amb microorganismes però diferents segons l'absència/presència de sals. Abans de presentar qualsevol deducció cal admetre que els resultats obtinguts i analitzats no són suficientment representatius com per afirmar o negar que la presència de sals en el medi representi un avantatge en la biodegradació d'hidrocarburs. Observant els cromatogrames globals dels dos tractaments a la figura 7, sembla que efectivament es produeixi la biodegradació del substrat diferentment. Això suposa l'acceptació de la hipòtesi 2, però no la manera en què concerneix la població microbiana.

Sample ID: TROLIS4A-Assecada-0,4gSiO2-Na2SO4-CH2Cl2-2a F-XSRHe-1,2ml/min - DB5

Acquired on 23-Dec-2010 at 11:22:25

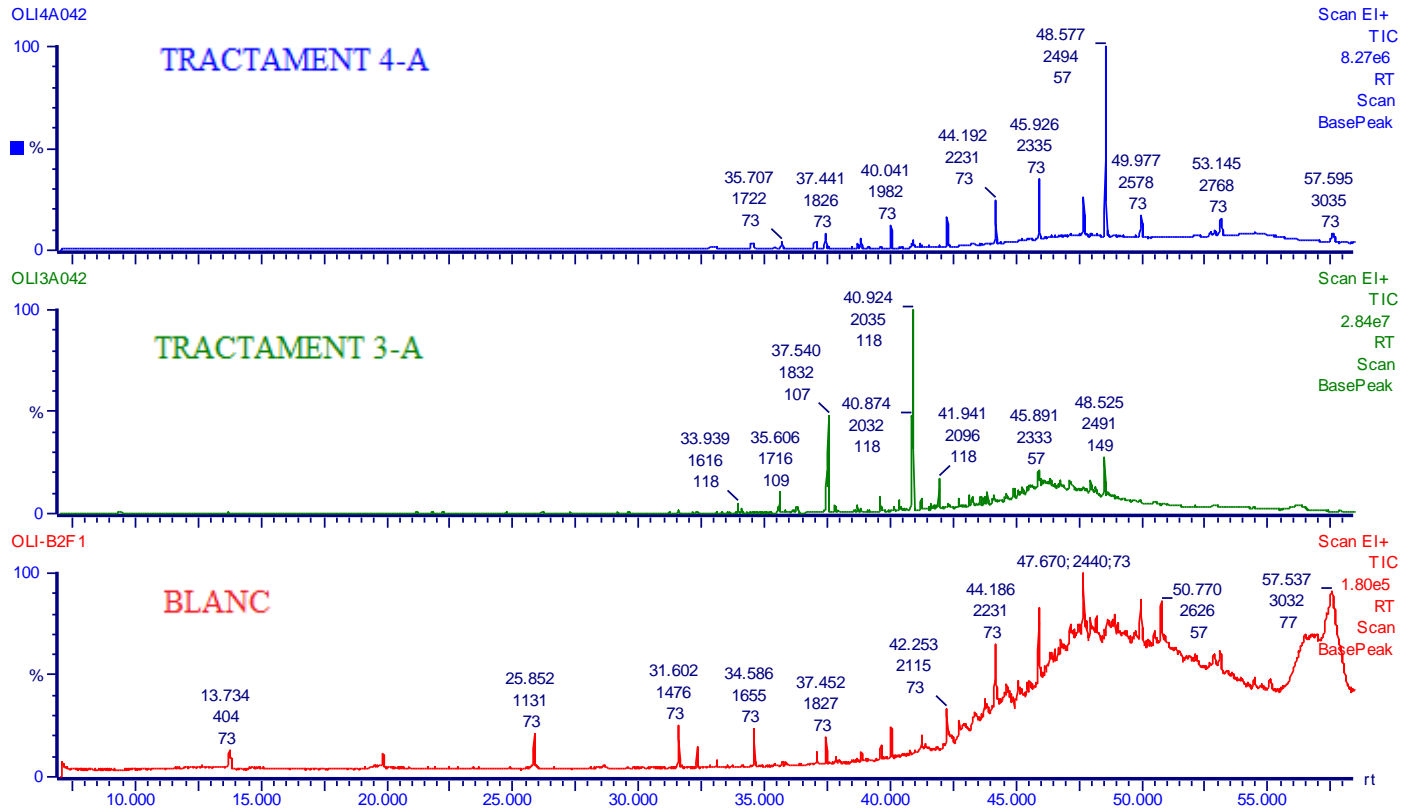


Figura 7 Comparació dels perfils cromatogràfics del temps de retenció 0 al 60 minuts dels tractaments 4-A (a dalt i en blau), 3-A (al mig i en verd) i del blanc, és a dir, l'oli mineral "pur" no sotmès a cap tractament (a baix i en vermell).

Una possibilitat no bastantment contrastada és la major degradació, en absència de sals, dels compostos inicials de l'oli, que explicaria l'*aparent* presència de menys pics en el cromatograma del tractament 3-A. Observem que en el gràfic del 3-A desapareixen, respecte del 4-A, uns pics molt alts detectats entre els temps de retenció 40-60 minuts. En contraposició, en el 3-A apareixen uns pics molt representatius entre els temps de retenció 35-45 minuts. Aquests podrien correspondre's amb els compostos detectats importantment en el 4-A durant els temps de retenció (40-60)', però -havent estat, aquests, degradats i reduïts- haurien estat detectats abans, entre els temps de retenció (35-45)'. Això significaria que la presència de sals al medi de contaminació –en les condicions del treball experimental- no afavoreix la degradació del contaminant hidrocarbur.

5 CONCLUSIONS

La bioremediació és, doncs, una solució completament vàlida i útil als fenòmens recurrents de contaminació; almenys als provocats per derivats dels hidrocarburs. No obstant això, manca encara un llarg procés de desenvolupament de les tècniques actuals a partir de l'estudi dels condicionants que influeixen sobre el creixement o el metabolisme microbià i que, subsegüentment, també ho fan sobre la degradació del substrat. Aquesta és la base de l'optimització del procés de bioremediació que pot donar lloc a l'increment del grau de degradació del contaminant -sempre i quant existeixin les rutes metabòliques necessàries-.

En atenció a això i si realment s'assoleix un alt grau de biotransformació del contaminant en qüestió, la bioremediació compta amb un ventall innumerable d'aplicacions pràctiques, com la neteja dels vessaments de cru de petroli als mars.

La demostració experimental del fenomen ha resultat, sens dubte, la tasca més complexa i àrdua del que ha representat, personalment, un vertader descobriment científic: la bioremediació.

M'agradaria començar a tancar aquestes línies amb un proverbi:

“La naturalesa es sàvia. Aprenem-ne”.

I és que la bioremediació, en essència, exemplifica clarament el significat d'aquesta frase. L'evolució –i la selecció natural- ha estat capaç de proveir alguns dels seus habitants de la capacitat –en forma d'informació genètica- de degradar substàncies que per altres dels seus pobladors resultaven tòxiques. Un cop identificat aquest fenomen ens hem proposat millorar-lo per poder adaptar-lo a les condicions mediambientals que requeríem. Així, hem après com solucionar un problema desviant la vista cap a la naturalesa.

No oblidem, però, que la bioremediació no deixa de ser una solució a un problema previ que hem creat nosaltres i que necessita una *remediació*. L'ús de processos biològics que, a més, ja ocorren de manera natural per eliminar els contaminants del medi és un mètode molt correcte i respectuós. Ara bé, cal ser conscients que la necessitat de la seva utilització es deu a esdeveniments de contaminació.

El futur, a llarg termini, no ha de mirar cap al desenvolupament de la bioremediació, sinó cap a l'evitació d'aquests fenòmens de contaminació tan presents avui, segurament fent honor al tan après -però no aplicat- proverbi:

“Més val prevenir que curar”.

6 BIBLIOGRAFIA

Libres i articles:

Bento, Fatima M; Camargo, Flávio A.O; Okeke, Benedict C; Frankenberger, William T. “Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation”. *Bioresource Technology*, Volume 96, Issue 9, (Juny 2005), p. 1049-1055.

Bhattacharyya, Bimal C; Banerjee, Rintu. *Environmental Biotechnology*. New Delhi, India: Oxford University Press, 2007.

Brock, Thomas D; Smith, David W; Madigan, Michael T. *Microbiología*. Mèxic, D.F.: Prentice-Hall, 1987. (4a edició)

Díaz, Eduardo et ál. *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, 2008.

Frenzel, Max; Scarlett, Alan; Rowland, Steven J; Galloway, Tamara S; Burton, Sara K; Lappin-Scott, Hilary M; Booth, Andy M. “Complications with remediation strategies involving the biodegradation and detoxification of recalcitrant contaminant aromatic hydrocarbons”. *Science of The Total Environment*, Volume 408, Issue 19, (Setembre 2010), p. 4093-4101.

Ingraham, John L; Ingraham, Catherine A; *Introducción a la microbiología*. Barcelona: Reverté S.A., 1998 (volum 1)

Kingston, Paul F; *Long-term environmental impact of oil spills*. Spill Science & Technology Bulletin, 2002. (Volume 7)

Laws, E.A; *Aquatic Pollution: An Introductory Text*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Madigan, M.T; Martinko, J.M; Parker, J; *Biología de los microorganismos*. Madrid: Prentice Hall Iberia, 1998. (8a i 10a edició)

Mendez-Vilas, Antonio et ál. *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Singapur: World Scientific Publishing Co., 2009.

Pelczar Jr., Michael J; Reid, Roger D; Chan, E.C.S; *Microbiology*. Mexico: McGraw-Hill, 1998. (4a edició)

Scragg, Alan. *Environmental Biotechnology*. New York: Oxford University Press, 2005. (2a edició)

Tortora, Gerard J; Funke, Berdell R; Case, Christine L; *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires: Médica Panamericana S.A., 2007. (9a edició)

Van Loon, Gary W; Duffy, Stephen J; *environmental chemistry*. Nova York: Oxford University Press, 2005. (2a edició)

Wiley, Joanne M; Sherwood, Linda M; Woolverton, Christopher J; *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. Corea: McGRAW-HILL, 2009. (7a edició)

Recursos electrònics⁹:

Todar, Kenneth; *Diversity of Metabolism in Prokaryotes*.
<<http://www.textbookofbacteriology.net/metabolism.html>>.

BioWorld Company; *Deepwater Horizon Oil Spill Cleanup*.
<<http://www.bioworldusa.com/deepwater-horizon-oil-spill-cleanup>>.

Vidaly, Maurizio; *Bioremediation. An overview*.
<<http://www.iupac.org/publications/pac/pdf/2001/pdf/7307x1163.pdf>>.

Solanas Cànovas, Anna Maria; *La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos*.
<<http://congress.cimne.com/zns09/admin/files/filepaper/p422.pdf>>.

Widdel, Friedrich; Rabus, Ralf; *Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons*.
<<http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/RBurgos/dades/Articulos/Anaerobicdegradation.pdf>>.

Janssen, Dick B.; Oppentocht, Jantien E.; Poelarends, Gerrit J.; *Microbial dehalogenation*.
<<http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/RBurgos/dades/Articulos/Dehalogenation.pdf>>.

Mestres, E.; Ribó, J.; Roqueta, K.; Solé, N.; Vicente, S.; Vila, M.; *La biorremediación tras una catástrofe ecológica*. <<http://microupf2.blogspot.com/2010/05/la-biorremediacion-tras-una-catastrofe.html>>.

Vidal Gavilan, Georgina; Orejudo Ramírez, Emilio; *Guia de bioremediació d'aigües subterrànies contaminades per hidrocarburs derivats del petroli*. <https://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/aigua_medi/aigues_subterrànies/descontaminacio_aquifers/guia_bioremediacio.pdf>.

Library4science.com; *GC/FID*. <<http://www.chromatography-online.org/directory/methdcat-2/page.html>>.

Solanas Cànovas, Anna Maria; Riera Reverter, Marta; Vidal Gavilan, Georgina; *Guia de bioremediació per a sols contaminats per hidrocarburs del petroli*. <http://www20.gencat.cat/docs/arc/Home/LAgerencia/Publicacions/Sols%20Contaminats/guia_bioremediacio.pdf>.

De la Fuente S., Norma; Rodríguez G., Josefina; Linaje T., Socorro; Rodríguez S., Lucio; *Aislamiento y caracterización de bacterias autóctonas degradadoras de hidrocarburos*.

⁹ Atesa la consulta reiterativa de les fonts aquí citades s'exclouen les dates concretes de consulta d'aquestes.

<http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_VI/CVI-23.pdf>.

Srinivasa, Srikanth; *Can India's bioremediation process contain BP oil spill?* <<http://uk.ibtimes.com/articles/36592/20100719/india-s-bioremediation-process-teri-s-oilzapper.htm>> [Consulta:].

Bagh, Carl; *Key techniques employed to curtail oil spill.* <<http://uk.ibtimes.com/articles/24641/20100524/oil.htm>>.

Guadalupe Lomelí, María; Tomayo O., Ramón; *Algunas alternativas: Prevención de la contaminación.* <http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/32agua.html>.

Miliarium Aureum, S.L.; *Técnicas de limpieza.* <<http://www.miliarium.com/monografias/mareasnegras/Tecnicas/Tecnicas.asp>>.

Centro Tecnológico del Mar; *Evolución y comportamiento de las manchas de petróleo.* <<http://www.cetmar.org/documentacion/comportamiento.htm>>.

Cornell University and Penn State University; *Bioremediation.* <<http://ei.cornell.edu/biodeg/bioremed/>>.

Citizendium; *Petroleum crude oil.* <http://en.citizendium.org/wiki/Petroleum_crude_oil>.

United States Environmental Protection Agency (EPA); *METHOD 3630C SILICA GEL CLEANUP.* <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3630c.pdf>>.

Mokhatab, Saeid; Giangiacomo, Leo A; *Microbial enhanced oil recovery techniques improve production: bacteria may be valuable in offering cost-effective and environmentally benign EOR.* <<http://www.worldoil.com/October-2006-Microbial-enhanced-oil-recovery-techniques-improve-production.html>>.

Widdel, Friedrich; Rabus, Ralf; *Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons.* <<http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/RBurgos/dades/Articulos/Anararobicdegradation.pdf>>.

Federación Europea de Biotecnología, Grupo de Trabajo sobre las Percepciones Públicas de la Biotecnología; *Biotecnología mediambiental.* <http://files.efbpublic.org/downloads/Environmental_biotechnology_Spanish.pdf>.

Craig Venter, J.; Gibson, Daniel G.; *Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome.* <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/329/5987/52#R1>>.

Departament d'Innovació, Universitats i Empresa (Generalitat de Catalunya); *El científic nord-americà Craig Venter crea el primer bacteri sintètic.* <<http://www.gencat.cat/diue/noticies/16176763.html>>.

Pennisi, Elizabeth; *Synthetic Genome Brings New Life to Bacterium.*
<<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/328/5981/958>>.

Cook, Michael; *El bacteri sintètic*
<http://www.temesdavui.org/ca/online/actualitat/el_bacteri_sintetic>.

Craig Venter, J.; Gibson, Daniel; *How We Created the First Synthetic Cell*
<<http://online.wsj.com/article/SB10001424052748704026204575266460432676840.html?KEYWORDS=J+CRAIG+VENTER+AND+DANIEL+GIBSON>>.

The Lancet; *Synthetic cell created in a laboratory.*
<<http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673610609075/fulltext?rss=yes#>>.

Samuel, Gabrielle; *The perils of creating synthetic life.*
<http://www.bionews.org.uk/page_61626.asp>.

Fatimathas, Lux; *First synthetic cell created in a laboratory.*
<http://www.bionews.org.uk/page_61470.asp>.

National Health Service (NHS); *Synthetic cell created in lab*
<<http://www.nhs.uk/news/2010/05May/Pages/Synthetic-cell-created-in-lab.aspx>>.

Macrae, Fiona; *Scientist accused of playing God after creating artificial life by making designer microbe from scratch - but could it wipe out humanity?*
<<http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-1279988/Artificial-life-created-Craig-Venter--wipe-humanity.html>>.

Henderson, Mark; *Scientists create artificial life in laboratory.*
<http://www.timesonline.co.uk/tol/news/science/biology_evolution/article7132299.ece>

J. Craig Venter Institute; *Synthetic Genomics Research and the First Self-Replicating Synthetic Bacterial Cell Constructed by Scientists at the J. Craig Venter Institute*
<<http://www.jcvi.org/cms/fileadmin/site/research/projects/first-self-replicating-bact-cell/faq.pdf>>.

The Royal Academy of Engineering; *Synthetic Biology: scope, applications and implications.*
<http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Synthetic_biology.pdf>.

Biorremediación: una estrategia para eliminar contaminantes respetuosa con el medio ambiente
<<http://cnho.wordpress.com/2009/12/30/biorremediacion-una-estrategia-para-eliminar-contaminantes-respetuosa-con-el-medio-ambiente/>>.

Degradación de hidrocarburos. <http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/RBurgos/dades/degradaci%C3%B3n_de_hidrocarburos.htm>.

Dreyfus Cortés, Georges; *El mundo de los microbios*.
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/html/el_mundo.html>.

Contaminated Site Clean Up Information; *About Remediation Technologies*.
<<http://www.cluin.org/remediation/>>.

United States Environmental Protection Agency (EPA);
<http://nlquery.epa.gov/epasearch/epasearch?querytext=Bioremediation&fld=&areaname=&typeofsearch=epa&areacontacts=http%3A%2F%2Fwww.epa.gov%2Fepahome%2Fcomments.htm&areasearchurl=&result_template=epafiles_default.xsl&filter=sample4filt.hts>.

Biello, David; *Slick Solution: How Microbes Will Clean Up the Deep water Horizon Oil Spill*. <<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=how-microbes-clean-up-oil-spills>>.

Biello, David; *Meet the Microbes Eating the Gulf Oil Spill [Slide Show]*.
<<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=gulf-oil-eating-microbes-slide-show>>.

Biell, David; *Biological Breakdown*.
<<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=biological-breakdown>>.

Mascarelli, Amanda; *Tapping the crowd for technologies*.
<<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=tapping-the-crowd-bp-cleanup-oil>>.

7 AGRAÏMENTS

Personalment i sincera, havent compartit preocupacions, il·lusions i, és clar, alegries, no dubto d'anotar alguns noms corresponents a unes persones amb qui, de ben segur, hem també compartit l'esperança que les línies que ara queden endarrere poguessin tenir els màxims sentit, significat i coherència possibles.

Aquestes persones a qui m'agradaria agrair notòriament el seu ajut, a pesar que estic segur que ja són conscients que tot plegat també és fruit del seu esforç i la seva paciència, són la Marisol Cabral, professora de l'IES Jaume Callís de Vic, en Marc Viñas, investigador coordinador del Centre Tecnològic de Gestió Integral de Residus Orgànics (GIRO), en Josep Turet, Director del SART Medi Ambient i professor de la UVIC, i, de manera molt especial i notable, la Consol Blanch, professora de la UVIC, només gràcies a qui he après el vertader significat del treball al laboratori.

M'agradaria citar aquí molts altres noms que han possibilitat l'elaboració del que ja no puc considerar solament un treball; són aquests anònims qui han creat el context en el que he pogut ultimar la preparació d'aquestes últimes línies que ara redacto i que no fan sinó recordar-me un nou *modus vivendi* que abans desconeixia: el de la investigació científica.

8 ANNEXOS**ÍNDIX**

1 Metabolisme	ii
1.1 Necessitats nutricionals: trofisme	ii
1.2 Necessitats de gasos	iv
2 Comparació dels processos de biodegradació aeròbic i anaeròbic	v
3 Bioremediació de xenobiòtics	ix
4 Tecnologies de bioremediació	xi
4.1 Tecnologies <i>in situ</i>	xi
4.2 Tecnologies <i>ex situ</i>	xi
4.3 Tecnologies inèdites	xii
5 Contaminació marina	xiv
6 Aplicació de la biotecnologia en la indústria del petroli (MEOR)	xx
7 Seguiment del procés de remediació en un cas real de contaminació	xxiii
8 Cèl·lula sintètica	xxvi
9 Protocol de dilució per a la cromatografia	xxxii
10 Surfactants	xxxviii
11 Glossari	xxxix

ANNEX 1: METABOLISME

Des del punt de vista de llur metabolisme la diversitat de microorganismes és molt gran. En una primera part d'aquest annex els microbis són classificats depenent dels mètodes emprats per assimilar del medi els materials i l'energia necessaris per a les activitats vitals. En un segon apartat se'ns comparen els microorganismes segons llur resposta a l'oxigen lliure.

1.1 NECESSITATS NUTRIONALS: TROFISME

Totes les formes de vida tenen en comú determinades necessitats nutricionals en termes de necessitats químiques per portar a terme el creixement i les funcions normals. Les següents observacions ho confirmen i exemplifiquen la gran diversitat nutricional entre els bacteris.

Tipus tròfics bacterians

El trofisme fa referència als procediments emprats pels organismes –per tant, les cèl·lules, com a unitats fisiològiques- per assimilar del medi els materials i l'energia necessaris per a les activitats vitals.

Dins dels organismes existeix una abundant diversitat de tipus fisiològics segons el seu trofisme. Per tant, parlarem de diferents tipus tròfics d'organismes. En el món bacterià són presents, des d'un punt de vista fisiològic, tots els tipus tròfics que existeixen en la biosfera. Els tipus tròfics d'un organisme es divideixen segons: (1) la font d'energia emprada per al desenvolupament, (2) la font d'àtoms de carboni que utilitza per fabricar els metabòlits precursors i (3) la font d'electrons.

- 1- En primer lloc, en quant a la font d'energia utilitzada, el tipus tròfic al qual pertany un organisme¹⁰ es pot dividir en fotòtrof o quimiòtrof:
 - Els organismes **fotòtrofs** utilitzen la llum com a font d'energia principal i transformen l'energia lumínica captada en energia química útil per a l'organisme.
 - Els **quimiòtrofs** utilitzen l'energia dels enllaços químics que obtenen de reaccions d'oxidació i reducció de compostos inorgànics o orgànics.

¹⁰ Els termes utilitzats per definir els organismes fan servir la terminació *trof* que deriva del grec i significa “alimentar-se”.

2- D'altra banda, es distingeixen dos tipus tròfics segons la font de carboni utilitzada:

- Els organismes **autòtrofs**¹¹ utilitzen el diòxid de carboni o altres formes inorgàniques del carboni com a font principal de carboni.
- Els **heteròtrofs**¹² requereixen una font de carboni orgànica.

Els autòtrofs tenen una gran importància en el funcionament de la biosfera ja que són capaços de portar a terme síntesi de matèria orgànica a partir de matèria inorgànica (no viva); aquest procés s'anomena *producció primària*. D'altra banda, els heteròtrofs usen compostos orgànics presintetitzats pels autòtrofs com a font de carboni, així que es pot afirmar que la vida a la biosfera depèn de les activitats dels productors primaris autòtrofs.

3- Els microorganismes també disposen solament de dues fonts d'electrons o de poder reductor. La matèria orgànica constituent dels éssers vius és altament reduïda, raó per la qual la seva fabricació requereix l'adquisició de poder reductor del medi,

- Els **litòtrofs** (literalment, "menjadors de pedres") usen substàncies inorgàniques reduïdes com a font d'electrons,
- mentre que els **organòtrofs** extreuen electrons de compostos orgànics reduïts.

Per a simplificar l'estudi dels microorganismes degradadors d'hidrocarburs i la classificació d'aquests segons la seva classe nutricional, prescindirem de la diferenciació segons la font d'obtenció d'electrons. Així, distingim microorganismes:

- Fotoautòtrofs, que utilitzen la llum com a font d'energia i el CO₂ com a font principal de carboni.
- Fotoheteròtrofs, que utilitzen la llum com a font d'energia i obtenen el carboni de compostos orgànics.
- Químioautòtrofs, que utilitzen compostos inorgànics com a font d'energia i CO₂ com a font principal de carboni.
- Químioheteròtrofs, que, generalment, obtenen l'energia i el carboni del mateix compost orgànic. Al seu torn, els organismes químioheteròtrofs es subdivideixen segons la font

¹¹ La paraula en si significa que "s'autoalimenten".

¹² Fa referència a que "s'alimenten d'altres fonts".

de molècules orgàniques. Els **sapròfits** es nodreixen de matèria orgànica morta mentre que els **paràsits** es nodreixen d'un hoste viu. Els organismes quimioheteròtrofs comprenen la majoria dels bacteris i tots els fongs, protozous i animals.

Els bacteris i els fongs poden utilitzar una gran diversitat de compostos orgànics com a fonts de carboni i energia. Aquesta capacitat els permet viure en medis molt diferents. Per aquest motiu, bacteris i fongs són els principals agents en la biodegradació de contaminants orgànics.

1.2 NECESSITATS DE GASOS

Els gasos principals que afecten el desenvolupament microbià són l'oxigen i el diòxid de carboni. Els microorganismes presenten una resposta àmplia i variable a l'oxigen lliure. Partint d'aquesta observació distingim tres grups de microorganismes:

- 1- **Aeròbics estrictes**, microbis que es desenvolupen en presència d'oxigen lliure. Distingim, també, uns microorganismes que, essent aeròbics estrictes, creixen en presència de quantitats molt petites d'oxigen, anomenats microaeròfils.
- 2- **Anaeròbics estrictes**, microbis que es desenvolupen en absència d'oxigen lliure; l'oxigen pot resultar-los-hi tòxic o no. En cas negatiu, és a dir, que no requereixen oxigen per al seu catabolisme però que poden resistir la seva presència, els microorganismes reben el nom de aerotolerants.
- 3- **Anaeròbics facultatius**, microbis que es desenvolupen tant en presència d'oxigen com en absència d'aquest. Faculten entre respirar aeròbicament o anaeròbica, segons les condicions del medi.

Es coneixen bacteris i fongs que utilitzen hidrocarburs en presència d'oxigen des de principis del segle XX. El fet que l'oxigen no estigui present en tots els medis on hi ha dipositats hidrocarburs (p.e., en sediments profunds i reserves de petroli) ha evocat la pregunta sobre si la biodegradació d'hidrocarburs és possible en absència d'oxigen i, en cas afirmatiu, fins a quin grau. No va ser fins a finals dels anys vuitanta que es van identificar microorganismes capaços de degradar hidrocarburs sota estrictes condicions anòxiques. Des de llavors, diferents estudis han demostrat que aquests microorganismes activen hidrocarburs mitjançant mecanismes bioquímics que difereixen completament respecte d'aquells emprats en el metabolisme aeròbic d'hidrocarburs.

L'annex que segueix estudia i compara els processos de degradació aeròbic i anaeròbic.

ANNEX 2: COMPARACIÓ DELS PROCESSOS DE BIODEGRADACIÓ AERÒBIC I ANAERÒBIC

En el present annex es comparen els processos de biodegradació segons les necessitats de gasos dels microorganismes, especialment oxigen gasós, i la resposta a aquests. També es comenten les diferències entre els tractaments de residus aeròbic i anaeròbic.

Font d'oxigen

La diferència fonamental entre els mètodes aeròbic i anaeròbic és que, tal com s'ha comentat en l'annex anterior, en el cas del primer, els microorganismes utilitzen l'oxigen gasós com a acceptor final d'electrons de llurs cadenes respiratòries; en el segon procés, els microbis fan ús d'altres substàncies, tant orgàniques com inorgàniques.

Malgrat el dany que pot causar l'oxigen gasós als microorganismes anaeròbics, aquests continuen necessitant oxigen com a font de poder reductor. L'oxigen utilitzat en la biodegradació anaeròbica ja es troba present en el menjar –com, en el cas que ens ocupa, residus orgànics-.

Microorganismes

L'activitat metabòlica dels microorganismes aeròbics i anaeròbics difereix, de manera que els productes finals resultants de la degradació de compostos orgànics produïts per aquestes dues classes de microorganisme no són els mateixos. Els productes finals de la degradació aeròbica són CO_2 , H_2O i HNO_3 , a més d'alguns residus de caràcter no biodegradable (massa cel·lular). En contraposició, la digestió anaeròbica produeix gas metà (CH_4), CO_2 i humus residual. Atès que el CH_4 és un combustible no contaminant, el tractament anaeròbic de residus resulta més interessant des d'un punt de vista d'obtenció d'energia, ja que proporciona gas metà amb el qual es pot obtenir energia a partir de la seva combustió. Ara bé, el CH_4 esdevé contaminant si conté H_2S . Per a aplicacions a gran escala, la combustió de metà contenidor de H_2S provoca la corrosió del sistema. Desafortunadament, el cost relacionat amb la separació de CH_4 i H_2S és tan elevat que el procés anaeròbic de purificació no resulta rentable econòmicament.

La proporció de microorganismes utilitzats com a font d'aliment

Un cop comença a existir una carència de matèria orgànica –quan el procés de digestió s'aproxima a la compleció- els microbis moren i són utilitzats com a aliment per altres microorganismes. Aquest fenomen, anomenat *respiració endògena*, condueix al final del procés de reproducció dels microorganismes atès que, en última instància, són convertits en els productes finals. Pel correcte funcionament del procés de biodegradació, però, la proporció de microorganismes emprats com a font d'aliment per altres microbis hauria de ser el més reduïda possible al llarg de tot el procés de bioremediació, i no només al final. S'ha de tenir en compte que durant el tractament ja es produeix, encara que d'una manera escassa, la respiració endògena. La respiració endògena constitueix un paràmetre diferenciador dels sistemes aeròbic i anaeròbic molt important, ja que pot tornar el procés de bioremediació inútil.

Balanç de carboni

Sota condicions aeròbiques, entorn del 50% del carboni orgànic es transforma en biomassa¹³ o massa cel·lular, mentre que la resta ho fa en diòxid de carboni. En condicions anaeròbiques, gairebé el 95% del carboni orgànic es descompon en biogàs i només un 5% ho fa en biomassa. La bioremediació en condicions aeròbiques es beneficia de la proliferació de nous microorganismes a causa de l'activitat metabòlica dels microbis aeròbics; així, degut a l'alta concentració de massa cel·lular, la degradació de contaminants en condicions aeròbiques es produeix més ràpidament que en absència d'oxigen gasós. D'altra banda, cal destacar la gran quantitat de biogàs que es produeix en el procés anaeròbic.

Balanç d'energia

Quan els residus són tractats aeròbicament un 60% de l'energia obtinguda dels substrats (contenidors de les substàncies orgàniques utilitzables) s'emmagatzema en la gran quantitat de cèl·lules formades i fins a un 40% d'aquesta es perd en forma de calor. D'altra banda, sota condicions anaeròbiques gairebé el 90% de l'energia present en els residus orgànics degradables pot ser recuperat en forma de gas metà, després que un 5-7% és de menester pel creixement de nova massa cel·lular (noves cèl·lules) i un 3-5%

¹³ Entenem per *transformar en biomassa* la generació de nous microorganismes, l'acció dels quals sumada a la dels ja existents incrementa el grau de biodegradació i, en conseqüència, de bioremediació.

es perd en forma de calor. En aquest aspecte el procés anaeròbic de tractament de residus parteix amb un clar avantatge respecte del sistema aeròbic.

Reducció de DBO/DQO

Un dels principals objectius de facilitar la biodegradació és l'estabilització de residus orgànics. La demanda química d'oxigen (DQO) és un paràmetre que mesura la quantitat de substàncies, dissoltes o en suspensió en una mostra líquida, susceptibles a l'oxidació de mitjans químics. La demanda biològica d'oxigen (DBO) és un paràmetre que mesura la quantitat de matèria, continguda en una mostra líquida, dissolta o en suspensió, que pot ser consumida o oxidada per mitjans biològics. Per exemple, un valor elevat de DBO en un residu indica que aquest conté una gran quantitat de substàncies orgàniques biodegradables i que l'aigua receptora del residu estarà altament contaminada. El pretractament d'un residu d'aquestes característiques ha de tractar amb la reducció del nivell de DBO. El valor DBO també ajuda a decidir quin procés de tractament – l'aeròbic o l'anaeròbic- serà més econòmic i eficaç.

Els tractaments biològics de residus, siguin aeròbics o anaeròbics, redueixen el DBO/DQO dels mateixos residus, conduint a l'estabilització dels residus biodegradables. En el procés aeròbic, però, la presència d'O₂ atmosfèric és imprescindible i això provoca que es consumeixi una gran quantitat d'energia per a la compressió de la suma d'aire a menester. El volum d'aire subministrat depèn de diversos factors que fan necessaris volums molt elevats d'O₂. Per aquest motiu, el procés aeròbic només es recomana pel tractament de residus amb nivells baixos de DBO. Per la reducció anaeròbica de DBO no es requereix O₂ atmosfèric i el cost resulta comparativament menor. Per aquesta raó, pel tractament de residus amb alts valors de DBO, es recomana un procés anaeròbic.

Processos de tractament

Aeròbic: els microorganismes utilitzen materials orgànics biodegradables per llurs creixement i metabolisme. Això resulta en la generació de grans quantitats de massa cel·lular (noves cèl·lules, microorganismes) i CO₂ gas, principalment degut a la respiració. Aquest procés es produeix de manera més ràpida i, per tant, el volum del reactor és menor. Es tracta d'un procés consumidor d'energia; no productor.

Anaeròbic: pot ésser utilitzat tant pel tractament de residus líquids com sòlids, mentre que el procés aeròbic és més adequat pel tractament de residus líquids. No és un procés

consumidor d'energia, sinó que genera grans quantitats d'energia gasosa en forma de metà. Atès que es genera una quantitat molt reduïda de sediments actius (noves cèl·lules amb capacitat de degradar), aquest procés resulta més lent.

Factors mediambientals

Per a qualsevol procés biològic els microorganismes només poden actuar si les condicions mediambientals els hi són favorables. Alguns factors a ser considerats són l'alcalinitat, el pH, l'acidesa, la concentració de ions metàl·lics tòxics o la temperatura. Per aconseguir una operació eficient del sistema biològic, cal considerar les condicions ambientals del sistema i adaptar-les a la població de microorganismes, segons siguin aeròbics o anaeròbics.

Comentari final

Des d'un punt de vista d'obtenció d'energia, la biodegradació de compostos orgànics en absència d'oxigen gasós resulta molt més interessant, atès que es genera una quantitat important de biogàs utilitzable com a font d'energia. No obstant això, degut a la dificultat d'emmagatzemar el biogàs i de proporcionar unes condicions anòxiques completes a la població degradadora de microorganismes, hem dissenyat i dut a terme un model experimental basat en condicions aeròbiques. S'ha de tenir present, també, que a nosaltres ens interessava el fet de degradar el contaminant, en lloc de l'obtenció d'energia a partir d'aquest. Així, un procés aeròbic que genera nova massa cel·lular completa la degradació de la matèria orgànica més ràpidament que un procés anaeròbic.

ANNEX 3: BIOREMEDIACIÓ DE XENOBIÒTICS

El terme *xenobiòtic* literalment significa *estrany al món biològic* (xeno- és la forma prefixada del mot grec *xénos*, ‘estrany’). Des del punt de vista de la biotecnologia mediambiental fa referència a aquelles substàncies que no es troben presents al medi de forma natural, sinó que hi han estat introduïdes degut a activitats antropogèniques. Normalment els organismes no estan exposats a aquests compostos orgànics sintètics i, com a resultat, els seus mecanismes biològics, en general, no tenen vies metabòliques per a metabolitzar-los. Conseqüentment, molts d’aquests productes químics no són degradats fàcilment per la microflora i fauna autòctones. En alguns casos, es requereix un període d’adaptació en el medi contaminat abans d’esdevenir-se la degradació.

Depenent de la facilitat de degradació, els compostos químics es poden classificar en biodegradables i no-biodegradables o recalcitrants.

Un *producte químic biodegradable* pot ser convertit en un compost no tòxic en pocs mesos mitjançant l’acció microbiana i, per tant, pot no ser considerat molt perillós.

Un *producte químic* recalcitrant pot romandre en el medi durant diversos anys en la forma tòxica. Aquestes substàncies químiques són introduïdes al medi normalment per activitats humanes, encara que alguns processos com l’erosió, filtració de petroli i erupcions volcàniques poden contribuir a llur aparició. *Molts d’aquests compostos recalcitrants persisteixen a la natura durant molts anys i provoquen l’eliminació de diversos elements dels cicles biogeoquímics*¹⁴.

Els compostos xenobiòtics normalment tenen propietats químiques o físiques inusuals que els fan resistents a la biodegradació. Per exemple, l’àcid 2,4-diclorofenoxiacètic pot ser biodegradat en dies, mentre que l’àcid 2,4,5-triclorofenoxiacètic, que només difereix del primer en la presència d’un clor substituent addicional, és no-degradable i perdura durant mesos al medi. El substituent addicional interfereix en l’escissió de l’anell aromàtic.

Molts compostos xenobiòtics són molt tòxics a la natura. Aquesta toxicitat es veu incrementada per la *bioconcentració* en els organismes i la *biomagnificació* al llarg de la cadena alimentària que, finalment, afecta els éssers humans. La concentració de xenobiòtics al medi, en dissolució, pot variar de ppm (parts per milió) a ppb (parts per

¹⁴ Es denomina cicle biogeoquímic el moviment dels elements químics o molècules a través dels components biòtics (biosfera) i abiòtics (litosfera, atmosfera i hidrosfera) d’un ecosistema. P. ex. Cicle de l’aigua, cicle del carboni, etc.

bilió), i fins a nivells més baixos que poden no ser perjudicials. No obstant això, el compost pot, de forma progressiva, esdevenir més concentrat en certs animals al no ser rebutjat (*bioconcentració*) i afectar la cadena tròfica en la qual està involucrat (*biomagnificació*). Aquest fenomen va ser observat per primera vegada en un llac de Califòrnia que havia estat tractat amb pesticida DDD per eliminar uns insectes. Més tard, els peixos que havien menjat fitoplàncton, contenidors de DDD, a més a més dels ocells que havien menjat peixos, començaren a morir.

És de menester recordar que per aconseguir una major efectivitat en el procés de bioremediació, el contaminant ha de ser susceptible a la transformació metabòlica dels microorganismes, els productes finals han de ser segurs o menys perillosos que els inicials, les condicions ambientals han de ser favorables per a l'activitat microbiana i el procés hauria de ser rentable ecològicament i econòmic. Aconseguir la concordança de tots aquests factors variables és una tasca difícil; a més, les condicions mediambientals sovint no són propícies al creixement microbià. Després de l'optimització dels diversos paràmetres mediambientals i amb l'ajuda d'algunes modificacions en el procés de bioremediació, però, els microbis degradadors poden desenvolupar-se de manera òptima i, així, dur a terme la biodegradació del contaminant en qüestió.

ANNEX 4: TECNOLOGIES DE BIOREMEDIACIÓ

Els mètodes utilitzats de bioremediació dependran de l'àrea contaminada, les propietats del/s compost/os, la concentració dels contaminants i el temps requerit per completar la bioremediació. Hi ha diferents tècniques de bioremediació que, fonamentalment, es poden dividir segons *in situ* i *ex situ*.

4.1 TECNOLOGIES *IN SITU*

Les tecnologies de bioremediació *in situ* eviten l'excavació del medi contaminat, de manera que els tractaments són aplicats al propi sòl. Les tecnologies *in situ* depenen, en gran mesura, de les característiques del medi. Aquestes propietats influeixen en l'activitat microbiana i, en conseqüència, en la degradació dels contaminants. Els següents mètodes poden ser emprats *in situ*:

- Bioventing

Combina el subministrament reforçat d'oxigen amb l'extracció de vapor. Diversos conductes perforats al voltant del subsòl contaminat subministren aire a la zona afectada, mentre un pou extreu els compostos orgànics volàtils del contaminant per mitjà d'una bomba de buit. L'augment d'aire incrementarà la degradació natural realitzada per microorganismes aeròbics. Es tracta d'una tècnica només efectiva per a l'extracció de compostos volàtils (gasos) en sòls permeables.

- Biosparging

Incrementa l'activitat biològica del sòl mitjançant el subministrament d'oxigen. En aquest cas, però, l'oxigen és administrat directament a l'àrea de sòl contaminada. L'elevat cost n'ha limitat l'aplicació.

- Bioaugmentació/estimulació

Consisteix en el subministrament de nutrients a la zona contaminada per tal d'estimular el creixement de la població autòctona microbiana (bioestimulació). Aquesta tècnica pot ser combinada amb la introducció de microorganismes específics.

4.2 TECNOLOGIES *EX SITU*

Les tecnologies *ex situ* s'apliquen de forma posterior a l'excavació del material contaminat per al tractament de descontaminació que subsegueix l'extracció del sòl. Un cop s'obté el material en superfície, aquest pot ser tractat al mateix emplaçament on ha

tingut lloc l'extracció o pot ser traslladat. Tot seguit es descriuen les principals alternatives de bioremediació *ex situ* del sòl:

- Bombeig i tractament

Mètode utilitzable en cas que el contaminant sigui soluble en aigua. S'introdueix aigua en les àrees contaminades i s'extreu la mescla per a ser tractada.

- Land farming

Implica el removiment del sòl per mitjà d'arades o altres sistemes mecànics de llaura. La llaurada incrementa els nivells d'oxigen en el sòl i distribueix els contaminants uniformement. Això comporta un augment del grau de degradació. És un mètode adequat per tractar contaminants poc profunds respecte de la superfície del sòl. Resulta eficaç per a la degradació d'hidrocarburs.

- Compostatge

És un procés de biodegradació aeròbica d'un contaminant sòlid. Ha d'existir una sistema continu de subministrament d'oxigen i un alt contingut d'humitat. La mescla de material compostable, com estelles, palla o cendra, amb el sòl contaminat pretén un funcionament similar al del sistema de compostatge habitual. A causa de l'activitat microbiana s'assoleixen temperatures de 60-70°C, període de major degradació.

- Biopiles

En el procés de tractament per biopiles el sòl es diposita, formant piles, en un tanc impermeable que impedeix la filtració de substàncies. Un sistema d'irrigació proveeix la superfície de les piles amb nutrients. Els lixiviats formats es recullen amb canons situats a la base del dipòsit i poden ser reciclats.

- Bioreactor

El sòl contaminat també pot ser tractat, com a residu sòlid o líquid lixiviat, en bioreactors. L'ús de bioreactors permet controlar paràmetres com la temperatura, el pH i el subministrament d'oxigen, de manera que augmenten els percentatges de degradació a partir de l'optimització de les condicions a les quals són sotmesos els microorganismes degradadors. També és possible el tractament d'aigües subterrànies contaminades, que són ascendides a un bioreactor situat a la superfície, on són tractades.

4.3 TECNOLOGIES INÈDITES

Existeixen altres tecnologies de bioremediació, encara en fase d'estudi i desenvolupament, que, de la mateixa manera que totes les tecnologies més o menys

consolidades i exposades amb anterioritat, comparteixen el fi de restablir l'estat primigeni del medi.

Hem cregut oportú i interessant destacar breument les dues següents tecnologies.

Respectivament, es distingeixen per:

- 1- Aprofitar l'especificitat de la reacció antigen/anticòs per remoure determinats contaminants d'aigües residuals.
- 2- Emprar nanopartícules, no tòxiques, de ferro, que transformen una gran varietat de contaminants mediambientals. La seva mida diminuta, deu vegades menor a la d'un bacteri, els confereix la propietat de, al ser injectades sota pressió, poder penetrar els espais entre les partícules del sòl i arribar al contaminant.

ANNEX 5: CONTAMINACIÓ MARINA

El cru de petroli i els productes refinats d'aquest són alliberats al medi procedents de fonts molt diverses. Així, contaminen sòl i aigua. El cru de petroli, a més, també pot filtrar-se a través d'estrats permeables i ascendir des de les reserves naturals que el contenen a la superfície. El cru que arribi a la superfície terrestre perdrà els seus components volàtils i formarà llacs i arenes de quitrà, mentre que el petroli que arribi a la superfície marítima formarà mareas negres a partir de les quals els components volàtils també seran alliberats a l'atmosfera.

Les reserves de petroli en terra estan pràcticament exhaurides degut a la intensa explotació, però encara es perforen molts pous de petroli al mar, causants, algunes vegades, d'espectaculars vessaments de petroli. Encara que aquests vessaments capten una atenció popular considerable, poc després de l'efusió la quantitat sobreixida és aproximadament la mateixa que es filtra per fuites d'origen natural. Aquesta quantitat relativament poc important d'hidrocarbur vessada es deu a l'evaporació dels components més volàtils i a la ràpida intervenció de microorganismes aeròbics degradadors. S'estima que la quantitat total de petroli present als oceans és entre $1,7 \times 10^6$ i $8,8 \times 10^6$ tones.

El següent gràfic mostra les quantitats de petroli alliberat als oceans, segons les seves fonts d'emissió:

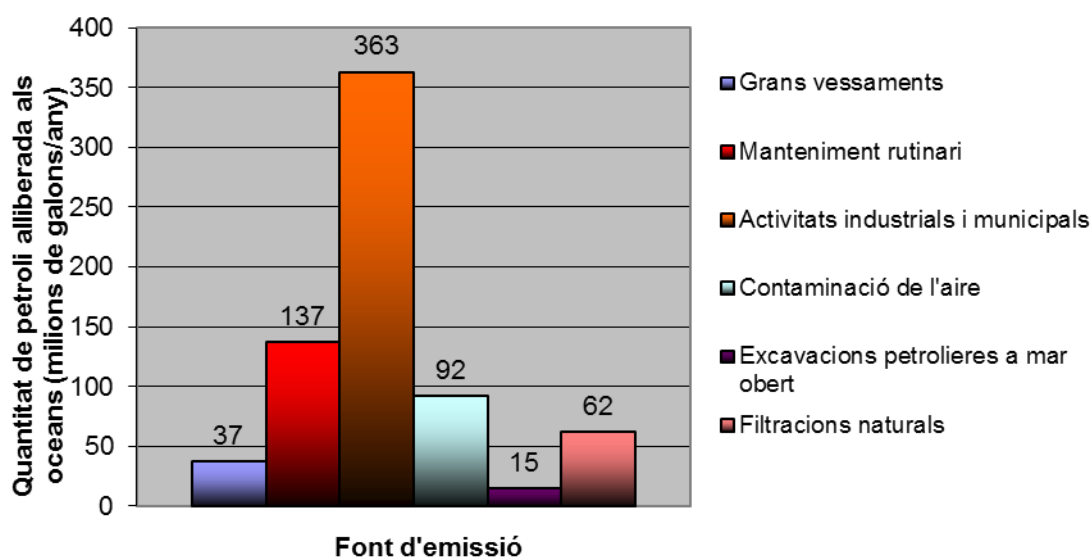


Figura 1 Les fonts d'emissió del petroli alliberat als oceans (1995).

Font: <http://seawifs.gsfc.nasa.gov/>

En el gràfic s'observa com els grans vessaments accidentals provocats per transport de cru i per excavacions petrolieres són l'origen d'una part molt petita del petroli total alliberat, per comparació al reemplaçament d'oli de motor i a altres fonts que, des del continent, aboquen els residus als oceans a través de vies fluvials.

Normalment, les filtracions naturals tenen lloc en àrees volcànicament actives, com el Golf d'Aràbia o el de Mèxic. Les filtracions naturals són la causa de l'alliberament d'un 8% del petroli que eflueix anualment. La resta de fonts causants de la presència de petroli al mar estan basades en activitats industrials. S'estima que aquestes fonts causen l'alliberament del 51% del petroli que emana cada any. La font "contaminació de l'aire" fa referència a les partícules tòxiques volàtils, que emeten principalment vehicles i indústria, i que per acció dels agents atmosfèrics acaben dipositant-se als oceans.

Accidents petroliers

Com s'ha comentat anteriorment, els vessaments provocats per petroliers o pous de petroli són molt menys importants, en quant a quantitats alliberades, que la substitució d'oli de motor i altres fonts terrestres els residus de les quals s'aboquen als oceans. No obstant això, els accidents de petroliers mereixen rebre una menció apart, ateses les grans quantitats de petroli que s'aboquen en períodes de temps molt reduïts i els conseqüents efectes mediambientals a curt termini. Cal dir, però, que la freqüència de vessaments s'ha reduït, a nivell global, d'una forma considerable des de 1980.

Vessament al mar

El cru de petroli, generalment, un cop alliberat al mar, no es mesclarà amb l'aigua i flotarà sobre la superfície. Recordem l'elevada immiscibilitat en aigua dels hidrocarburs –principals constituents del petroli- i la menor densitat respecte de l'aigua. De forma seguida, es produirà l'escapament dels components volàtils per evaporació (Figura 2).

El comportament del vessament de petroli dependrà de diversos factors, inclosos el temps atmosfèric, la distància des de la costa i la direcció del vent. Al voltant de l'1% del petroli, percentatge corresponent als components solubles en aigua, es dissoldrà i es dispersarà ràpidament. Tot i això, la majoria de components no són miscibles en aigua i poden ésser barrejats per l'acció de les onades en una emulsió d'aigua i petroli coneguda com a "mousse". Aquelles onades que actuïn de manera més intensa trencaran el petroli en gotes de 0,01-1 mm de diàmetre i es dispersaran en la columna d'aigua.

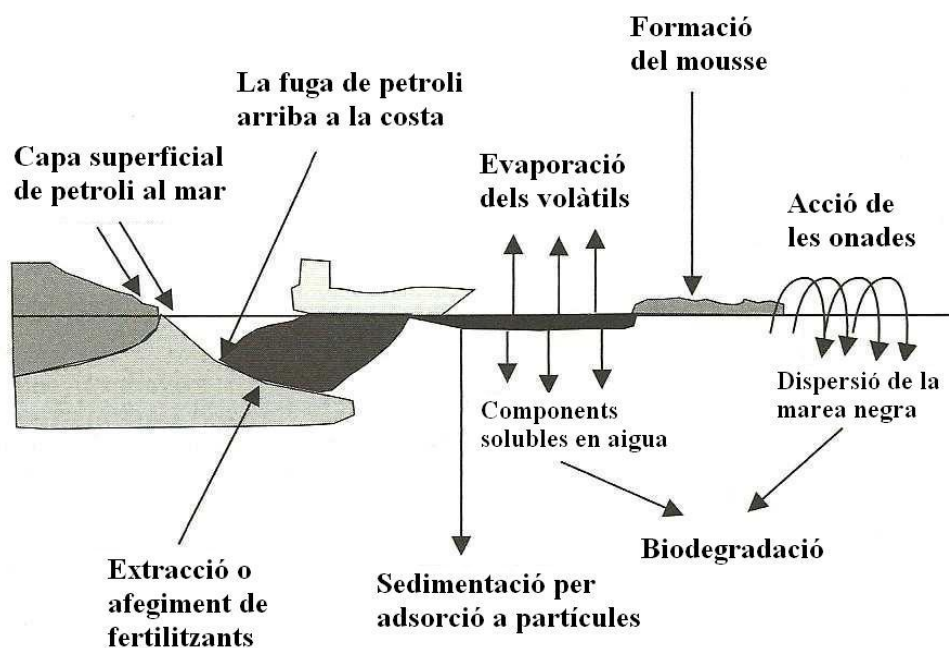


Figura 2 Destí del petroli vessat d'un petrolier al mar.

Adaptat de: Scragg (2005).

Les propietats del petroli vessat també afectaran el grau i la manera de dispersió d'aquest. Un exemple és el petroli vessat del petrolier *Braer*¹⁵; es tractava de cru lleuger amb una proporció molt elevada de composts de baix pes molecular. Foren vessades 85000 tones de cru; la intensa tempesta que havia causat el vessament provocà, també, una alta concentració de petroli en l'aigua. Tot i això, a causa del fort onatge el cru fou vigorosament mesclat i, finalment, extret de forma més ràpida que en altres vessaments les concentracions de cru dels quals eren més reduïdes, com, p.e., la de l'*Exxon Valdez*¹⁶. En el cas de l'*Exxon Valdez* s'alliberaren 36000 tones de petroli, és a dir, menys de la meitat de cru vessat amb el *Braer*. Per explicar la més ràpida degradació en el cas del *Braer* cal considerar l'estat calmat del mar en el vessament de l'*Exxon Valdez* i la composició del seu petroli, en què predominaven compostos d'elevat pes molecular. Vegeu en la figura 3 la comparació de les concentracions d'hidrocarbur en relació amb el temps entre els vessaments de l'*Exxon Valdez* i del *Braer*.

¹⁵ El vessament tingué lloc a les Illes Shetland, Gran Bretanya, el 1993.

¹⁶ El vessament es produí el 1989 a Bligh Reef, Prince William Sound, Alaska.

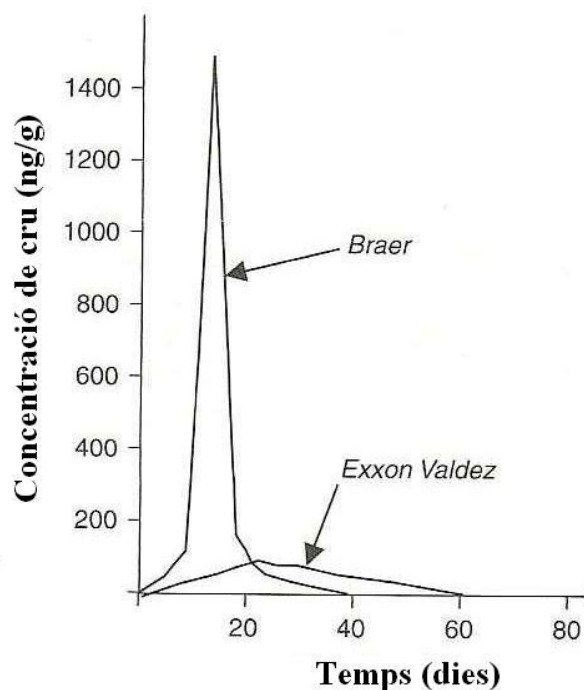


Figura 3

La reducció d'hidrocarburs en el mar després dels vessaments del *Braer* i l'*Exxon Valdez*. Cal tenir en compte l'elevat pes molecular del cru de l'*Exxon Valdez* i l'estat calmat de les aigües en el moment del vessament; a més, el cru lleuger transportat pel *Braer* es vessava enmig d'una tempesta.
Adaptat de: Kingston (2002).

La dispersió permetrà l'acció microbiana degradadora d'hidrocarburs de manera natural. La degradació tindrà lloc a la interfície entre el petroli i l'aigua i, per tant, a major dispersió del petroli, major la superfície de treball dels microorganismes, i més ràpida la degradació. El cru de petroli és un producte d'origen natural, la seva existència no es deu a l'activitat humana; així, es considera biodegradable i s'entén la presència al medi d'una àmplia varietat de microorganismes degradadors d'hidrocarburs.

D'altra banda, la presència d'hidrocarburs en el medi provoca un augment del nombre de microorganismes degradadors. Els estudis microbiològics que s'iniciaren pocs mesos després del vessament de l'*Amoco Cadiz*¹⁷ indicaren que els bacteris degradadors d'hidrocarburs havien augmentat per un factor de gairebé 10^5 sobre el nombre observat en llocs control que no estaven contaminats amb cru. En aquest mateix vessament, la població microbiana oxidant del petroli eliminà fins al 80% dels components no volàtils alifàtics i aromàtics 7 mesos després del vessament. Algunes fraccions de petroli, com les que són riques en alcans ramificats i hidrocarburs policíclics, foren eliminades a velocitats molt més lentes, possiblement degut a la naturalesa refractària d'aquests compostos a l'atac microbià, que els fan molt difícils de reduir.

¹⁷ Petrolier liberià que encallà el 1978 a la badia de Portsall, Finistère Nord, Bretanya francesa.

Sovint, la degradació de petroli per processos biològics, físics i químics rep el nom de *weathering*. La degradació biològica esdevé significativa després de varies setmanes, encara que, si s'han d'esperar els resultats de la bioremediació intrínseca, és possible que l'activitat microbiana es vegi restringida per factors condicionadors, com la disponibilitat de nitrogen i fòsfor.

Els components més complexos (des d'un punt de vista estructural) i menys solubles del petroli seran degradats molt més lentament que els components més lleugers. Són aquests compostos d'elevat pes molecular els que persistiran a la sorra i a les roques si el vessament arriba a la costa. En molts casos, aquests compostos formen terrossos de quitrà, estructures molt difícils de degradar pels microorganismes.

Toxicitat

El cru afectarà els organismes presents en un medi de dues maneres. En primer lloc, pot cobrir els organismes amb una capa de petroli, sufocant animals i plantes. En aquest aspecte, les aus marines poden veure-s'hi dramàticament involucrades. En arribar a la costa, si el cru està



Il·lustració 1 Au coberta per una capa de petroli després d'un vessament al mar.

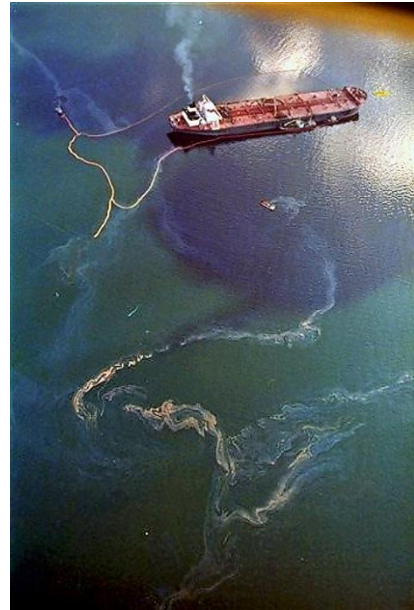
format per compostos d'alt pes molecular, afectarà greument els organismes de la zona intermareal. Segonament cal destacar la possible toxicitat dels components del cru, especialment la dels hidrocarburs aromàtics. Els compostos amb un pes molecular molt elevat resulten menys tòxics atès que són insolubles i, per tant, no són disponibles als organismes.

Extracció i bioremediació de cru

La primera acció després de qualsevol vessament de petroli té per fi la retenció del cru per mitjà de barreres de contenció. Seguidament, s'han d'aplicar absorbents i s'ha de procedir amb mecanismes d'extracció mecànica. També poden aplicar-se dispersants i es pot realitzar una crema controlada *in situ*. En el cas que el vessament arribi a la costa es poden emprar mètodes físics d'extracció i rentats d'aigua freda en zones rocoses, ja que s'ha demostrat que l'aigua calenta afecta negativament plantes i animals.

La bioremediació de cru al mar o a la costa té per objecte l'increment de l'activitat degradadora de petroli que realitzen, recordem-ho, de forma natural, alguns organismes. En diversos vessaments s'ha provat l'aplicació pràctica de la bioestimulació. Aquesta, a diferència de la bioaugmentació, ha resultat ésser molt efectiva.

Recentment també s'ha emprat biodièsel per netejar vessaments de petroli a les platges. El biodièsel actua com a solvent no volàtil i és biodegradable. La seva acció augmenta la biodisponibilitat del contaminant.



Il·lustració 2 Ús de barres de contenció després d'un vessament de cru al mar.



Il·lustració 3 Crema controlada *in situ* després d'un vessament de cru.

Il·lustració 4 Rentat d'aigua a pressió en una zona rocosa de la Badia de Prince William Sound, Alaska, després del vessament de l'*Exxon Valdez*.



ANNEX 6: APLICACIÓ DE LA BIOTECNOLOGIA EN LA INDÚSTRIA DEL PETROLI (MEOR)

Introducció

El cru de petroli és una mescla extremadament complexa i variable de compostos orgànics. El cru de petroli s'ha acumulat en el subsòl com a resultat d'una degradació anaeròbica d'organismes durant un període de temps molt prolongat.

La formació i acumulació de cru de petroli al subsòl té lloc en roques poroses. Atès que el petroli és menys dens que l'aigua i no hi és miscible, el cru és forçat a pujar en direcció a la superfície a través de capes poroses fins que el cru es topa amb un estrat impermeable. Si tal capa forma una mena de cúpula es formarà una reserva de petroli. La localització d'una reserva no té una relació dependent respecte de la profunditat en la que es troba. D'altra banda, si el cru no troba impediment en el seu camí ascendent, arribarà a la superfície, on els volàtils s'evaporen i els components pesants romanen, formant sorres de quitrà i llacs bituminosos.

La reserva pot ser sotmesa a considerables pressions degut al gas dissolt i a l'estrat superior de roques; la presència d'un aqüífer pot incrementar la pressió. Normalment, el gas es troba a la part superior de la reserva.

Extracció de petroli

Es diferencien tres fases en l'extracció de petroli:

- Fase primària: inclou la localització del jaciment mitjançant investigació sísmica i la subsegüent perforació. La pressió en la reserva forçarà els petrolis lleugers¹⁸ –que es troben en estat líquid- a ascendir pel pou d'extracció fins a la superfície. Per contraposició, els betums i asfalts romandran a la reserva ateses llurs enormes viscositats per fluir. A mesura que es procedeix amb l'extracció primària la pressió de la reserva decreix i, per tant, també ho fa la quantitat de petroli obtinguda. De forma seguida, es procedeix amb la succió per mitjà de bombes mecàniques o elèctriques, les quals són col·locades a la base del pou.

¹⁸ Els petrolis amb una elevada proporció de materials de baix pes molecular es coneixen com a 'petrolis lleugers' i flueixen fàcilment, mentre que els 'petrolis pesats' estan formats per materials d'elevat pes molecular i ofereixen més resistència al moviment de les seves partícules.

- Fase secundària: consisteix en la introducció d'aigua pel pou d'injecció per tal de forçar la sortida del petroli pel pou d'obtenció (Figura 4). Les fases primària i secundària representen l'extracció del 20-40% del cru original en el jaciment. Quan el benefici net esdevé massa baix atesa la poca quantitat de petroli que s'extreu, el procés s'atura.

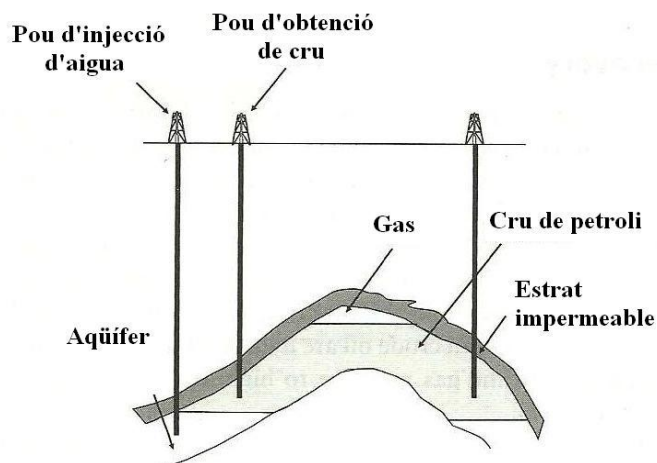


Figura 4 L'extracció del cru de petroli d'un reserva, la distribució de les seves fases i la posició dels pous.
Font: Scragg (2005).

- Llavors s'apliquen les tècniques d'*extracció de cru millorada* (de les sigles en anglès: EOR) o fase terciària. Aquesta fase té per fi incrementar la quantitat de cru a poder ser extreta d'un jaciment de petroli. Emprant EOR, es pot completar l'extracció del 30-60% de les reserves originals de petroli en el jaciment. Aquesta fase és executable per mitjà de diferents mètodes. Així, pot incloure processos de combustió *in situ*, d'injecció de vapor o d'inundacions controlades de diòxid de carboni o aigua. Malgrat llurs potencial i efectivitat, ignorarem els processos terciaris mencionats per centrar-nos en un mètode biològic d'extracció de cru, també inclòs en EOR.

Extracció de petroli millorada per mitjans microbians (MEOR)

MEOR és la introducció de microorganismes o l'estimulació dels ja existents en els pous d'extracció de petroli amb el fi últim de facilitar i augmentar l'obtenció del cru contingut en la reserva explotada. La tècnica s'empra després de les extraccions primària i secundària. Es confirma la validesa de la tècnica atès que és un procés de baix cost i aprofita la capacitat dels microorganismes de produir una àmplia gamma de metabòlits per facilitar la mobilització del cru reduint la viscositat d'aquest i les tensions interfacials.

Tolerància a les condicions del jaciment

Les condicions en el pou de petroli són extremes i no poden ser fàcilment manipulades; en conseqüència, els microorganismes hauran de tolerar condicions anaeròbiques a altes pressions, temperatures i salinitats. Un altre desavantatge per a la supervivència de la població microbiana és la possible presència de toxines en el cru de petroli.

Procés de millora en l'extracció de cru

Cal tenir en compte que l'extracció de cru és millorada per l'acció dels metabòlits secundaris produïts pels microbis. Així, p. e., la producció de gasos (CO_2 , CH_4) afectarà el cru augmentant la permeabilitat i reduint la viscositat, mentre que els agents actius de superfície o surfactants (vegeu annex 10) promouran les emulsions i disminuiran la tensió interfacial.

Extracció de cru

Després de l'activitat dels microorganismes, el cru ha reduït la seva viscositat i tensió interfacial i és més permeable. Per tant, pot ésser extret més fàcilment de les reserves mitjançant bombes o altres mètodes convencionals.

Ús i aplicació pràctica

La utilització de MEOR, de manera igual que la resta de tècniques incloses en la fase terciària d'extracció de petroli o EOR, actualment es troba en un punt mort atès que els preus -massa baixos- dels crús, a EE.UU. i Europa occidental, no justifiquen el desenvolupament d'aquestes tècniques d'extracció millorada. No obstant això, quan les reserves de cru comencin a escassejar els preus pujaran i, sota aquestes condicions, les tècniques de EOR poden ésser de menester.

ANNEX 7: SEGUIMENT DEL PROCÉS DE REMEDIACIÓ EN UN CAS REAL DE CONTAMINACIÓ: VESSAMENT DE L'EXXON VALDEZ

Introducció

En molts casos, les legislacions en matèria de contaminació mediambiental només són aprovades i aplicades quan són precedides de determinats accidents o desastres naturals causants d'una important contaminació. El tema d'estudi d'aquest annex i exemple que es proposa és el vessament de cru del petrolier *Exxon Valdez*. El vessament féu ressortir el conflicte existent entre l'explotació dels recursos naturals d'Alaska i la seva imatge d'estat primitiu i salvatge. L'efecte sobre el medi esdevingué un important i controvertit objecte de debat per la premsa que cobria la notícia del vessament. La preocupació pública permeté la implementació del decret OPA90¹⁹, gran part dels articles del qual concerneixen i tenen com a fi la reducció de la possibilitat de vessament de cru de petroli i derivats a alta mar. Des de l'aplicació del citat decret s'han reduït el nombre de vessaments i el volum de cru vessat a les costes nord-americanes.

Vessament de cru de l'*Exxon Valdez*

Mitjanit del 24 de març de 1989; Bligh Reef, Prince William Sound, Alaska.

Un petrolier provinent del port de Valdez i carregat al màxim de la seva capacitat (180000 tones de cru de petroli) entra a la badia de Prince William, on embarranca. Vessa la quantitat de 35500 tones de cru en les primeres 5 hores.

La primera mesura consistia en la contenció del cru, però no va ser fins 14 hores després del vessament que els materials necessaris arribaren. Els mitjans de comunicació no tardaren a fer-se ressò de l'accident, causa de l'augment simultani de la consternació pública. La important repercussió internacional que assoliria el vessament que ens ocupa es degué, en part, a la visió immaculada i vulnerable de l'ecosistema afectat per l'episodi de contaminació que es proporcionà al públic²⁰. Els següents dies arriben diverses embarcacions encarregades de descarregar la quantitat de cru encara restant a l'*Exxon Valdez*. Mentrestant, la marea negra s'estenia ràpidament pel Golf d'Alaska.

¹⁹ Promulgat pel Congrés dels EUA; decret també conegut com a Oil Pollution Act 1990.

²⁰ Tot i això, existeixen memòries que constaten activitats d'explotació en l'àrea afectada, com mineria, desforestació o sobrepesca.

La taula 1 mostra el destí estimat del cru vessat. Es calcula que un 20% del cru vessat s'evaporà durant els 10 primers dies, degut a l'alta proporció de components volàtils. Fins al 50% de cru es creu que hagués estat degradat com a resultat de l'activitat microbiana, mentre que només un 14% va ser recuperat.

Destí de l'oli	% de l'oli vessat
Recuperat	14
Encallat en sorra	2
Sedimentat	13
Evaporat	20
Dispersat/dissolt a l'aigua	1
Biodegradat	50

Taula 1 Destí percentual del cru de petroli vessat de l'*Exxon Valdez*.
Adaptat de: Laws (2000).

En total s'estimen uns 1700 km de costa contaminada a conseqüència del vessament. Malgrat que la quantitat de cru vessada no resultà molt elevada en comparació d'altres vessaments, els efectes consegüents concerniren importantment el fràgil ecosistema del golf d'Alaska, especialment la Badia de Prince William, atesos el parcial estancament de les aigües i la conseqüència i escassa dispersió del cru per acció de les onades. La baixa temperatura de les aigües d'Alaska haurien reduït també la velocitat de degradació.

Remediació

Poc després del vessament de cru es procedí amb la crema de cru. S'estima que es cremà el 0,14% de la quantitat original de cru. Atès el poc onatge els dispersants emprats no resultaren útils. Més de 800 km de costa de Prince William Sound foren sotmesos a mètodes de descontaminació. El procediment habitual a la costa consistia en la neteja de cru per mitjà d'aigua freda, tèbia i calenta (60°C), amb l'ocasional subministrament de dispersants. Es considerava l'extracció del 20-25% del cru. En últim resultat s'empraren fertilitzants. Aquests provaren una gran efectivitat en l'eliminació de cru, especialment a la superfície atesa l'accessibilitat a l'aire. Generalment, les aigües considerades com a "netes" presenten uns nivells de nitrogen i fòsfor molt baixos i conseqüentment limitadors del creixement microbià. Aquest era el cas de les aigües d'Alaska i, per tant, l'addició de fertilitzants resultà en un augment considerable del grau de degradació.

En el cas de l'Exxon Valdez els nivells d'hidrocarburs en els sediments contaminats assoliren nivells de sediments no contaminats després de 3-4 anys. Vegeu en la figura 5 l'evolució temporal de les concentracions de cru en els sediments segons si estaven exposats a l'oli o no. Si una capa gruixuda de cru no s'extreu de la costa mitjançant l'activitat humana o l'acció dels agents climàtics, es desenvolupen condicions anaeròbiques –i les conseqüents degradacions lentes- i el cru pot persistir llargament.

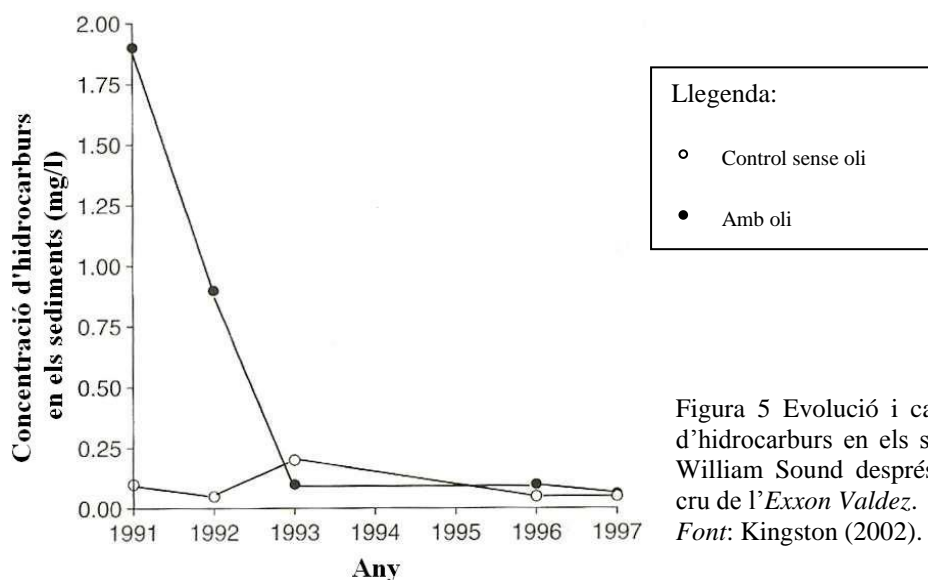


Figura 5 Evolució i canvis en els nivells d'hidrocarburs en els sediments de Prince William Sound després del vessament de cru de l'Exxon Valdez.
 Font: Kingston (2002).

Després de la degradació del cru, es registrà un augment significatiu del nombre de microorganismes degradadors d'hidrocarburs en els emplaçaments costals prèviament afectats per la contaminació; aquest augment fou, en algunes àrees, del 100%. En condicions de no contaminació aquesta població degradadora pot augmentar com a molt un 0,1%. En la degradació de cru del vessament que ens ocupa no s'identificà cap varietat microbiana capaç de degradar, de forma integral, el cru de petroli. Això significa que la biodegradació del cru implica, necessàriament, una sèrie de reaccions complementàries entre les diferents varietats existents en un consorci microbià. En ocasió del vessament de l'Exxon Valdez s'introduïren microorganismes concrets al medi afectat (bioaugmentació), aplicació que, a diferència de la bioestimulació, no reeixí.

El vessament de l'Exxon Valdez afectà considerablement la flora i la fauna de les àrees damnificades, tot i que en el període de 3-4 anys la majoria de la població ja s'havia recuperat. Es calcula que només un 14% del cru vessat va ser extret mitjançant mètodes convencionals. Es dedueix, doncs, que els processos de degradació duts a terme per la població microbiana autòctona foren els mètodes d'extracció més efectius i, també, els menys destructius.

ANNEX 8: CÈL·LULA SINTÈTICA

El científic J. Craig Venter i el seu equip de recerca del J. Craig Venter Institute (JCVI) a Rockville, Maryland i San Diego, Califòrnia, han aconseguit la fabricació d'un genoma bacterià sintètic i la posterior transferència d'aquest a un bacteri, on ha reemplaçat l'ADN natiu. Regida pel genoma artificial, la cèl·lula microbiana començà a replicar-se i a sintetitzar noves proteïnes, assoliment, de ben segur, decisiu en la història de la biologia i la biotecnologia. Aquesta notícia es reportava per primera vegada el 20 de maig del 2010 a la revista científica especialitzada Science.

Introducció

La recerca, que hagué de menester la feina de 25 persones durant més d'una dècada i un cost estimat de 40 milions de dòlars, ha provat la producció d'una seqüència genètica sintètica i la posterior trasplantació d'aquesta a una cèl·lula bacteriana, de manera que en resulta una cèl·lula viable regida pel nou genoma inserit. Això significa un procés de divisió cel·lular normal i comporta la fabricació d'una nova sèrie de proteïnes, codificades pel nou genoma. D'aquesta manera, es produeix el reemplaçament del software original del bacteri (ADN natiu) per un nou software, en aquest cas sintètic, que implica la desaparició de les característiques de la primera espècie i l'emergència d'una nova espècie determinada pel genoma introduït.

Els objectius a llarg termini relacionats amb aquest tipus de recerca engloben la creació de cèl·lules amb aplicacions funcionals específiques, com la fabricació en sèrie de drogues farmacèutiques i l'habilitat de netejar vessaments de petroli. Malgrat els previsibles beneficis que se'n deriven, es requereixen estudis detallats i específics que avaluin els beneficis potencials d'aquesta tècnica respecte de l'enginyeria genètica convencional i determinin una regulació d'acord amb els possibles riscos derivats de la pràctica i preventiva de la monopolització del sector.

Tot i que el bacteri sintètic, sobrenomenat Synthia, ha estat considerat un pas transcendental en l'enginyeria biològica atesa la possibilitat de crear organismes amb funcions especialitzades que difícilment haguessin pogut desenvolupar-se naturalment, la seva consecució ha despertat una important inquietud ètica. Ja sigui desacreditant J. Craig Venter i el seu equip, o argumentant els riscos derivats de la biologia sintètica,

objectes pròximament de debat, no són pocs els crítics que assenyalen la present pràctica experimental causant d'un canvi en el sentit i la manera de concebre la vida. Independentment de la validesa ètica del treball realitzat per l'equip de recerca de Venter seria interessant, si bé de forma breu, repassar el complex procés dut a terme.

Pràctica experimental

En primer lloc, els investigadors extreien el cromosoma natural d'un bacteri *Mycoplasma mycoides* i seqüenciaven el milió de bases del seu genoma per tal de construir-ne una còpia sintètica. L'equip de recerca construiria el cromosoma sintètic a partir de la compra, a una empresa biotecnològica, del més d'1 milió de parells de bases que formaven la totalitat del genoma de *M. Mycoides*. L'assemblatge en ordre correcte s'aconseguia mitjançant la col·locació de 80 bases als extrems de cada seqüència de manera que només s'unien entre sí les sèries de 80 bases adicionades que oferien una relació d'especificitat de bases, segons: adenina amb timina i citosina amb guanina.

Els investigadors afegiren uns fragments d'ADN anomenats “watermark” a la seqüència genètica de *M. mycoides* per diferenciar-la com a sintètica en cas de ser continguda dins d'un bacteri. Aquestes marques codificaven missatges coneguts pels investigadors. S'assemblaven seqüències cada vegada més llargues en llevat. Es procedia amb controls de qualitat per evitar errors de bases en la seqüència sintètica.

El genoma sintetitzat i assemblat es trasplantaria a un bacteri d'espècie *Mycoplasma capricolum*. En una de les addicions “watermark”, es dissenyava l'ADN perquè produís una proteïna que tornés blaves les cèl·lules en presència de substàncies químiques específiques. Es tracta d'una proteïna que no es troba en cèl·lules naturals. Els investigadors eren capaços, doncs, d'identificar les cèl·lules dirigides per l'ADN sintètic. Subsegüentment es seqüenciava l'ADN de la colònia comprovant i confirmant que, en efecte, els bacteris tenien el genoma sintètic i que produïen proteïnes característiques de *M. mycoides*, en lloc de *M. capricolum*. La colònia, a més, creixia i es reproduïa com un típic *M. mycoides*, comportament demostrador de la transformació cel·lular. No romangueren traces de l'ADN natiu del *Mycoplasma capricolum* hoste.

Cal aclarir que la creació de genomes personalitzats, com els que contenen la informació per a la fabricació de combustibles o productes farmacèutics i les ulteriors transferència i substitució de l'ADN natiu són encara una utopia, atès l'insuficient coneixement que es té sobre el significat, la relació i, en general, la utilitat de molts gens

i, per tant, sobre la capacitat enzimàtica vinculada a la transcripció de l'ADN, en primer lloc, i a la traducció de l'ARN, segonament. Per aquest motiu una part molt important del capital del qual disposa el J Craig Venter per a les investigacions en biologia sintètica es destina a la recerca i el disseny de noves rutes metabòliques per a la síntesi d'antibiòtics i vacunes i per a la degradació i/o incorporació en la mateixa cèl·lula de carboni present en el medi, per exemple. En aquest últim aspecte cal destacar el projecte referent a algues capaces -per mitjà de la introducció de gens i, per tant, de rutes metabòliques- de transformar diòxid de carboni en biocombustibles hidrocarburs.

Discussió de l'èxit

Malgrat l'èxit de l'experiment, els investigadors emfatitzen que no es va crear vertaderament una forma de vida sintètica, atès que el genoma, malgrat que fabricat sintèticament a partir de productes químics, es va introduir en una cèl·lula viva, és a dir, que el citoplasma de la cèl·lula receptora no era sintètic. Tot i això, el bacteri *semisintètic* anomenat *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 és “la primera espècie auto-replicativa que té com a pare un ordinador”, segons Venter. Això comporta que la descendència d'aquest bacteri no contingui molècules proteiques pròpies de la cèl·lula receptora original. Es preveu que, a llarg termini, s'usin les tècniques explorades per Venter per sintetitzar genomes completament dissenyats. Abans d'això, però, serà de menester la plena comprensió del llenguatge genòmic, ja que el que s'ha aconseguit fins ara és, *només*, la impressió d'una còpia sintètica d'un conjunt de gens.

Perills i controvèrsia

Tot i el primigeni estadi de desenvolupament de la biologia sintètica, ja és de menester una regulació preventiva de la inserció en qualsevol medi d'aquells organismes el genoma dels quals hagi estat manipulat i de la possible activitat perjudicial d'aquests envers qualsevol forma de vida existent. Cal tenir present que la introducció d'organismes aliens a un medi, manipulats genèticament o no, en el mateix medi pot desestabilitzar l'equilibri ecològic d'un ecosistema. Amb referència a aquest últim, aspecte la companyia de Venter assegura que els microorganismes seran dissenyats de manera que, mitjançant l'activació de “gens suïcides”, no puguin viure fora dels ambients de producció. Cal fer notar, també, el perill que comportaria la síntesi de substàncies nocives a partir de la inserció de gens. Per tant, la fabricació o manipulació

d'aquests hauria d'implicar el ple coneixement de la seva repercussió final en el microorganisme receptor.

Menció a part es mereix el fenomen del "bioterrorisme". Actualment, per mitjà d'Internet es poden obtenir les seqüències d'ADN dels genomes de diversos organismes l'activitat dels quals resulta perjudicial per als humans i/o altres éssers vius. Si, a més, es disposa de la tecnologia per sintetitzar aquests genomes, no és difícil d'extrapolar el dany que es podria arribar a provocar amb fins malèfics. De moment podria semblar ingenu, però tal i com s'esdevingué amb l'enginyeria genètica, la biologia sintètica es desenvolupa ràpidament.

Un dels aspectes més controvertits vinculats amb la descoberta que ens ocupa són les patents sol·licitades pel JCVI i que Venter, un cop concedides, assignaria a Synthetic Genomics, empresa que ell mateix gestiona i que finança, en gran mesura, el projecte. Aquesta conducta ha originat les queixes d'empreses dedicades a la biotecnologia i d'organismes de control tecnològic, que sostenen que les concessions de les patents a les quals s'al·ludia prèviament resultarien en el monopoli del camp per part de les empreses afiliades a Synthetic Genomics Inc (SGI), esdevenint aquesta la Microsoft de la biologia sintètica.

Relació amb la bioremediació

Després d'aquest experiment, qualificat de "prova de concepte", el mateix equip d'investigació es prepara per construir organismes més complexes amb propietats útils i aprofitables. En aquest aspecte, treballen amb la fabricació de cèl·lules productores d'energia, productes farmacèutics i compostos industrials i retenidores de diòxid de carboni. Amb el fi de proporcionar els gens mitjançant els quals els organismes puguin dur a terme les funcions especialitzades útils, els científics investiguen les seqüències d'ADN que codifiquen per a la funció específica pretesa i la sintetitzen químicament per inocular-la a un microorganisme (bacteri, principalment) on reemplaci el genoma natiu o s'hi intercali. El perfeccionament d'aquest mètode i un coneixement més extens en matèria de rutes metabòliques permetrà el desenvolupament, també, de nous biocombustibles i productes bioquímics, tèxtils, fonts d'aliment, etc.

En concepte de remediació mediambiental, preliminarment es citava la retenció de diòxid de carboni. Es preveu, també, que a mig termini s'investigui la informació gènica necessària per a la depuració d'aigües residuals contaminades mitjançant organismes el

genoma dels quals hagi estat sintetitzat amb productes químics. El problema existent és l'exigència d'una ruta catabòlica específica per a cada tipus de contaminant. Una altra possible aplicació objecte de debat és la referent a la neteja de vessaments de petroli. Per això cal la seqüenciació dels genomes de les espècies de microorganismes que realitzen la biodegradació del petroli de forma natural.

Es preveu, però, que, molt a llarg termini, un cop els productes derivats del petroli siguin reemplaçats per sucedanis amb propietats anàlogues a aquests, la bioremediació no hagi d'ésser de menester. Es desprèn, doncs, que la producció biològica de materials -com els plàstics- constituiria un procés de fabricació molt més respectuós amb el medi ambient i el producte final seria molt biodegradable, de manera que per mitjà de bioremediació intrínseca aquest seria fàcilment degradat.

D'altra banda, la biologia sintètica hauria de permetre el desenvolupament d'enzims que degradessin un ampli ventall de biomassa salvant, així, un dels majors problemes relacionats, avui, amb els biocombustibles: la difícil descomposició de l'alt percentatge de biomassa residual. Sembla, doncs, que la biologia sintètica no tindria com a fi últim el desenvolupament i el perfeccionament de la bioremediació, sinó el no ús d'aquesta, seguint el missatge de la frase feta "més val prevenir que curar".

Conclusió

Doncs, com a conclusió, en efecte, aquesta tecnologia promet esperança i il·lusió. Per alguns consisteix en "jugar a ser Déu", per altres "fer el bé", però no hem d'oblidar les probables conseqüències negatives que ocorrerien en cas de negligències experimentals. Per aquest motiu no es pot tolerar l'absència d'una regulació exigent i efectiva en la matèria. Els beneficis relacionats amb aquesta pràctica són monumentals, però cal considerar els possibles perjudicis que se'n deriven.

Hi ha molt per descobrir, però tant per investigar... L'anunci de Venter pot ser o no ser l'obertura d'una revolució científica, però obre sens dubte un nou capítol en el drama de si l'home és l'amo o el servent de la tecnologia.

ANNEX 9: PROTOCOL DE DILUCIÓ

Preparació de les mostres precedent a la cromatografia

Seguim el procés de dilució següent, suposant el tractament 3A:

El pot original conté la mostra de sediments amb microorganismes, aigua i oli. S'introdueix tot el contingut en un embut de decantació. Es posen 50 ml d'un solvent orgànic tal com l'hexà al recipient que inicialment contenia la mostra 3A i se sacseja. Aquest solvent permetrà dissoldre les restes del tractament que quedin en el recipient original. Es posen els 50 ml d'hexà amb les restes dissoltes a l'embut de decantació. S'introdueixen novament 20 ml d'hexà al pot inicial per recuperar les possibles restes de tractament que encara s'hagin pogut perdre i també es dipositen a l'embut de decantació. Es col·loca l'embut cap per avall i s'obre la clau per treure el gas de subpressió, és a dir, perquè surti l'hexà volatilitzat (Il·lustració 5).



Il·lustració 5 El procés d'extracció del gas de subpressió de l'embut de decantació.



Il·lustració 6 El muntatge per a la separació de les diferents fases de la mescla a l'embut de decantació.

Agitem durant 1 minut l'embut de decantació. Deixem que les diferents fases s'estabilitzin i se separin. S'utilitzen pinces metàl·liques amb nou i un suport²¹; vegeu la fotografia al marge esquerre.

Veiem dues fases clarament separades: l'orgànica (solvent + oli) a dalt; i l'aquosa –més densa- a baix. Abans de decantar, traiem el tap de l'embut. Seguidament es decanta i se separa la fase aquosa, situada a la part inferior de l'embut, a un matràs aforat. La fase orgànica, formada per hexà i els hidrocarburs, es torna a posar al pot originalment

²¹ En les posteriors ocasions que s'utilitzi un embut de decantació amb el mateix fi es farà ús del mateix material.

contenedor de la mostra 3A. A la fase aquosa, ara en un matràs aforat, se li afegeixen 20 ml d'hexà i es posa la mescla a l'embut de decantació. Per obtenir el cromatograma més real i exacte possible és important no perdre restes d'hidrocarburs que, en aquest cas, podrien haver-se quedat a la fase aquosa. Després de treure el gas de subpressió, s'agita l'embut i deixem diferenciar-se les dues fases; extraiem la fase aquosa a un matràs i la fase orgànica restant es diposita al pot original del tractament 3A.

Es realitzava el mateix procés amb la resta de tractaments i es mesuraven els volums de les diferents fases corresponents a cada tractament; obteníem les dades següents:

	TRACTAMENT			
	1A	2A	3A	4A
VOLUM FASE AQUOSA	106 ml	115 ml	99 ml	114 ml
VOLUM FASE ORGÀNICA	107 ml	95 ml	101 ml	101 ml

Taula 2 Relació dels volums corresponents a les fases aquosa i orgànica, segons el tractament.

Les diferències existents entre els diferents valors volumètrics poden ser deguts a factors molt diversos i, en general, difícilment controlables i manejables, com l'evaporació de l'aigua durant el tractament o la viscositat de l'oli que resta exactitud en les mesures després de la seva manipulació.

Les 4 fases aquoses corresponents als 4 tractaments originals queden apartades. Es prossegueix amb la dilució de les mostres prenent com a exemple la fase orgànica 3A. Filtrem, doncs, a través d'un paper de filtre, la fase orgànica obtinguda anteriorment, emprant un embut i un matràs aforat per recollir el filtrat. Es posen 10 ml més d'hexà al matràs que contenia la fase orgànica 3A i se sacseja per recuperar les possibles restes; es filtra el contingut, que es diposita en el mateix matràs aforat que la mostra filtrada en primer lloc. El residu que queda en el paper de filtre retingut es deixa assecar durant 1 setmana i es pesa. Es tracta d'una fase hexànica composta de sòlids gelatinosos. Per als diferents tractaments hem obtingut els resultats que segueixen a la següent pàgina:

(S'ha cregut oportú filtrar una mostra de l'oli mineral de màquina que es pretenia fer degradar inicialment per, així, comprovar-ne la massa retinguda en una filtració; aquesta

mostra rep el nom de “blanc”. El procés de preparació per a la seva filtració es descriu a les pàgines 35 i 36).

	TRACTAMENT				
	1A	2A	3A	4A	BLANC
MASSA FASE HEXÀNICA RETINGUDA	2,0444 g	3,0724 g	3,1803 g	2,7166 g	0,4869 g

Taula 3 Relació de les masses de sòlids gelatinosos retinguts, corresponents a les fases hexàniques.

Les fotografies que segueixen mostren, la de l'esquerra, el paper de filtre que reté els residus sòlids del tractament 2A (i en el que s'hi pot observar una pols blanquinosa a causa de la retenció de les sals inorgàniques) i, la de la dreta, els cinc papers de filtre corresponents a les cinc filtracions realitzades. En aquesta segona fotografia es pot comprovar com la retenció de partícules sòlides en la filtració del blanc és molt menor. També s'observa que els papers de filtre corresponents a les filtracions dels tractaments 2A i 4A tenen una tonalitat més clara, a causa de la retenció de sals.



Il·lustració 7 Residus sòlids del tractament 2-A retinguts en el paper de filtre.



Il·lustració 8 Papers de filtre retenidors de partícules en suspensió del *blanc* (a dalt) i dels 4 tractaments (a baix), ordenats en ordre creixent d'esquerra a dreta.

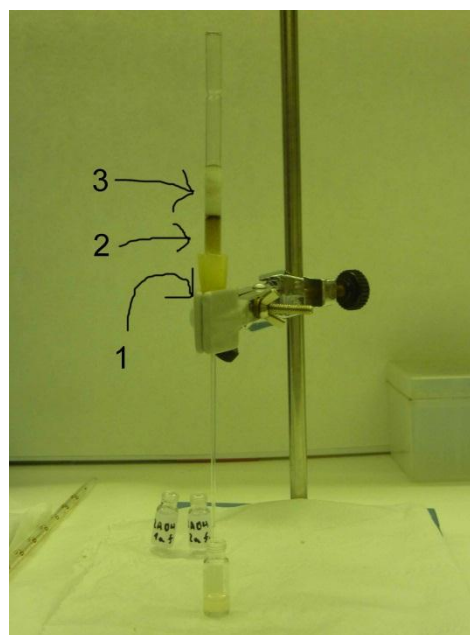
El següent pas consisteix en arrasar amb hexà a volums idèntics (250 ml) les 4 fases orgàniques obtingudes; aquest procés es pot dur a terme en els mateixos matrassos aforats d'obtenció si aquests tenen 250 ml de capacitat. Aproximadament, calen 180 ml de solvent orgànic per a cada tractament.

Protocol de preparació de les columnes (prenent com a exemple el tractament 3A)

Es prepara una microcolumna utilitzant de continent una pipeta Pasteur. S'empren també un suport, pinces metàl·liques amb nou, els vials corresponents als extractes filtrats, una balança, espàtules i paper de filtre (per pesar els productes químics) i llana de vidre. La microcolumna, mostrada al marge dret del full, consta de 3 nivells:

- llana de vidre (amagada entre les pinces metàl·liques:1)
- 0,4 g de SiO_2 (gel de silica) (2)
- 2 cm d'alçària dins la pipeta de Na_2SO_4 anhidre (3)

En la fotografia s'observa com en el nivell superior (3) no hi ha retenció de partícules. En el nivell (2), el gel de silica sí que és capaç de retenir aquestes partícules de dimensions majors. Es percep una gradació de tons negres en aquest nivell.



Il·lustració 9 Microcolumna en pipeta Pasteur; el seu contingut s'estructura en 3 nivells.

La microcolumna preparada en pipeta Pasteur compleix una doble funció:

- 1- L'aigua no es pot injectar al cromatògraf; el sulfat de sodi anhidre, doncs, reté la humitat eliminant les traces d'aigua existents en la fase orgànica final; és un dessecant. Degut al contacte entre les fases aquosa i hexànica és molt probable que encara quedin restes d'aigua a la mostra. El sulfat de sodi anhidre, però, no reté les partícules en suspensió.
- 2- El gel de silica reté aquestes partícules de dimensions majors i que tampoc no poden ésser punxades pel cromatògraf.

La llana de vidre fa de suport i manté els nivells superiors fixos.

Procediment:

1- Amb una pipeta graduada d'1 ml de capacitat i un pipum s'agafa 1 ml de la solució arrasada a 250 ml amb hexà. Es passa a través de la microcolumna i recollim en un vial (4) la mostra. D'aparença, aquesta és "grisa"; encara té partícules suspeses.

2- Com que no s'aconsegueix retenir totes les partícules negres en suspensió de l'extracte, filtrem la mostra eluïda amb un filtre de disc (0,22 µm) mitjançant una xeringa i una agulla. La mostra queda perfectament transparent; per tant, és injectable al cromatògraf. Obtenim un cromatograma que mostra un perfil propi i



Il·lustració 10 Filtre de disc (0,22µm), xeringa i agulla.

característic d'hidrocarburs; els cromatogrames globals corresponents als 4 tractaments poden consultar-se a partir de la pàgina 34 del capítol *Pràctica experimental*.

3- Rentem la microcolumna amb 2 ml de clorur de metilè (CH_2Cl_2), per comprovar si hi ha hidrocarburs de l'oli retinguts. Obtenim en un vial la mostra, que anomenem segona fracció. Aquesta ja pot ser punxada al cromatògraf directament, atès que és molt transparent. El cromatograma ens indica que hi ha molt pocs hidrocarburs; en atenció a això, la injecció de la segona fracció de cada tractament –aconseguida pel rentat de columna posterior a la primera filtració- no és de menester.

Per aquest últim motiu exposat, els cromatogrames que s'ensenyen en aquest document com a resultat del procés de cromatografia corresponen a la primera fracció obtinguda de la filtració per la microcolumna.

En aquesta microcolumna de filtració preparada s'han pogut distingir dues fases:

- Fase estacionària: són el sulfat de sodi anhidre i el gel de silica. No es mouen i absorbeixen els components que passen a través de la columna.
- Fase mòbil: és el clorur de metilè. Arrossega els possibles components retinguts o absorbits a la fase estacionària.

Anàlisi del blanc

S'ha considerat convenient realitzar un cromatograma del blanc, és a dir, de l'oli mineral de màquina emprat en la bioremediació.

Procediment:

Es tara un vas de precipitats en una balança. S'hi pesa 1 g del mateix oli mineral de màquina usat que havíem emprat en l'experiment. Posem 30 ml de CH₂Cl₂ (solvent orgànic), mesurats amb una proveta, en el vas de precipitats amb l'oli. Es col·loca el vas de precipitats al damunt d'un agitador magnètic (de P-selecta), a 500 revolucions/minut, durant el temps necessari perquè es dissolgui la mescla (1 minut aproximadament, en el nostre cas). Es filtra el contingut i s'observa que pràcticament no queden residus retinguts en el paper de filtre. Vegeu-ne el resultat i els de la resta de tractaments en la taula 3 de la pàgina 33 d'aquest mateix annex. S'obté el filtrat en un matràs aforat de 50 ml. S'enrasa amb CH₂Cl₂ i es filtra 1 ml d'extracte per la columna anteriorment descrita. El cromatograma corresponent es mostra a la pàgina 38, dins la secció *Pràctica experimental*.

Anàlisi cromatogràfica: condicions analítiques

Les següents taules detallen els components utilitzats en la cromatografia i els paràmetres i condicions fixats en aquesta.

Equip	GC (Cromatògraf de Gasos) 8000 i detector Voyager 800, d'espectometria de masses.
Columna capil·lar	DB-5. Fase estacionària 95% dimetil 5% difenil polisiloxà. Longitud: 30 m Diàmetre: 0,250 mm Film (o gruix de fase estacionària): 0,25 µm Temperatura: - d'injector: 205 °C - de columna: (vegeu la taula 5 a la següent pàgina) - d'interfase: 250 °C - de font de ionització en el detector: 200 °C
Fase mòbil	Heli. Cabal d'1,2 mL/min
Volum d'injecció de mostra	1 µL
Detector	D'espectometria de masses. Interval de masses (escan): 50-450 u.m.a*

Taula 4 Condicions analítiques de cromatografia.

* L'interval de valors màssics detectables corresponents als components separats de l'extracte injectat al cromatògraf es va restringir de les 50 u.m.a. a les 450 u.m.a. Això significa que possibles components presents a la mostra injectada com l'oxigen (de massa 32 u.m.a.) i el diòxid de carboni (de massa 44 u.m.a.), van ser exclosos del cromatograma resultant.

ETAPA	TEMPS (minuts)	TEMPERATURA (°C)	INCREMENT (°C/min)
1	5,00	40	4,00
2	2,20	130	12,00
3	2,20	180	7,00
4	12,00	250	-
5	Valor indefinit: etapa de refredament		

Taula 5 Relació de temperatures a què va estar sotmesa la columna durant l'anàlisi cromatogràfica.



Il·lustració 11 Consol Blanch i Xavier Serra al laboratori de la UVIC.

ANNEX 10: SURFACTANTS

Els surfactants són molècules amfipàtiques, amb una part hidrofòbica i l'altra hidrofílica, que actuen com a detergents i solubilitzen, emulsionen i dispersen els contaminants. Els surfactants d'origen biològic (produïts per microorganismes) reben el nom de biosurfactants. Aquests poden ser fabricats *in situ* afegint microorganismes concrets, ja sigui mitjançant l'estimulació de la població autòctona o a partir de la introducció de microorganismes (bioaugmentació). Els surfactants s'acumulen als punts de contacte –interfície- entre l'aigua i el contaminant, disminueixen la tensió superficial del punt de contacte i, consegüentment, formen micel·les. Això resulta en un augment de la superfície de contacte sobre el contaminant, una major àrea de treball pels microorganismes i, per tant, una biodegradació major. Els biosurfactants s'han emprat per solubilitzar compostos del petroli i xenobiòtics, com PCBs (bifenils policlorats) i organofosfats. A tall d'exemple, el bacteri *Acinetobacter radioresistens* produeix una proteïna anomenada *alasan*, de caràcter emulsificador, i amb capacitat per a solubilitzar PAHs (hidrocarburs poliaromàtics). El gen que codifica aquesta proteïna ha estat clonat i transferit a *Escherichia coli*, bacteri que ha expressat tal gen i, per tant, aconseguit solubilitzar els PAHs.

L'ús del biodièsel, de baixa toxicitat per a les plantes i molt biodegradable, també ha demostrat ésser molt útil en la dissolució del cru de petroli, de manera que no resulta tòxic per als microorganismes i, en canvi, facilita l'accés al contaminant.

Un altre mètode per millorar l'accés que tenen els microorganismes als contaminants és l'extracció d'aquests del medi mitjançant l'ús de diòxid de carboni líquid. Els compostos que formen el contaminant són separats en fase aquosa i les partícules no dissoltes són recollides i tractades per separat. El mètode ha estat utilitzat amb èxit per l'extracció de dièsel del sòl.

ANNEX 11: GLOSSARI

Metabolisme Conjunt de reaccions bioquímiques que tenen lloc en els éssers vius, les quals poden ésser de síntesi o bé de degradació i producció d'energia.

Hidrocarbur Compost orgànic format per carboni i hidrogen.

Pes molecular És la suma dels pesos atòmics de cada àtom de la molècula.

Compost orgànic Compost químic que conté carboni a la seva estructura molecular.

Bacteri Microorganisme unicel·lular d'estructura procariòtica (no té nucli diferenciat).

Fong Microorganisme eucariota unicel·lular o pluricel·lular que presenta nutrició heteròtrofa. S'alimenta per mitjà de la secreció d'enzims digestius a l'exterior, on hi ha la matèria orgànica alimentària, i la posterior absorció de les molècules originades després de la digestió.

Biosfera Unitat funcional constituïda pel conjunt de la matèria viva de la Terra i l'espai on es donen les condicions ambientals i funcionals compatibles amb la vida.

Mutació Alteració permanent d'un o més caràcters hereditaris com a conseqüència d'un canvi en el material genètic d'una cèl·lula, que es transmet a les cèl·lules filles.

Matèria orgànica Substància que prové d'éssers vius, la descomposició dels quals dona lloc a un ventall molt ampli de substàncies.

Autotròfia Tipus de nutrició dels organismes que, segons les seves necessitats metabòliques, només poden incorporar del medi productes inorgànics.

Heterotròfia Tipus de nutrició dels organismes que només incorporen del medi productes orgànics, d'acord amb les seves necessitats biològiques.

Ruta o via metabòlica Seqüència de reaccions químiques que condueixen d'un substrat inicial a un o varis productes finals, a través d'un seguit de metabòlits intermedis.

Biodegradació Transformació d'un substrat complex en substàncies més simples duta a terme per un organisme.

Medi d'enriquiment Medi de cultiu que afavoreix o permet la multiplicació d'uns bacteris i inhibeix els altres.

Catabolisme Conjunt de reaccions metabòliques en què la degradació d'uns compostos complexos comporta l'alliberament d'energia.

Compost intermedi Compost format per les substàncies inicials com a pas necessari per a obtenir els productes finals de la reacció.

Metabòlit intermedi Nom genèric dels compostos químics existents en els éssers vius que participen en les reaccions químiques del metabolisme o hi són produïts.

Estructura molecular Disposició tridimensional dels àtoms que constitueixen una molècula. La disposició a l'espai dels àtoms determina moltes propietats d'una substància.

Solubilitat Mesura de la capacitat d'una determinada substància per a dissoldre's en una altra, a una temperatura donada.

Concentració Quantitat d'una substància present en una unitat de la mescla o solució que la conté.

Toxicitat Activitat tòxica d'una substància.

Polaritat Propietat d'un enllaç, d'un àtom, d'una molècula, per la qual existeix una separació estable de les càrregues positives i negatives.

Reactivitat Facilitat amb què reacciona una substància enfront de reactius diversos.

Comportament recalcitrant No susceptible a ésser degradat o modificat.

Hidrocarbur alifàtic Dit dels compostos orgànics acíclics, que no contenen cap cadena tancada d'àtoms

Hidrocarbur aromàtic S'aplica als compostos orgànics cíclics que contenen nuclis benzènics.

Funcions vitals dels éssers vius Processos bàsics duts a terme per qualsevol cèl·lula viva. Són tres: nutrició, relació i reproducció.

Metall pesant Metall de transició de densitat alta. Concentracions elevades de metalls pesants són altament perjudicials per als éssers vius.

Manipulació genètica Modificació de la informació genètica d'un organisme mitjançant l'alteració del seu genoma.

Substrat Material que conté substàncies orgàniques utilitzables per un microorganisme.

Hifa En els fongs, cadascun dels elements filamentosos que constitueixen el miceli. El miceli és el conjunt d'hifes que constitueixen l'aparell vegetatiu dels fongs.

Inòcul Població de microorganismes desenvolupada en un medi de cultiu, que pot ser dispersada a un medi per a la seva propagació.

Plasmidi Segment circular d'ADN present eventualment en els bacteris, que porta gens addicionals als del cromosoma normal al qual no s'integra mai.

Transposó Element d'ADN que es pot inserir en diferents llocs d'un plasmidi o d'un cromosoma.

Gen Cadascuna de les unitats hereditàries elementals en què es troba codificada una unitat d'informació genètica.

Gens transferits horitzontalment La transferència horitzontal de gens (HGT) o transferència lateral de gens (LGT) és un procés en el qual un organisme transfereix material genètic a una altra cèl·lula que no és descendent. La transferència vertical s'esdevé quan un organisme rep material genètic d'un ancestre.

Factor limitant Es diu de qualsevol factor que limita el desenvolupament d'un organisme o d'una població i en pot impedir la supervivència.

Cadena tròfica o alimentària Conjunt de relacions de producció i obtenció d'aliments que s'estableix entre els diferents organismes d'un ecosistema.

Flora i fauna Conjunt d'espècies vegetals i d'espècies animals que creixen i habiten una regió o en un territori determinat.

DNA recombinant Molècula de DNA formada per la unió de seqüències gèniques provinents de dos organismes d'espècies diferents. En introduir aquest DNA recombinant en un organisme es produeix una modificació genètica que comporta tant l'alteració de característiques existents com l'expressió de nous caràcters i capacitats.

Biotransformació Conjunt de modificacions químiques que un organisme, per acció dels enzims especialment, produeix a una substància; bàsicament referida a la conversió de molècules tòxiques en altres d'innòcues.

Cromatograma Figura que resulta d'una cromatografia.