



Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación

Carmen Martín Moreno¹, Aldo González Becerra² y María José Blanco Santos¹

¹CIEMAT y ²CIB-CSIC, Madrid, España

Resumen

La biodescontaminación es un proceso espontáneo o dirigido en el cual mediante procedimientos biológicos, fundamentalmente microbiológicos, se degradan o transforman los contaminantes hasta formas menos tóxicas o no tóxicas y se mitiga, como consecuencia, la contaminación ambiental. Algunos de los parámetros más importantes a tomar en consideración para la caracterización de un emplazamiento contaminado, incluyen la biodegradabilidad, la distribución del contaminante en las distintas fases, el potencial de lixiviación, la reactividad química de los contaminantes, el tipo y propiedades del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia o ausencia de sustancias inhibitorias. La utilización de la capacidad de degradación de los microorganismos es la base fundamental de los tratamientos biológicos de contaminaciones orgánicas. En consecuencia, el conocimiento de las características fisiológicas y bioquímicas así como de la ecología y genética de las especies o consorcios microbianos involucrados, es un requisito esencial, junto con el conocimiento de la naturaleza del emplazamiento y la elección de un protocolo adecuado, para lograr el objetivo de dichos tratamientos. Los hongos basidiomicetos ligninolíticos producen un conjunto de enzimas extracelulares para metabolizar la lignina que les confieren, asimismo, la capacidad de degradar un amplio abanico de contaminantes. La aplicación de estos hongos para tratar y recuperar espacios contaminados tiene un interés creciente. Esta revisión recoge diversos aspectos de las tecnologías de biorrecuperación y de los avances en el conocimiento del metabolismo ligninolítico.

Palabras clave

Biodescontaminación, Hongos ligninolíticos, Degradación de lignina, Contaminantes orgánicos persistentes

Biological treatments of contaminated soils: hydrocarbons contamination. Fungal applications

Summary

Bioremediation is a spontaneous or controlled process in which biological, mainly microbiological, methods are used to degrade or transform contaminants to non or less toxic products, reducing the environmental pollution. The most important parameters to define a contaminated site are: biodegradability, contaminant distribution, lixiviation grade, chemical reactivity of the contaminants, soil type and properties, oxygen availability and occurrence of inhibitory substances. Biological treatments of organic contaminations are based on the degradative abilities of the microorganisms. Therefore the knowledge on the physiology and ecology of the biological species or consortia involved as well as the characteristics of the polluted sites are decisive factors to select an adequate bioremediation protocol. Basidiomycetes which cause white rot decay of wood are able to degrade lignin and a variety of environmentally persistent pollutants. Thus, white rot fungi and their enzymes are thought to be useful not only in some industrial process like biopulping and biobleaching but also in bioremediation. This paper provides a review of different aspects of bioremediation technologies and recent advances on ligninolytic metabolism research.

Key words

Bioremediation, White rot fungi, Lignin degradation, Persistent pollutants

Dirección para correspondencia:

Dr. Aldo Gonzalez Becerra
Dpto. de Microbiología Molecular, CIB-CSIC
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid, España
Fax: +34 915 360 432
Correo electrónico: aldo@cib.csic.es

Cuando se empezó a actuar sobre los espacios contaminados a comienzo de los años 1980, el método solía consistir en retirar los residuos y/o suelo contaminado a un vertedero o cubrirlos con una capa impermeable (confinamiento). Más tarde, se planteó la necesidad de desarrollar alternativas para solucionar de forma más permanente y menos costosa el problema de los espacios contaminados. En consecuencia, el desarrollo y uso de tecnologías más apropiadas para el tratamiento de suelos contaminados ha avanzado mucho y en la actualidad es un tema de gran interés por sus repercusiones económicas y sociales.

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, fundamentalmente en los últimos treinta años, se ha traducido en un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos. Al mismo tiempo, se ha ido desarrollando una conciencia social de este peligro que lentamente va forzando el establecimiento de legislación para reducir la producción de residuos contaminantes y prevenir el escape de los mismos al medio circundante. Algunos accidentes que han supuesto un elevado impacto ambiental como el vertido de combustible del Exxon Valdez, la liberación de productos radiactivos tras el accidente de la central nuclear de Chernobyl, la rotura de la presa de Aznalcóllar o la reciente catástrofe ecológica producida por el vertido del petrolero Prestige frente a las costas gallegas, han puesto de manifiesto la justificada preocupación y alarma que estos temas suscitan en el conjunto de la población y lo mucho que queda por hacer para prevenir o resolver adecuadamente ese tipo de situaciones.

Entre las posibles técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un determinado espacio natural, merecen especial atención los procesos de degradación biológica ya que son útiles para muchos tipos de residuos orgánicos, son procesos naturales que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y que se pueden realizar a un bajo coste. En muchos casos, pueden llevarse a cabo en el sitio donde se ha producido la contaminación, con lo cual se elimina la necesidad de transportar materiales peligrosos. Los tratamientos de biodescontaminación se basan en la acción de microorganismos o plantas sobre los productos contaminantes.

El resultado final de un tratamiento de biodegradación depende en gran medida de la toxicidad y la concentración inicial de los contaminantes, su biodegradabilidad, las propiedades del suelo contaminado y el sistema de tratamiento seleccionado.

Los contaminantes tratados habitualmente por estos métodos son los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados y los derivados del petróleo. Cuando la contaminación incluye altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas, la eficacia del tratamiento se reduce debido a la toxicidad microbiológica de estos compuestos.

Aunque el esfuerzo social y las políticas en materia ambiental deben continuar por la vía de la presión al sector industrial para que se reduzca la producción de residuos tóxicos, la biotecnología ofrece buenas perspectivas para descontaminar los efluentes industriales. Los microorganismos pueden ser modificados para producir principalmente determinadas enzimas que contribuyan a metabolizar los compuestos producidos como consecuencia de la actividad industrial y que son tóxicos para otras formas de vida. Incluso, se pueden diseñar rutas metabólicas alternativas para la biodegradación de residuos complejos. Puesto que el tratamiento de residuos es una actividad industrial establecida, la genética y la enzimología podrían unirse a la experiencia de la ingeniería en este campo.

Como es evidente, el proceso biológico para tratar los compuestos tóxicos, debe competir con los métodos existentes en términos de economía y eficiencia. Los procesos biológicos tienen las ventajas de requerir inversiones de capital moderadas, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos.

En los últimos años, se han creado una serie de empresas para desarrollar y comercializar las tecnologías de biodegradación. La existencia de estas compañías se justifica desde el punto de vista económico por el aumento del coste de los tratamientos tradicionales y del rechazo social a los mismos, así como por el endurecimiento de las normativas en materia de residuos y medioambiente. El desarrollo futuro de las técnicas de recuperación biológica de espacios contaminados, requiere la adecuada integración de microbiología molecular e ingeniería de sistemas.

El tratamiento de recuperación biológica fue ya ensayado a gran escala, con motivo de la contaminación por petróleo ocasionada por el vertido al mar del buque petrolero Exxon Valdez. Algunos microorganismos pueden utilizar derivados del petróleo como fuente de carbono y muchos de ellos producen surfactantes, que pueden emulsionar los aceites en el agua y facilitar su eliminación. A diferencia de los surfactantes químicos, los de origen microbiológico son inocuos y biodegradables. También se han utilizado, en ocasiones, fertilizantes para incrementar la tasa de crecimiento de las poblaciones autóctonas capaces de degradar compuestos derivados del petróleo.

El uso de microorganismos no está restringido únicamente al tratamiento de compuestos orgánicos. En algunos casos, los organismos seleccionados pueden también reducir los cationes tóxicos de los metales pesados (como el selenio), a la forma elemental menos soluble y menos tóxica. Por lo tanto, el tratamiento biológico puede también aplicarse a las aguas superficiales contaminadas por metales pesados.

Técnicas para tratamiento de emplazamientos contaminados

La recuperación de un espacio contaminado puede abordarse mediante diferentes estrategias [73, 85] que, en general, se pueden agrupar en tres categorías: confinamiento, limpieza y estrategia de respuesta.

El confinamiento tiene como finalidad el aislamiento de la fuente contaminante, evitando la salida de líquidos (lixiviados), polvo o gases; es decir controlando la dispersión de la contaminación. Es el tratamiento que se aplica habitualmente en el caso de contaminaciones provocadas por los vertederos incontrolados de residuos industriales. Las medidas que incluye generalmente este tipo de actuación son: recubrimiento, revegetación, control de aguas de escorrentía superficial y control de lixiviados y aguas subterráneas.

La limpieza incluye la aplicación de una o varias tecnologías para eliminar los contaminantes del suelo. Se distinguen tres tipos de tratamiento: 1) tratamiento *in situ* del suelo contaminado, 2) excavación del emplazamiento contaminado, retirada del suelo afectado y tratamiento *ex situ* del mismo y 3) excavación, retirada y depósito en vertedero controlado. En el primer caso, la contaminación se trata en el lugar en el que se ha producido y en el segundo caso hay que proceder a una excavación del suelo contaminado o a un bombeo del agua contaminada antes de proceder a su tratamiento. En general, el tratamiento *in situ* es menos costoso y permite que se utilice el espacio durante el mismo, por lo que se aplica cada vez con más frecuencia a pesar de que habitualmente requiere largos períodos de tiempo [21,48,65,98].

La estrategia de respuesta es un tratamiento a largo plazo que incluye actuaciones diversas y modificables en función de una primera evaluación de la situación y de la evolución de la misma durante el tratamiento. Se suele elegir, cuando las aguas subterráneas ya se han contaminado. Las aguas contaminadas pueden tratarse mediante: a) extracción por bombeo seguida de tratamiento en el propio emplazamiento, por técnicas convencionales aplicables a aguas residuales industriales, b) tratamiento *in situ* mediante muros de tratamiento y c) dilución o desvío de la contaminación, mediante inyección de agua limpia utilizando sistemas de pozos.

Los métodos existentes para tratar los suelos contaminados pueden ser de naturaleza física, química o biológica y tanto unos como otros pueden aplicarse en el lugar de la contaminación o como tratamiento *ex situ*. A continuación, se incluye una clasificación de las diferentes técnicas empleadas, agrupadas según su naturaleza y la forma de aplicación.

1. Tratamientos *in situ*

- *Fisicoquímicos*:
 - a) Extracción con vapor
 - b) Lavado
 - c) Solidificación y estabilización
 - d) Separación electrocinética
- *Biológicos*:
 - a) Biorremediación
 - b) Fitorremediación

2. Tratamientos *ex situ*

- *Térmicos*:
 - a) Desorción térmica
 - b) Incineración
- *Fisicoquímicos*:
 - a) Extracción con disolventes
 - b) Lavado
 - c) Oxido-reducción
 - d) Deshalogenación química
 - e) Solidificación y estabilización
- *Biológicos*:
 - a) Laboreo agrícola
 - b) Biopilas
 - c) Biodegradación en reactor

El tratamiento biológico mediante plantas (fitodescontaminación) implica el uso de vegetales superiores para retirar, contener, acumular o degradar los contaminantes ambientales del suelo, aguas subterráneas, aguas superficiales, sedimentos y aire. Esta definición se aplica a todos los procesos biológicos, químicos y físicos sobre los que pueden influir las plantas (incluyendo la rizosfera con hongos) y que ayudan en la limpieza de espacios contaminados. Las plantas pueden ser usadas en la descontaminación aprovechando su capacidad de mineralizar determinados compuestos tóxicos o de acumular y concentrar metales pesados y otros compuestos inorgánicos del suelo [41,58,80].

El tratamiento microbiológico de espacios contaminados, que es el que se va a abordar en mayor profundidad en este trabajo, se basa en la capacidad de diversos microorganismos, ya sean levaduras, hongos o bacterias para romper o degradar sustancias peligrosas convirtiéndolas en productos menos tóxicos o inocuos.

Algunos microorganismos pueden metabolizar productos como combustibles o disolventes, que constituyen un riesgo para la salud humana y para los ecosistemas en los que son vertidos. Una vez que los contaminantes son degradados, la población microbiana decrece, al consumirse lo que constituía su fuente nutritiva.

Los microorganismos deben tener un estado vigoroso, para que se produzca su crecimiento sobre los productos contaminantes. El objetivo de las técnicas de recuperación biológica, es la creación de las condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y provocar la máxima detoxificación. La tecnología específica empleada en cada caso, depende del tipo de microorganismos de que se trate, de las condiciones del espacio contaminado y de la naturaleza y cantidad de contaminante o contaminantes. Distintos microorganismos degradan diferentes tipos de compuestos y sobreviven en diferentes condiciones.

Los microorganismos denominados endógenos, son aquellos que se encuentran formando parte del ecosistema que se pretende descontaminar. Para estimular el crecimiento de estos microorganismos y forzar la degradación de los contaminantes, puede que sea necesario establecer unas condiciones de temperatura, oxigenación y contenido de nutrientes determinadas.

Cuando en el ecosistema no esté presente la actividad biológica que se requiere para degradar la contaminación producida, pueden incorporarse microorganismos de otra procedencia cuya eficacia haya sido probada anteriormente. En este caso, se habla de microorganismos exógenos. Cuando esto sucede, hay que asegurarse de que las condiciones de este nuevo emplazamiento permitirán el desarrollo de la microflora incorporada.

El tratamiento biológico del entorno contaminado, puede tener lugar en condiciones aerobias o anaerobias. En ambos casos, los productos intermedios que se forman como consecuencia del metabolismo microbiano, pueden ser menos, igual o más contaminantes que los originales.

Antes de profundizar en las técnicas biológicas de las que se dispone en la actualidad para proceder a la limpieza de un espacio contaminado por algún compuesto orgánico recalcitrante, conviene hacer una breve referencia a lo que se denomina proceso de atenuación natural y que engloba las diversas reacciones naturales que tienen lugar en un espacio, concretamente un suelo, después de producida la contaminación.

Procesos de atenuación natural

La atenuación natural se puede describir como el conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos, que espontáneamente ocurren en un espacio determinado, con posterioridad a la aparición de la contaminación en el mismo. En condiciones favorables, la atenuación natural reduce, sin la intervención humana, la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración de contaminantes en suelo o agua subterránea [104]. Este proceso incluye diversos mecanismos tales como dispersión, dilución adsorción, volatilización, estabilización y transformación o destrucción de contaminantes por vía química o biológica. En general, se puede considerar que en un proceso de atenuación natural, intervienen o pueden intervenir los cinco grupos de mecanismos siguientes:

1. *Biodegradación*.
2. *Transformación química* (por ejemplo, hidrólisis y deshalogenación). La tasa de transformación química depende de diferentes variables tales como pH, temperatura y naturaleza del contaminante.
3. *Estabilización*. Los contaminantes quedan químicamente ligados por un agente estabilizante (por ejemplo, arcilla y materiales húmicos) y se dificulta o impide su migración.

4. **Volatilización.** Puede contribuir al proceso de atenuación natural mediante transferencia de VOC (compuestos orgánicos volátiles) desde el agua subterránea hacia la zona de vadosa o la atmósfera pero es comparativamente un componente menor de la atenuación natural.
5. **Dispersión y dilución.** Asumiendo que la fuente de contaminación cesa, a medida que la pluma de contaminante se mueve vertical y lateralmente desde el punto inicial, se dispersa la contaminación y disminuye la concentración del contaminante.

La atenuación natural es considerada, en algunos casos, una alternativa aceptable en comparación con otros métodos más activos, siempre y cuando se puedan cumplir unos objetivos de descontaminación en un intervalo de tiempo aceptable. En la figura 1, se representa, en esquema, un proceso natural de atenuación.



Figura 1. Procesos de atenuación natural de una contaminación por hidrocarburos.

Uno de los componentes más importantes de la atenuación natural es la biodegradación. Muchos de las fracciones de los hidrocarburos del petróleo, más significativas desde el punto de vista ambiental, tales como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y algunos PAH (hidrocarburos policíclicos aromáticos) pueden ser degradadas en condiciones ambientales adecuadas. Sin embargo, otros PAH, el MTBE (metil, terbutil éter, un aditivo de la gasolina) y diversos componentes de los hidrocarburos del petróleo no son fácilmente biodegradables. En términos generales, los hidrocarburos del petróleo que son más móviles en el ambiente (excepto el MTBE), son también los más fácilmente biodegradados. Una vez que los hidrocarburos más móviles son degradados, los hidrocarburos residuales pueden suponer también un alto riesgo en los alrededores del área en los que permanecen.

La capacidad real del fenómeno de atenuación natural para promover la descontaminación de un emplazamiento determinado, depende de que uno o más de los mecanismos anteriormente citados puedan funcionar a la velocidad suficiente como para evitar que la pluma de contaminación alcance un receptor. Por lo tanto, hay que realizar un estudio previo para identificar los siguientes aspectos:

1. Las características del suelo, tales como tipo, conductividad hidráulica y contenido orgánico.
2. Características de las aguas subterráneas, tales como dirección, gradiente y velocidad de flujo, temperatura, pH y oxígeno disuelto, dentro y fuera de la pluma.
3. Grado de contaminación vertical y horizontal en el suelo y el agua, comportamiento histórico de la pluma y capacidad de atenuación de la pluma en las condiciones del emplazamiento.
4. Una revisión detallada de receptores y vías de migración, en el área geográfica del emplazamiento.

Sin embargo, en muchos casos, la atenuación natural no va a producirse con la celeridad y eficacia suficientes para evitar los riesgos, para la salud humana o el ambiente, derivados de la existencia de un espacio contaminado y es necesario realizar actuaciones de saneamiento o recuperación.

Tratamiento biológico *in situ* de suelos contaminados

El tratamiento *in situ* no requiere excavar y retirar el suelo contaminado, por lo cual provoca menos liberación de polvo y contaminantes y permite descontaminar mayor volumen de suelo por tratamiento que las técnicas *ex situ*. En este caso, el propio suelo funciona como un reactor biológico. Tiene otros inconvenientes como mayor lentitud, dificultad de mantener las condiciones y dependencia del tipo de suelos, que deben ser permeables si se quiere asegurar un buen rendimiento del proceso.

En este tipo de tratamiento se persigue la adecuada oxigenación y aporte de nutrientes a los microorganismos del suelo. Existen dos métodos para incorporar el oxígeno al suelo. Uno es la inyección directa de aire en el suelo que está por encima de la capa freática y el otro consiste en suministrar oxígeno en forma líquida como peróxido de hidrógeno. A veces, estos tratamientos no dan los resultados esperados, sobre todo si se trata de terrenos arcillosos o subsuelos muy estratificados, ya que el oxígeno no puede difundirse uniformemente en toda el área de tratamiento. A menudo, las técnicas de tratamiento *in situ* requieren años para alcanzar los objetivos de descontaminación fijados, dependiendo fundamentalmente de la biodegradabilidad de los contaminantes de que se trate.

Cuando lo que se bombea es aire, se hace a través de unos pozos perforados en la zona contaminada. El número, localización y profundidad de los pozos, depende de los factores geológicos y de ingeniería del proceso. A la vez que el aire, también deben bombearse al suelo nutrientes como nitrógeno y fósforo.

En el caso de adición de peróxido de hidrógeno, hay que tener en cuenta que se trata de un compuesto químico, que puede difundirse a las aguas subterráneas y contaminar acuíferos. Por lo tanto, este sistema sólo se utiliza si el agua subterránea está ya contaminada. La inyección del peróxido puede hacerse a través de tuberías y difusores o de pozos en el caso de que la contaminación del suelo sea profunda.

Tratamiento biológico de aguas subterráneas

Con este tratamiento se pretende aumentar la velocidad del proceso de degradación natural, que tiene lugar en el suelo embebido de agua que se encuentra por debajo de la capa freática. En los emplazamientos en los que suelo y agua subterránea están contaminados, esta técnica

puede servir para el tratamiento de ambos. En general, el dispositivo para tratar aguas subterráneas consiste en un pozo para extraer el agua contaminada, un sistema superficial de tratamiento en el que se añaden al agua oxígeno y nutrientes y otros pozos adicionales de reinyección del agua tratada para que los microorganismos lleven a cabo la actividad degradadora de los contaminantes.

Una de las principales limitaciones de este tipo de operaciones, es que las diferencias en la estratificación y densidad del subsuelo pueden ocasionar que el agua acondicionada siga, al reinyectarse, vías de flujo preferentes. En este caso, el agua pretratada no alcanzaría algunas zonas contaminadas.

Otra forma de tratamiento *in situ* de aguas subterráneas es la difusión de aire que consiste en bombear aire en dichas aguas para ayudar a extraer contaminantes en combinación con técnicas de extracción con vapor.

Tratamiento biológico *ex situ* de suelos contaminados

Las técnicas *ex situ* pueden ser más rápidas, más fáciles de controlar y aplicables a un mayor abanico de contaminantes y suelos que las técnicas *in situ*. Sin embargo, requieren excavación y acondicionamiento del suelo contaminado antes e incluso, a veces, después de la fase de tratamiento biológico. Incluyen tanto técnicas de tratamiento en fase sólida como en forma de lodos.

1. *Tratamientos de lodos.* En el caso de que el tratamiento se realice en forma de lodos, el suelo contaminado se combina con agua y otros aditivos en un biorreactor. Se controlan las condiciones de tratamiento y se añaden nutrientes y oxígeno. Cuando finaliza el tratamiento, se separa el agua de los sólidos que son retornados al emplazamiento o sometidos a un tratamiento posterior si contienen todavía algún tipo de contaminante. Este proceso puede ser relativamente rápido si se compara con otros tratamientos biológicos, sobre todo, cuando se trata de terrenos arcillosos y es especialmente útil cuando se requiere un tratamiento rápido.
2. *Tratamientos en fase sólida.* Para que se pueda realizar un tratamiento en fase sólida, se requiere que el área de aplicación disponga de sistemas colectores adecuados para evitar cualquier contaminación en caso de escapes. La humedad, el calor, los nutrientes y el oxígeno se controlan para aumentar el rendimiento del proceso de biodegradación. Los sistemas de fase sólida son relativamente fáciles de mantener y operar, requieren grandes espacios y en general son de más larga duración que los tratamientos en forma de lodos.

Este tipo de tratamientos incluye las modalidades de laboreo agrícola, tratamiento en pilas y técnicas de compostaje. En el primer caso, el suelo se excava y se extiende sobre una superficie dotada de un sistema para recoger los lixiviados contaminados. El suelo se remueve periódicamente para favorecer su aireación. La humedad y los nutrientes se controlan, para optimizar el rendimiento del proceso y evitar las pérdidas por volatilización de los contaminantes.

En el caso de los tratamientos en pilas, el suelo es distribuido en montones de varios metros de altura, colocándose sobre un sistema de distribución de aire que inyecta aire en cada uno de los montones mediante una bomba de vacío. Se controlan los niveles de humedad y

nutrientes. Las pilas pueden también ubicarse en espacios cerrados, para controlar la emisión de volátiles ya que éstos forman parte del flujo de aire que sale de la pila.

En el tratamiento de compostaje, el residuo biodegradable se mezcla con otros materiales, generalmente, de tipo lignocelulósico (paja de cereales) para favorecer la difusión del oxígeno y la humedad y optimizar el metabolismo microbiano. Los métodos de compostaje que se pueden aplicar, son de tres tipos: compostaje en pilas estáticas (la aireación de las pilas se hace mediante difusores o bombas de vacío), compostaje en reactores con agitación mecánica (el compost es mezclado y aireado en un reactor) y compostaje en grandes pilas que periódicamente se mezclan utilizando tractores o equipos similares.

Biodisponibilidad de los contaminantes e interacciones con la matriz del suelo

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta, con relación a la capacidad de biodegradar contaminantes orgánicos hidrofóbicos en el suelo, es el de la biodisponibilidad [76,90,94].

La biodisponibilidad es un concepto difícil de definir ya que en cada compartimento ambiental (agua, sedimentos, suelo o aire) juega un papel diferente. Por ejemplo, la disponibilidad de un compuesto orgánico en agua se reduce, temporalmente, cuando se une a partículas suspendidas o a sedimentos; la biodisponibilidad de un metal en un sedimento o en un suelo puede aumentar cuando el pH disminuye; en el aire, los hidrocarburos aromáticos policíclicos que están ligados o incluso incorporados en partículas pueden resultar inaccesibles a las superficies respiratorias (por ejemplo pulmones de los mamíferos), al contrario que los hidrocarburos gaseosos. El concepto de biodisponibilidad engloba pues diferentes factores, físicos, químicos y biológicos del entorno y es diferente para diferentes organismos.

Cuando se hace referencia a la biodisponibilidad en suelo, hay que tener en cuenta las características físicas, químicas y biológicas de este compartimento. La textura, granulometría y la composición del suelo determinan sus propiedades físicas y químicas como contenido de agua, oxígeno, sales, arcilla, minerales, materia orgánica y pH. Cada una de estas propiedades puede variar espacialmente pero también temporalmente. Cuando hay un exceso de lluvia, el contenido en agua aumentará y como resultado la concentración de sales disminuirá, mientras que el pH puede aumentar, disminuir o permanecer inalterado. En la época de caída de las hojas, se forma una capa de materia orgánica en la superficie del suelo, que comienza a ser degradada por los microorganismos, alterándose estacionalmente el contenido y la composición de la materia orgánica.

En el capítulo de propiedades biológicas, se incluye la variedad de microorganismos que viven en el suelo, tanto en superficie como en el interior de la matriz y que agrupa bacterias, algas, hongos, actinomicetos, nemátodos, oligoquetos, insectos, pequeños mamíferos, arbustos y árboles.

En general, se puede decir que la evolución y comportamiento de los compuestos orgánicos en el suelo, vienen determinados por los siguientes factores: características del suelo, propiedades de los compuestos y factores ambientales como temperatura y precipitación. La combinación de todos ellos puede hacer que el compuesto siga diferentes vías, como lixiviación a la fase acuosa, biodegradación, volatilización al aire, unión a las fases sólidas del suelo y transferencia a organismos.

Los términos libre o ligado, aplicados a los residuos orgánicos que contaminan un emplazamiento determinado, establecen la diferencia entre la porción del compuesto que puede ser extraída del suelo –normalmente por un solvente orgánico– sin alterar la estructura química del compuesto y la porción no extraíble de dicho compuesto. Sin embargo, esta distinción no está siempre clara ya que existe una gran diversidad de métodos que han sido empleados para determinar la distribución de compuestos orgánicos en el suelo y esto influye en la proporción de residuo extraíble y no extraíble. A continuación, se incluyen las definiciones propuestas por Weller et al. [106] para intentar sistematizar los distintos tipos de interacciones de los compuestos orgánicos en la matriz del suelo:

1. *Residuo ligado covalentemente*. Es el compuesto original o un metabolito principal unido covalentemente al sustrato.
2. *Residuos solubles ligados covalentemente*. Son aquellos que se extraen conjuntamente con la matriz por un procedimiento específico que respeta el enlace covalente.
3. *Residuos adsorbidos*. Son compuestos originales o metabolitos principales que están ligados a la matriz por interacciones no covalentes reversibles.
4. *Residuos inmovilizados (atrapados)*. Son compuestos originales o metabolitos principales que se retienen con la matriz por efectos estéricos y que se comportan como residuos ligados a no ser que se modifique la estructura de la matriz.

En muchos casos, cuando se aplica el término residuo ligado se hace referencia a los ligados covalentemente, a los adsorbidos y a los atrapados.

Una vez que el contaminante orgánico entra en contacto con el suelo, puede experimentar diversas interacciones. Incluso la fracción extraíble puede resultar adsorbida en la fase sólida del suelo y, en consecuencia, presentar una disminución de su biodisponibilidad y por lo tanto del potencial de biodegradación.

Existen evidencias de que los residuos ligados pueden removilizarse en solución o sufrir alteraciones debido a interacciones microbiológicas o reacciones químicas. Los mecanismos de secuestro de compuestos, tales como la difusión intraorgánica (IOMD) y la difusión intraparticular (IPD), retrasan la liberación de los compuestos adsorbidos. La materia orgánica está sujeta a alteraciones por factores ambientales así como por procesos químicos y bióticos. Es decir, que los residuos libres pueden mostrar, en algún grado, propiedades tradicionalmente atribuibles a los xenobióticos ligados. Hay que tener en cuenta por lo tanto, que al hablar de capacidad de extracción de un compuesto hay que especificar claramente la naturaleza del extractante y las condiciones experimentales en las que se realiza la extracción.

Proceso de envejecimiento de la contaminación

Se han realizado numerosos estudios para investigar el comportamiento de los compuestos orgánicos persistentes en el suelo. El envejecimiento de los compuestos en el suelo depende de diversos factores tales como, cantidad y naturaleza de la materia orgánica, constituyentes inorgánicos del suelo, fundamentalmente estructura y tamaño de poro, microflora del suelo, concentración de contaminante, procesos de adsorción y atrapamiento en los microporos del suelo o en los complejos húmicos de la materia orgánica. Se ha comprobado que el humedeci-

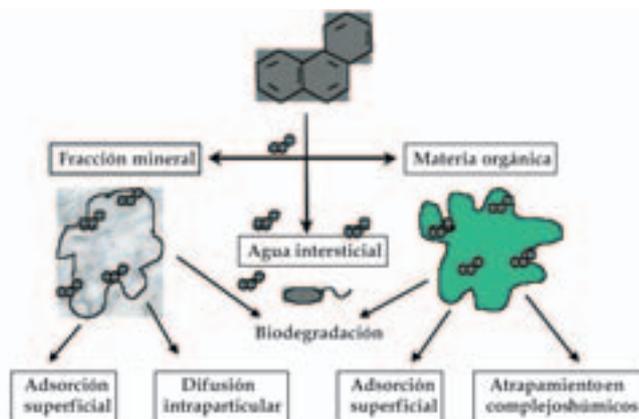


Figura 2. Esquema de los procesos que intervienen en el envejecimiento de los contaminantes orgánicos en el suelo.

miento y el secado sucesivo del suelo, también contribuyen al proceso de envejecimiento. En la figura 2, se recoge un esquema de los posibles procesos que intervienen en el envejecimiento de los contaminantes en un suelo.

El resultado final del proceso de envejecimiento es la movilización de compuestos desde los compartimentos más accesibles del suelo, a los menos accesibles o a los inaccesibles, con lo cual se produce una reducción en la capacidad de extracción de dichos compuestos. Se admite, en general, que transcurrido un cierto tiempo desde la aparición de la contaminación, se distinguen dos grupos de asociación contaminante/suelo. El primero corresponde a la fracción de compuesto que puede ser rápidamente desadsorbida y el segundo a la fracción que se desadsorbe más lentamente. Se ha propuesto que la transferencia de masa de contaminante y en particular el tamaño de la fracción fácilmente desadsorbible, gobiernan la biodisponibilidad del mismo. La disminución de la biodisponibilidad con el paso del tiempo, que permite la interacción prolongada entre el contaminante y el suelo, ha sido observada tanto en el caso de los microorganismos como de otros organismos superiores.

El conocimiento de las interacciones entre los compuestos orgánicos y los suelos o los sedimentos así como de los mecanismos que contribuyen a la formación de residuos ligados, es todavía limitado. Mientras que se han realizado numerosos estudios sobre la evolución a corto plazo de los procesos de adsorción y desorción entre diversos compuestos y tipos de suelo, hay pocos estudios sobre la formación de compuestos ligados. Esta carencia ha limitado, a su vez, el conocimiento del papel que juegan los residuos ligados, en los mecanismos de detoxificación y reducción de la biodisponibilidad así como del comportamiento a largo plazo de los residuos ligados en suelos y sedimentos.

La mayoría de los estudios sobre interacciones entre los residuos y el ecosistema del suelo, se han llevado a cabo en ensayos de laboratorio con microcosmos, que han permitido determinar la influencia de factores específicos en la formación de residuos ligados. Sin embargo, se necesitaría disponer de resultados obtenidos a partir de experimentación en campo utilizando lisímetros expuestos a las condiciones ambientales y climáticas reales. Esto permitiría profundizar en el conocimiento de las interacciones entre los residuos orgánicos y la matriz del suelo, esencial para el desarrollo de criterios de calidad, establecimiento de límites regulatorios y predicción de riesgo y asesoramiento sobre posibles tratamientos para contaminaciones con compuestos orgánicos.

Valoración de la biodisponibilidad

La biodisponibilidad de un compuesto orgánico puede ser evaluada con dos perspectivas distintas, química o biológica.

Aspectos biológicos de la valoración de la biodisponibilidad

Para que la biodegradación tenga lugar deben cumplirse dos requisitos:

1. El compuesto debe ser accesible al organismo u organismos de que se trate.
2. El compuesto como tal debe ser biodegradable.

Obviamente, tanto la biodisponibilidad como la biodegradabilidad pueden ser valoradas por métodos biológicos y existe un buen número de ensayos estándar utilizando microorganismos. Estos métodos incluyen: mineralización de análogos marcados con ^{14}C hasta $^{14}\text{CO}_2$ (biodegradación), determinación del efecto del contaminante sobre la demanda biológica de oxígeno (biodisponibilidad) o sobre las variaciones de la remoción de carbono orgánico disuelto (biodisponibilidad).

Una técnica que se está introduciendo es la de la bioluminiscencia que evalúa la biodisponibilidad, midiendo el impacto de los contaminantes sobre la actividad de organismos luminiscentes. Puesto que la luminiscencia está ligada al funcionamiento de la cadena de transporte electrónico del organismo en cuestión, es una medida de la actividad metabólica del mismo. Por tanto, una disminución del metabolismo por la presencia de un contaminante tóxico, se traduce en una disminución de la bioluminiscencia. El desarrollo de microorganismos con marcadores de bioluminiscencia para determinar la toxicidad en espacios contaminados, presenta ventajas sobre otros ensayos con organismos superiores, ya que es una técnica rápida y poco costosa que permite obtener buenos resultados con metales pesados y contaminantes orgánicos. Sin embargo, con algunos compuestos considerados contaminantes prioritarios como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), los resultados obtenidos con esta técnica, indican una menor toxicidad que la evaluada por el ensayo de *Microtox*[®].

Esta misma técnica, también permite construir marcadores de bioluminiscencia específicos para contaminantes concretos. Por ejemplo *Pseudomonas fluorescens* (HK44) que contiene el plásmido pUTK21 para catabolismo de naftaleno, produce luz en presencia de naftaleno y ácido salicílico. Aunque los ensayos con sensores de bioluminiscencia son muy útiles para la determinación de toxicidad en sistemas acuáticos, existen grandes limitaciones para su utilización en suelos contaminados. Algunos autores han llevado a cabo los estudios de bioluminiscencia en extractos de suelos contaminados, pero esto presenta problemas con muchos contaminantes orgánicos ya que debido a su hidrofobicidad, tienen que extraerse con solventes orgánicos que, por una lado tienen efectos negativos sobre los propios biosensores y por otro, no reflejan exactamente la biodisponibilidad del compuesto.

Aspectos químicos de la valoración de la biodisponibilidad

Tradicionalmente, las técnicas de extracción en suelos han tenido como objeto la determinación de la concentración de compuestos totales y, por tanto, se han aplicado métodos enérgicos como la extracción en Soxhlet. Sin embargo, a la luz del conocimiento sobre disponibilidad de los compuestos y su envejecimiento en el suelo, estos métodos no son los adecuados para evaluar la cantidad de un compuesto que puede calificarse como biodisponible.

Más recientemente, se han investigado técnicas menos exhaustivas, con objeto de determinar cuales reproducen más fielmente la fracción biodisponible. Hay que señalar, en este punto, que puesto que el concepto de biodisponibilidad es dependiente, no sólo del tipo de organismo sino, incluso, de la especie, es imposible desarrollar un método químico que refleje exactamente este concepto.

Como conclusión, se puede decir que a la hora de valorar la biodisponibilidad de un contaminante, no sólo hay que tener en cuenta la especificidad de los organismos, sino, también, el objetivo concreto de la valoración, que puede ser tanto la predicción del potencial de descontaminación biológica en un determinado emplazamiento contaminado, como la determinación de riesgo toxicológico o la evaluación de la posibilidad de bioacumulación.

Ensayos para evaluar la efectividad del tratamiento

Estos ensayos son críticos para llevar a cabo un tratamiento biológico de descontaminación. Es muy difícil que dos emplazamientos contaminados posean idénticas características y por lo tanto el tratamiento tiene que adaptarse a cada caso concreto. Existen muchas variables que influyen en la eficiencia del proceso biológico y que están relacionadas con las condiciones ambientales, el tipo de contaminantes y el medio contaminado. Por ello, es recomendable tener un protocolo que ayude a decidir sobre la posibilidad de aplicar un tratamiento biológico y las condiciones en las que debe aplicarse.

Hasta la fecha, la mayoría de las tecnologías de tratamiento biológico se han aplicado para casos de contaminantes naturales orgánicos. Los contaminantes que son biodegradables bajo condiciones naturales incluyen: 1) hidrocarburos del petróleo como benceno, tolueno, etileno y xileno (BTEX) y gasolina, 2) creosota, 3) compuestos orgánicos volátiles (VOC) como tricloroetileno y percloroetileno (TCE y PCE), 4) pesticidas, 5) solventes orgánicos y 6) conservantes para madera.

Los estudios piloto indican la eficiencia del tratamiento microbiano de nitrotoluenos en suelos contaminados con explosivos. Muchos de los contaminantes más persistentes en el ambiente como bifenilos policlorados (PCB) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) son resistentes al tratamiento microbiológico por diferentes causas, entre las que se pueden citar: a) toxicidad de los compuestos para los microorganismos, b) utilización preferente, por los microorganismos, de otros compuestos como fuente de energía, c) incapacidad genética de los microorganismos para usar el contaminante como fuente de carbono y energía y d) condiciones ambientales desfavorables para la propagación de la estirpe apropiada de microorganismos.

La alteración de las condiciones ambientales estimula, frecuentemente, el desarrollo de las poblaciones microbianas adecuadas para degradar los contaminantes orgánicos de que se trate. Estos cambios pueden incluir: ajuste de la concentración del compuesto, pH, concentración de oxígeno o temperatura así como la adición de nutrientes o microorganismos aclimatados al uso del contaminante en cuestión.

Los PCB y los PAH pueden ser metabolizados o transformados parcialmente como segundo sustrato. Aunque pueden no ser adecuados para permitir el crecimiento de los microorganismos, pueden ser degradados por un proceso de co-metabolismo, que facilita que los microbios crezcan sobre un compuesto produciendo al mismo tiempo enzimas que transformen otras moléculas que, sin embargo, esos organismos no podrían utilizar directamente para

crecer. Una gran variedad de reacciones enzimáticas tales como oxidaciones, hidrólisis, deshalogenaciones reductoras, etc. catalizan los procesos co-metabólicos.

Aunque el tratamiento biológico no puede degradar contaminantes inorgánicos (metales y radionúclidos), puede ser usado para cambiar la valencia de los mismos y causar adsorción, incorporación, acumulación y concentración de dichos compuestos, tanto en microorganismos como en organismos superiores. En algunos casos, las especies químicas modificadas pueden ser más fácilmente extraíbles del sustrato geológico en el que están incorporadas, debido al aumento de su solubilidad con respecto a las especies originales. En otros casos, puede ocurrir lo contrario y el contaminante puede ser inmovilizado *in situ*. Estas técnicas, aunque están todavía en fase experimental, se consideran prometedoras para la estabilización o recuperación de compuestos inorgánicos del suelo.

Con respecto al emplazamiento, también existen condiciones ambientales que puede retardar o incluso detener el proceso de biodegradación. Entre ellas:

1. Una concentración de contaminante demasiado elevada o la coexistencia de otros materiales tóxicos para los microorganismos.
2. Existencia de gradientes de concentración demasiado rápidos para permitir la aclimatación de los microorganismos al contaminante o contaminantes.
3. Número o tipo de microorganismos inadecuado para la biodegradación o bien capacidad inadecuada para la colonización del subsuelo contaminado.
4. Condiciones demasiado ácidas o demasiado alcalinas.
5. Falta de nutrientes adecuados (tales como nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, o elementos traza) que pueden ser necesarios para utilizar el contaminante como fuente de energía.
6. La transferencia de contaminantes, desde las bolsas de suelo saturadas por los hidrocarburos, puede estar limitada por la baja permeabilidad o existencia de estratos y como consecuencia dificultar la eficiencia de la descontaminación.
7. Condiciones de humedad desfavorables (por exceso o por defecto).
8. Escasez de oxígeno, nitrato o sulfato, necesarios para la utilización de los contaminantes como fuente de energía.

Para hacer una predicción de la viabilidad del tratamiento biológico de un emplazamiento contaminado, deberían identificarse las siguientes variables:

- a) Biodegradabilidad de los contaminantes.
- b) Distribución de los contaminantes en suelo, agua, NAPL (fase líquida no acuosa de derivados del petróleo, en el caso de contaminaciones por hidrocarburos) y fase de vapor.
- c) El potencial de lixiviación de los contaminantes (solubilidad en agua y coeficiente de adsorción al suelo).
- d) Reactividad química de los contaminantes (tendencia de reacciones no biológicas como hidrólisis, oxidación y polimerización).
- e) Extensión y profundidad de la contaminación.
- f) Tipo y propiedades del suelo (contenido de materia orgánica, contenido mineral, pH, porosidad, permeabilidad, densidad, humedad, nivel de nutrientes, capacidad de retención de agua, etc.).

- g) Competencia biológica por oxígeno (potencial *redox* y niveles de oxígeno ambiental).
- h) Presencia o ausencia de sustancias tóxicas para los microorganismos.
- i) Capacidad de los microorganismos del suelo para degradar los contaminantes.

Se requiere un conocimiento de la cinética de biodegradación en el suelo, para saber la eficacia que pueden tener las técnicas de tratamiento biológico *in situ* o *ex situ*. Para ello, los estudios previos de laboratorio pueden ayudar a determinar el grado probable de degradación por métodos biológicos, así como a diseñar los criterios de tratamiento. Tradicionalmente, las cinéticas de biodegradación *in situ* se han determinado mediante la aplicación de estudios con microcosmos que son difíciles de adaptar a modelos matemáticos.

La biodegradación en el suelo es un complejísimo proceso, que integra difusión de contaminantes en la matriz porosa del suelo, adsorción a la superficie del suelo y biodegradación en las biopelículas que se configuran en la superficie de las partículas de suelo y los grandes poros, así como en la fase acuosa. Cuando se emplean reactores, en los que el suelo es tratado en forma de lodos, la biodegradación de contaminantes ocurre tanto en la fase líquida, debido a los microorganismos liberados de la matriz del suelo, como en la biopelícula inmovilizada en las partículas del mismo. Cuando se emplea un sistema de suelo compactado, la biodegradación que ocurre en la fase acuosa, tanto asociada como libre, es producida por los microorganismos inmovilizados en las partículas, siendo muy pequeña la contribución de microorganismos en suspensión, debido al bajo contenido de agua.

Una forma de estudiar la capacidad de degradar biológicamente un cierto contaminante en un suelo determinado, es evaluar –utilizando técnicas de respirometría– la demanda biológica de oxígeno de ese suelo a largo plazo. Se trata de conocer la tasa de respiración que tiene lugar en el suelo contaminado y que puede servir para determinar la posibilidad de éxito al estimular el crecimiento biológico en ese medio.

El seguimiento del crecimiento microbiano en una mezcla contaminada, puede hacerse con técnicas más específicas que las de seguimiento de la actividad respiratoria. Se pueden usar, por ejemplo, marcadores radiactivos en las moléculas contaminantes que incrementan significativamente la sensibilidad de los estudios de biodegradación, permitiendo seguir la evolución metabólica de los compuestos marcados con menores interferencias analíticas. Este hecho es importante, si se tiene en cuenta la complejidad del entorno biótico-abiótico en el que tiene que llevarse a cabo el seguimiento. Estos métodos permiten, asimismo, analizar concentraciones de productos tanto iniciales como intermedios y finales que están por debajo de los límites de detección de otros métodos analíticos.

En general, puede decirse que el desarrollo de los modelos de biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos es difícil, por la existencia de una serie de factores complejos, entre los que pueden incluirse los siguientes:

1. La presencia de barreras que dificultan la difusión de contaminantes, oxígeno y nutrientes, en los macroporos y microporos del suelo.
2. El efecto de la adsorción química a las arcillas y a los constituyentes húmicos del suelo.
3. La presencia de otros materiales orgánicos biodegradables en el suelo.
4. Los cambios en el crecimiento microbiano, ocasionados por parasitismos de protozoos.

5. El efecto de la solubilidad del compuesto en la fase acuosa.
6. La formación de biopelículas en la superficie del suelo, relacionadas con la microflora suspendida.
7. La existencia de microflora no adaptada a las condiciones creadas por la contaminación.

La mayoría de los modelos cinéticos, no tienen en consideración la adsorción de los contaminantes a las partículas del suelo, que se ha demostrado que es un factor de gran importancia en el transporte de contaminantes. Desde el punto de vista cinético, la adsorción es un proceso en dos fases, con una etapa inicial rápida (horas) seguida de una fase más lenta (días), controlado por la difusión hacia puntos de adsorción interna.

El suelo tiene diferentes tamaños de poro, correspondiendo alrededor del 50% del volumen total de poros, a los de radio menor de 1 μm . La mayoría de las bacterias del suelo tienen un tamaño comprendido entre 0,5 y 0,8 μm y por lo tanto, una porción significativa del suelo es inaccesible a la mayoría de la población microbiana.

El papel de los agregados del suelo y el efecto de sus características en el tratamiento biológico de los suelos, ha sido analizado con modelos analíticos que han mostrado los efectos del tamaño de los agregados, del coeficiente de reparto y de la concentración inicial de contaminantes, en la duración y los mecanismos de descontaminación. Se ha observado que las tasas de difusión de contaminante y oxígeno y las cinéticas de biodegradación controlan los mecanismos de tratamiento biológico en los agregados.

El éxito de un proceso biológico de descontaminación radica en la degradación de los contaminantes orgánicos y en la reducción de la toxicidad y el potencial de migración de los compuestos peligrosos en el suelo. Los estudios de laboratorio realizados usando compuestos fenólicos han indicado que la pérdida de dichos compuestos orgánicos se puede describir satisfactoriamente mediante cinéticas de primer orden y que la disminución de los contaminantes en la fracción soluble en agua es más rápida que la disminución de los mismos compuestos en el suelo. Además, la toxicidad de la fracción soluble en agua disminuye con la concentración y no se produce un aumento de la movilización de los compuestos químicos estudiados durante el proceso de degradación.

Algunos trabajos sobre las cinéticas de biodegradación en el suelo han concluido que los modelos habitualmente aplicados se basan en estudios con poblaciones microbianas constituidas por un solo microorganismo o con enzimas aisladas y que es muy improbable que los modelos basados en estos estudios tan específicos y distantes de la complejidad biológica que caracteriza un suelo sean capaces de explicar lo que ocurre en un proceso real de biodegradación con multitud de microorganismos, contaminaciones complejas y suelos y condiciones ambientales variadas.

Basándose en estas consideraciones previas se han desarrollado algunos protocolos como el elaborado por Tabak *et al.* [97] que integra varios niveles: biodisponibilidad (equilibrio de adsorción-desorción y cinéticas), limitaciones para la difusión de oxígeno y contaminantes y cinéticas de biodegradación de contaminantes orgánicos en sistemas compactos de suelos. En su modelo, utilizan microcosmos del suelo y estudios de respirometría en tres tipos de reactores: biorreactores de suelos en forma de lodos, en capa fina y en columna.

Desde el punto de vista microbiológico es conveniente hacer una serie de consideraciones que pueden aplicarse al tratamiento de cualquier compuesto xenobiótico:

1. En la mayoría de los sistemas naturales están presentes muchos microorganismos diferentes y la degradación de un compuesto xenobiótico concreto depende de la actividad de varios microorganismos aunque las reacciones secuenciales se deban a un solo miembro del consorcio.
2. Es infrecuente que en los ecosistemas naturales se encuentre presente un solo sustrato. Por lo tanto es importante examinar como puede verse afectada la regulación de las vías de degradación por la presencia de diferentes tipos y concentraciones de productos que pueden inducir o inhibir, dependiendo del caso concreto, las vías metabólicas necesarias para la degradación del contaminante o contaminantes en cuestión.
3. En ausencia de oxígeno molecular pueden intervenir otros aceptores de electrones que incluyen nitrato, sulfato, carbonato, clorato, Fe (III), Cr (VI) y U (VI). En este sentido, conviene destacar la gran versatilidad metabólica de las bacterias reductoras de sulfato.
4. Un aspecto importante a tener en cuenta, es el del envejecimiento de la contaminación en el suelo. Este término, del que ya hemos hecho algunas consideraciones previas, engloba un conjunto de mecanismos complejos que no se conocen en profundidad, mediante los cuales los compuestos orgánicos se van asociando a los componentes poliméricos de la matriz del suelo, con el resultado final de que disminuye, en mayor o menor grado, la disponibilidad de dichos compuestos para la acción degradadora de los microorganismos. Esto implica, que aunque exista una capacidad teórica de biodegradación de un compuesto determinado, éste puede resultar en la práctica inaccesible al microorganismo. Un punto crítico es el grado de reversibilidad de estos complejos, puesto que una lenta liberación por lixiviación puede introducir el compuesto contaminante en la fase acuosa, provocando la posterior contaminación de las aguas subterráneas.
5. Tanto en los sistemas acuáticos como terrestres, los microorganismos pueden estar formando biopelículas debido a su capacidad para secretar productos poliméricos. Esto puede favorecer su penetración en la matriz del suelo y prevenir su pérdida por arrastre.
6. Hay que tener en cuenta, que además de la degradación biológica de los contaminantes en el suelo, cualquier metabolito puede experimentar transformaciones de naturaleza puramente química que pueden tener importantes implicaciones para los microorganismos y para el ecosistema en general. En ocasiones, los compuestos originados en el metabolismo microbiano de un contaminante son tóxicos para organismos superiores. Como ejemplo, mencionaremos la toxicidad que presentan para los peces el 3,4,3',4'-tetracloroazoxybenceno, producido a partir de la 3,4 dicloroanilina, y los cloroveratroles, producidos por metilación biológica de los guayacoles. Los metabolitos intermedios pueden jugar, también, un papel importante en la asociación del sustrato con los ácidos húmicos y fúlvicos del suelo. Por ejemplo, el 1-naftol producido en el metabolismo fúngico del naftaleno puede jugar un papel importante en la asociación del naftaleno con el componente húmico del suelo.

7. Muchos sustratos contienen N, P o S y los microorganismos pueden utilizar alguno de esos elementos, dejando la mayor parte del sustrato intacto. Esto es particularmente importante para los contaminantes relacionados con las municiones militares que tienen una relación C/N baja y para los que la adición de fuentes de carbono puede conducir al desarrollo favorable de microorganismos anaerobios facultativos o estrictos.
8. No existen organismos o grupos de organismos de aplicación universal a procesos de biodescontaminación. Su compatibilidad con el emplazamiento de aplicación debe ser considerada en la misma medida que sus características fisiológicas y su potencial bioquímico. Sin embargo, es conveniente tener en cuenta que determinados grupos de organismos, presentan una elevada versatilidad metabólica y son capaces de degradar un amplio espectro de sustratos. Entre estos cabe destacar bacterias que utilizan compuestos de un átomo de carbono como metano y metanol y que pueden por ejemplo aplicarse a la degradación de tricloroetano. Dos géneros de bacterias Gram+ que presentan grandes posibilidades son *Rhodococcus sp.* y *Mycobacterium sp.* Mientras que las bacterias son consideradas los agentes fundamentales de la biodegradación en los sistemas acuáticos, el papel de los hongos en los sistemas terrestres puede ser igual o incluso mayor. Entre los hongos la atención de las investigaciones actuales se centra en los hongos de la podredumbre blanca, debido a su gran versatilidad metabólica.
9. Se han encontrado claras evidencias en los ecosistemas acuáticos de la existencia de concentraciones umbral, por debajo de las cuales las tasas de biodegradación de los compuestos xenobióticos es lenta o incluso inapreciable. Se han elaborado numerosas hipótesis para explicar este hecho, que se basan fundamentalmente en la existencia de concentraciones mínimas para la inducción y el mantenimiento de las enzimas de degradación implicadas en el metabolismo de los compuestos orgánicos contaminantes. El paralelismo de este hecho en los medios terrestres, ha sido estudiado hasta la fecha con poca profundidad pero puede ser importante cuando sólo estén disponibles bajas concentraciones de un sustrato contaminante por desorción del mismo.

Muy pocos de los compuestos que son objeto de programas de biodescontaminación son fácilmente degradables y aunque muchos de ellos han resultado ser metabolizables en experimentos de laboratorio controlados, la cuestión fundamental es si pueden ser degradados en un ambiente natural. La biodegradación implica la consecución de un grado de mineralización apreciable y no una simple transformación biológica.

Valoración de la eficiencia de un tratamiento biológico de descontaminación

Un aspecto imprescindible en cualquier programa de biodescontaminación, es la evaluación del éxito obtenido después de la aplicación del tratamiento. Aunque parezca obvio, el hecho es que esta valoración no se realiza adecuadamente en muchas ocasiones, debido a la difi-

cultad de integrar todos los factores implicados en un modelo que refleje el grado real de la biodegradación alcanzada. Algunos de estos factores difíciles de valorar son los siguientes:

1. La disminución de la concentración de los sustratos no es una medida inequívoca de la degradación ocurrida ya que una parte importante de los mismos puede perderse por volatilización o por transformación, con la subsiguiente aparición de metabolitos intermedios o finales.
2. El ambiente es siempre de una gran heterogeneidad y por lo tanto es muy difícil encontrar un método de muestreo que sea representativo e ilustre con aproximación el proceso que ha tenido lugar.
3. El grado de lixiviación es muy difícil de evaluar, ya que los ecosistemas suelen ser suficientemente abiertos como para que se pueda establecer un balance certero de las concentraciones de sustratos iniciales y de los metabolitos producidos, incluyendo dióxido de carbono, amoníaco o metano, que pasan a la atmósfera.

Para sortear este tipo de obstáculos se han propuesto numerosas estrategias que pretenden ayudar en la evaluación y el seguimiento de un proceso de biodescontaminación. Estas técnicas incluyen la aplicación de análisis por PCR (amplificación de secuencias de DNA) para determinar la presencia de organismos degradadores específicos y la evaluación de parámetros metabólicos que incluyen entre otros los siguientes:

- Presencia de determinados metabolitos que hayan sido identificados previamente en experimentos de laboratorio sobre rutas de degradación de los contaminantes implicados.
- Presencia de actividades enzimáticas específicas frente a los sustratos de interés. En el caso de hidrocarburos aromáticos policíclicos se incluyen la actividad de tolueno la dioxigenasa, naftaleno dioxigenasa y manganeso peroxidasa.

Técnicas para predecir la efectividad del tratamiento biológico de un suelo contaminado

Habitualmente, se emplea un protocolo metodológico de varias fases para predecir si la estrategia de biodescontaminación puede ser aplicable. Sea cual sea el enfoque del estudio de predicción utilizado, existen una serie de elementos comunes, que incluyen la revisión bibliográfica, los estudios de caracterización de microcosmos y los estudios finales de optimización. Además de esta fase que podríamos considerar de investigación microbiológica, también son elementos decisivos a la hora de evaluar el potencial de un proceso de biodescontaminación, la distribución de contaminantes en el emplazamiento contaminado, la hidrogeología y la biogeoquímica del mismo.

Según los datos publicados, los estudios respirométricos y de mineralización, utilizando microcosmos en condiciones controladas, son los más empleados para evaluar las posibles opciones de tratamiento. Los análisis respirométricos tienen como objetivo utilizar la producción de dióxido de carbono como un índice indirecto de la actividad biológica y, por lo tanto, de la degradación del contaminante. En estos estudios, se mide el aumento de la producción de CO₂ en suelos control con respecto a aquellos en que se ha añadido el contaminante objeto de estudio. Si

se observa este aumento, quiere decir que el contaminante está siendo utilizado por los microorganismos, adicionalmente a la materia orgánica del suelo. Estos estudios se pueden diseñar para evaluar la incidencia de diversos parámetros, tales como diferentes concentraciones de contaminante, procesos de atenuación fisicoquímica y otros factores.

Los estudios con microcosmos a escala de laboratorio requieren en general de uno a tres meses y se pueden llevar a cabo junto con otros ensayos para valorar el requerimiento de nutrientes inorgánicos y las condiciones de inhibición. Los resultados de estos estudios son, generalmente, utilizados para determinar las especificaciones de los ensayos piloto de tratamiento. Si los estudios con microcosmos dan resultados positivos, se pueden llevar a cabo otros adicionales para optimizar la biodegradación de contaminantes. Estos estudios pueden evaluar la relación entre aceptores electrónicos y nutrientes y otras condiciones para optimizar la eficiencia de eliminación de contaminantes. Los costes de los estudios con microcosmos varían en función de la complejidad y la duración de los mismos.

La enumeración microbiana es una herramienta que ha sido utilizada, fundamentalmente, para evaluar la respuesta *in situ* de las bacterias del suelo, a la hora de degradar contaminaciones por hidrocarburos derivados del petróleo. La respuesta de la comunidad microbiana, reflejada en forma de un incremento significativo en la densidad de población media de los suelos contaminados con respecto a la situación anterior (por ejemplo, alrededor de medio orden de magnitud), es un indicador del potencial intrínseco de la descontaminación biológica y por extensión de la posibilidad de estimular ese potencial.

Para las muestras de suelo, las densidades de población se expresan habitualmente como TRH (total de heterótrofos recuperados de la matriz del suelo). Este índice incluye bacterias heterótrofas aerobias y anaerobias facultativas, que pueden constituir en su conjunto alrededor de la mitad de la riqueza microbiana del suelo. En un suelo no contaminado, en condiciones óptimas de crecimiento, la riqueza microbiana está entre 10^6 y 10^8 unidades formadoras de colonia de bacterias por gramo de peso seco de suelo; 10^5 unidades formadoras de colonia de hongos y 10^6 de actinomicetos. La riqueza taxonómica de un suelo puede exceder las 10.000 especies por gramo de suelo seco. Del total de flora bacteriana, las bacterias aerobias representan entre el 50 y el 70%, las bacterias anaerobias el 10%, los actinomicetos entre el 20 y el 30% y los microcitos entre el 1 y el 2%.

Los factores que controlan la densidad de población y la diversidad biológica de un suelo, son de dos tipos:

Factores fisicoquímicos. En este grupo se incluyen la disponibilidad de carbono orgánico y de aceptores electrónicos, el potencial de oxidación-reducción, los nutrientes inorgánicos, el pH, el contenido de agua, la temperatura, la salinidad y la textura del suelo. La densidad de población microbiana disminuye generalmente con la profundidad, debido a la disminución de la disponibilidad de carbono orgánico y oxígeno molecular. También influye la distribución microtopológica del carbono.

Factores biológicos. En este grupo de factores se incluyen la competencia por los recursos, la existencia de predadores como protozoos y microartrópodos y los inhibidores metabólicos.

En los suelos normales, los organismos capaces de utilizar contaminantes suelen constituir menos del 0,1% de la comunidad microbiana, mientras que los degradadores pueden llegar a constituir el 100% de la riqueza biológica de un suelo contaminado. Cuando se produce un

estrés ambiental o un cambio en la fuente de carbono orgánico, la composición de la comunidad microbiana se modifica, para favorecer a las especies que pueden tolerar ese estrés o utilizar el nuevo sustrato. Después de una contaminación con hidrocarburos del petróleo, algunas especies disminuyen debido a la toxicidad, algunas no sufren efectos apreciables y otras experimentan un desarrollo adicional, al ser capaces, por su constitución enzimática específica, de metabolizar el carbono orgánico de la fracción contaminante. En general, se puede decir que la presencia de contaminantes disminuye la diversidad taxonómica y aumenta la diversidad metabólica de la población que se origina, que incorpora características nutricionales relacionadas con el contaminante y que es, en general, resistente a otras presiones ambientales distintas del contaminante en cuestión.

Estos cambios en la composición de la población microbiana, subsiguientes a la aparición de la contaminación, van acompañados de un incremento considerable de la densidad total de dicha población. Algunos autores han descrito incrementos de hasta 3000 veces la población microbiana de un suelo por un derrame de carburante [98]. Esto se traduce en que mientras en un suelo normal el factor limitante del crecimiento de la microflora suele ser el carbono orgánico, en los suelos contaminados por hidrocarburos, la falta del oxígeno molecular, necesario para permitir el metabolismo aerobio, se convierte en el factor limitante para el desarrollo de los heterótrofos aerobios y anaerobios facultativos.

Según los resultados obtenidos en los estudios de ecología microbiana del suelo, la enumeración de bacterias en suelos contaminados y su comparación con los suelos normales es un método muy útil para evaluar si aumenta el crecimiento de la microflora indígena del suelo y, por tanto, se están metabolizando los contaminantes o si por el contrario disminuye, lo cual indicaría el efecto inhibitorio o tóxico de dichos productos.

Los estudios de enumeración microbiana proporcionan datos sobre la viabilidad y la actividad microbiológica pero no pueden identificar la naturaleza del efecto inhibitorio, si éste existe. Además, en el caso de contaminaciones por mezclas complejas, el recuento de viables permite saber que la mezcla está siendo metabolizada, pero no permite conocer qué componente específico o grupo de compuestos están siendo degradados. Por ejemplo, el aumento de la densidad de población microbiana, medida por el índice TRH, en suelos contaminados con gasolina, puede ser debido a la utilización de la fracción alifática del combustible permaneciendo, sin embargo, la fracción aromática inalterada.

Puesto que los hidrocarburos derivados del petróleo constituyen uno de los mayores problemas en lo referente a la contaminación de suelos conviene hacer una breve referencia a la química de los hidrocarburos del petróleo.

Química de los hidrocarburos del petróleo

El grupo de hidrocarburos del petróleo comprende un gran número de compuestos que por definición se encuentran en el combustible crudo, así como en otras fuentes combustibles como gas natural, carbón y turba. Existen tres grupos mayoritarios en los hidrocarburos del petróleo: alcanos (parafinas), alquenos (olefinas) e hidrocarburos aromáticos.

Las parafinas son uno de los principales constituyentes del crudo y se encuentran en los diferentes productos refinados del petróleo: gasolina, queroseno, diesel,

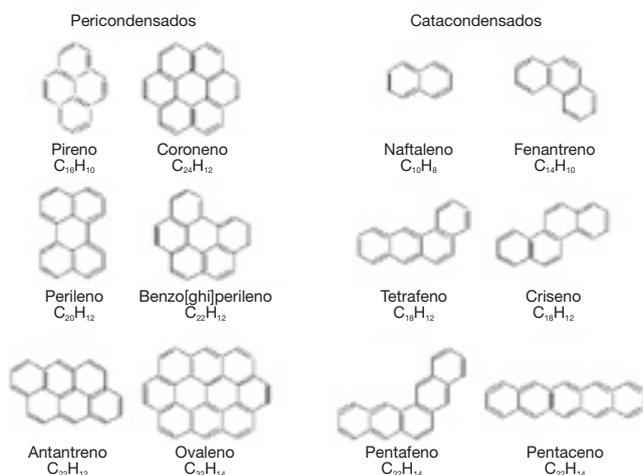


Figura 3. Estructura de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos.

aceites combustibles etc. Hay tres tipos de parafinas: alcanos lineales, alcanos ramificados y naftenos. En este último caso, los átomos de carbono están dispuestos en uno o más anillos.

Las olefinas se forman durante el proceso de refinado del crudo. Estas moléculas se caracterizan por tener dobles enlaces en su estructura.

Los hidrocarburos aromáticos pueden ser de un solo anillo: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) o contener varios anillos aromáticos como en el caso de naftaleno, antraceno, pireno y otros muchos. Por sus propiedades semivolátiles, tienen gran movilidad y presentan una baja solubilidad en agua, siendo la mayor parte de ellos lipofílicos. En la figura 3, se recoge la estructura química de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Los diferentes productos obtenidos por refinado y destilación del crudo: gasolina, diesel y asfaltos, son combinaciones de múltiples hidrocarburos individuales, cada uno de los cuales tiene diferente temperatura de ebullición. Por ejemplo, la gasolina es la combinación de muchos componentes de bajo rango de ebullición, incluyendo alcanos de C_4 a C_{12} , alquenos de C_4 a C_7 y aromáticos tipo BTEX. Los compuestos de rango intermedio de ebullición se utilizan en diferentes proporciones para conseguir productos como queroseno, diesel y aceites combustibles. Estos productos contienen preferentemente alcanos de C_{10} a C_{24} y policíclicos aromáticos con bajo o ningún contenido en olefinas.

Tratamiento biológico de contaminaciones por petróleo y sus derivados

En el caso de las contaminaciones con productos derivados del petróleo, se pueden establecer tres categorías de situaciones en las que el problema es susceptible de ser resuelto mediante procesos de descontaminación biológica: (1) residuos de las refinerías de petróleo y contaminación del área próxima al emplazamiento de las mismas, (2) fugas en las conducciones o en los tanques subterráneos de almacenamiento y (3) derrames de crudo en el mar después de accidentes en buques de transporte. Existen importantes revisiones bibliográficas sobre este tema [3,17,75]. A continuación, se enumeran algunas de las consideraciones generales con relación a cualquier proceso de degradación biológica de compuestos derivados del petróleo:

1. La biodegradación de todos los hidrocarburos requiere la disponibilidad de aceptores electrónicos: oxígeno, peróxido de hidrógeno, en ecosistemas terrestres, y nitrato o sulfato, en las condiciones anaerobias que prevalecen en los estratos profundos del suelo.
2. La biodegradación de alcanos así como las rutas metabólicas implicadas están bien identificadas. El conjunto de compuestos degradables incluye los de cadena ramificada como el pristano, aunque la estructura ramificada puede presentar un obstáculo importante. Con respecto a la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos, mientras que el naftaleno y el fenantreno son fácilmente degradables, los aromáticos policíclicos de más de cinco anillos son más recalcitrantes.
3. Muchas bacterias producen surfactantes como respuesta a la presencia de hidrocarburos. Este hecho se ha comprobado tanto en bacterias que degradan alcanos como en las degradadoras de policíclicos aromáticos.
4. En algunas ocasiones, aunque no se produzca una biodegradación considerable, se pueden producir biotransformaciones beneficiosas. Por ejemplo, el dicitlopentadieno, producido pirólicamente en las plantas petroquímicas y que se caracteriza por su olor desagradable y penetrante, aunque puede ser completamente degradado por una población mixta bacteriana, es transformado, en su mayor parte, en una serie de compuestos oxigenados que no presentan esa característica.

De los trabajos publicados en el tema de biodescontaminación de emplazamientos contaminados con hidrocarburos [4,7,8,22,64,72,98] se pueden extraer algunas conclusiones generales entre las que cabe destacar la evidencia de que la adición de nutrientes inorgánicos, fundamentalmente nitrógeno, y la provisión de oxidantes adecuados, facilitan el proceso de biodegradación. Por otra parte, la inoculación con microorganismos exógenos, incluso cuando estos microorganismos hayan sido aislados del mismo emplazamiento contaminado, no es en general efectiva. Los microorganismos endógenos resultan efectivos, siempre y cuando, dispongan de los nutrientes adecuados y se les suplemente con oxígeno, como tal o en forma de peróxido de hidrógeno. La mayor eficiencia se obtiene probablemente optimizando la capacidad de la microflora indígena que es prácticamente ubicua.

A la hora de poner en marcha una estrategia de descontaminación biológica, hay una serie de cuestiones que deben ser respondidas para integrar los distintos factores involucrados y elaborar un protocolo jerarquizado de tratamiento. En primer lugar, hay que conocer los compuestos contaminantes que están presentes y cuales de ellos deben ser eliminados. Hay que decidir que tipo de microorganismos van a ser empleados (exógenos o indígenas) y hay que diseñar el método que va a permitir evaluar el grado de éxito del tratamiento aplicado. En general, se puede establecer un sistema de evaluación en tres etapas que incluye: (1) estudios básicos de laboratorio (2) estudios con microcosmos usando material del emplazamiento contaminado y (3) evaluación del tratamiento en sistemas de mayor escala ya sea plantas piloto o instalaciones *in situ*. Es indispensable considerar, desde el principio y durante el desarrollo de todo el proceso, las interacciones entre los aspectos microbiológicos, geológicos, químicos y de ingeniería de procesos.

Experimentos de laboratorio

Hay que tener en cuenta los siguientes aspectos aplicables tanto a organismos exógenos como flora indígena:

1. Examen de las rutas metabólicas implicadas, incluyendo formación de metabolitos intermedios o finales.
2. Requerimiento de sustratos como fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre.
3. Establecimiento de los valores óptimos de temperatura, pH y concentración de oxígeno.
4. Toxicidad de sustratos.
5. Inducción de enzimas catabólicas, mediante crecimiento sobre un sustrato relacionado estructuralmente con el/los contaminantes.
6. Degradación de un compuesto, simultáneamente al crecimiento del microorganismo sobre otro sustrato compatible metabólicamente (co-metabolismo o metabolismo concurrente).
7. Existencia de mezclas de sustratos incompatibles metabólicamente.
8. Utilización de sondas biológicas adecuadas para detectar la presencia de microorganismos específicos o sus actividades.

En el caso de microflora indígena, se requiere determinar la presencia de dichos microorganismos, su número y su actividad metabólica por procedimientos convencionales de laboratorio. Puede ser conveniente poner a punto cultivos enriquecidos, empleando muestras del emplazamiento contaminado, con objeto de disponer de material adecuado para realizar los estudios de laboratorio y con microcosmos.

Experimentos con microcosmos

Estos experimentos deben plantearse con material recogido del emplazamiento contaminado y simular condiciones aerobias, anaerobias o microaerófilas. Deben proporcionar los datos cinéticos necesarios para el tratamiento a gran escala, fundamentalmente los siguientes:

1. Tasas de degradación o desaparición de sustratos.
2. Datos sobre la existencia y la estabilidad de metabolitos y su toxicidad para otros organismos.
3. Existencia de concentraciones de sustrato umbral, por debajo de las cuales las tasas de degradación biológica son muy lentas o despreciables.
4. Capacidad de inducir la degradación utilizando análogos de sustratos y metabolitos.
5. Estabilidad del sistema durante un tiempo de operación prolongado.

En esta fase de estudio, es conveniente establecer la secuencia de métodos que va a permitir evaluar el grado de biodescontaminación obtenido con el tratamiento utilizado. Entre otras, se pueden considerar las siguientes técnicas: (1) empleo de sustratos marcados radiactivamente (que en general no podrán utilizarse en la etapa de experimentación en campo), (2) evaluación de metabolitos y (3) evaluación de marcadores como por ejemplo enzimas específicas.

Tratamientos a gran escala

En esta etapa se hace necesaria la colaboración estrecha con geólogos e ingenieros. En ocasiones, las condiciones que se habían mostrado como óptimas en las etapas de experimentación previas, no resultan adecuadas cuando son aplicadas a la situación real. Esto puede abo-

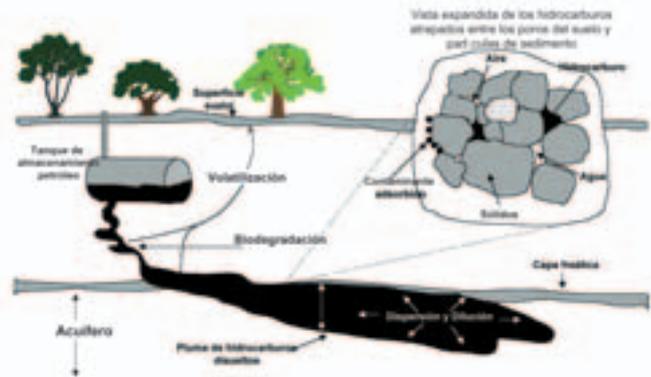


Figura 4. Efectos de una contaminación por derrame de hidrocarburos y posibles procesos de atenuación que tienen lugar.

car a un nuevo estudio de las condiciones de operación en la fase anterior o, incluso, en ensayos de laboratorio. Un buen ejemplo, es el caso de la aplicación de sistemas de bombeo y tratamiento, cuando los sustratos tienen una baja permeabilidad que puede ser debida a movilización de material coloidal en el sistema y a la subsiguiente deposición y atasco en los puntos de inyección. Es posiblemente desaconsejable evaluar estrategias alternativas una vez que el proceso a gran escala esté en marcha. Todos los problemas específicos del aumento de la escala de operación deben ser detectados y resueltos. Entre otros cabe destacar: (1) movilidad de microorganismos, sustratos, nutrientes y metabolitos (2) transporte de oxígeno y mantenimiento de otros aceptores de electrones, por ejemplo nitrato y (3) estabilidad del sistema completo.

Como conclusión general, se puede decir que si bien el potencial de la biodescontaminación es prometedor, su aplicación tiene importantes limitaciones. Según Allard y Neilson autores de un exhaustivo estudio bibliográfico [1] sobre las posibilidades de los tratamientos biológicos de descontaminación, para sortear estas limitaciones es necesario conceder la atención adecuada a la integración de los factores microbiológicos, químicos y de ingeniería, en el desarrollo del tratamiento a escala real ya que muchos de los datos experimentales, obtenidos en ensayos de laboratorio o en biorreactores de pequeño tamaño, no son extrapolables a las condiciones reales de operación.

Un aspecto importante a tener en cuenta es el propio proceso de atenuación natural que se pone en marcha cuando tiene lugar una contaminación. Por ejemplo, en el caso de un derrame de petróleo (Figura 4), a medida que la mancha de hidrocarburos se va moviendo por el interior del suelo una parte puede ser atrapada en los poros del mismo y en los sedimentos (saturación residual); otra parte puede evaporarse (volatilización); una tercera fracción puede adsorberse en las partículas del suelo (adsorción) y finalmente una parte puede disolverse en el agua subterránea (pluma disuelta). Puesto que el conjunto de hidrocarburos del petróleo es menos denso que el agua, el líquido puede flotar sobre la capa freática subiendo y bajando con las fluctuaciones estacionales de dicha capa. Este hecho puede crear una zona amplia de saturación residual. Con el avance de la pluma de hidrocarburos disueltos, la concentración de estos disminuye por los efectos de dilución y dispersión. Los microorganismos pueden degradar los hidrocarburos que están disueltos, volatilizados o adsorbidos.

Entre los aspectos microbiológicos, que siguen presentando las mayores incógnitas a la hora de aplicar estos procesos de descontaminación, merecen especial atención los siguientes:

- a) Grado de accesibilidad de los compuestos, objeto del tratamiento, a los microorganismos que pueden efectuar su degradación.
- b) Capacidad de mantener o, incluso, incrementar la población de microorganismos responsables de la degradación.
- c) Biodegradabilidad relativa de los distintos componentes en el caso de mezclas complejas de contaminantes, como hidrocarburos policíclicos aromáticos o bifenilos policlorados, ya que en ocasiones los componentes menos degradables pueden ser los más peligrosos, desde el punto de vista toxicológico y ambiental.
- d) Incluso cuando el porcentaje de eliminación de un determinado contaminante sea elevado, puede que la eliminación mayoritaria o total no sea posible, debido a la existencia de concentraciones umbral por debajo de las cuales la degradación se dificulta o se hace imposible.
- e) Es necesario disponer de una metodología fiable para decidir el éxito del tratamiento. La desaparición del contaminante no es suficiente para establecer la eficiencia del proceso, ya que, como resultado de la biotransformación, pueden originarse productos intermedios y finales de igual o superior toxicidad que el compuesto inicial.

Aplicaciones de hongos en tratamientos de biodescontaminación

Aunque buena parte de los estudios de descontaminación biológica se han centrado en bacterias por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO_2 y H_2O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes de los suelos. El elevado valor de la relación superficie/volumen celular de los hongos filamentosos les convierte en eficaces degradadores en determinados nichos como los suelos contaminados. Por otra parte, los hongos tienen una capacidad muy notable para acumular metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc, lo que está demostrado por los aislamientos realizados en minas de cobre, zinc o plomo.

También se ha detectado una gran diversidad de especies que viven en ríos con una alta concentración de minerales y bajo pH como Río Tinto (Huelva) [71]. En otros trabajos se ha estudiado su capacidad como eficientes secuestradores de isótopos radiactivos [96] lo que podría resultar de utilidad para descontaminar zonas afectadas por accidentes nucleares.

Entre los basidiomicetos que causan la podredumbre blanca de la madera que se corresponde aproximadamente con el 96% de las Poliporáceas, se encuentran las especies con las características más adecuadas para ser utilizadas en diferentes procesos biotecnológicos, incluidos los de biodescontaminación. En este sentido, la investigación de la ecología y fisiología de dichos hongos juega un papel relevante en el desarrollo de biotecnologías emergentes como la obtención de pulpa biomecánica, el blan-

queo enzimático de pulpas, la decoloración de efluentes industriales (papeleros, cerveceros, azucareros...), la degradación de contaminantes orgánicos y el biotratamiento de colorantes industriales.

Los hongos de podredumbre blanca disponen entre otras, de una capacidad muy relevante, que es la de degradar mayoritariamente la lignina, un polímero polifenólico heterogéneo que es uno de los tres componentes principales de los sustratos lignocelulósicos. En algunos casos, el resultado final de su acción confiere una apariencia blanquecina a la madera atacada como consecuencia de la desaparición de la lignina. Aunque existen algunos ascomicetos degradadores de lignina [29], los hongos ligninolíticos más eficaces se encuentran entre los basidiomicetos. Para ello, cuentan con una batería de enzimas extracelulares, oxidasas y peroxidasas, que contribuyen, en determinadas condiciones, a despolimerizar la compleja estructura de la lignina [25,40,52,59,66,105]. La oxidación y ruptura de la molécula de lignina tiene como finalidad principal eliminar dicha barrera química y posibilitar el acceso a los polisacáridos de la madera que constituyen una importante fuente de energía [51].

La peculiar irregularidad estructural del polímero de lignina, hace que estas enzimas se caractericen por unos mecanismos de acción no específicos que oxidan los anillos aromáticos constitutivos de dicho polímero [45,81]. Las enzimas que participan en este proceso son: lignina peroxidasa (LiP, E.C. 1.11.1.14), peroxidasa dependiente de Mn (MnP, E.C. 1.11.1.13) y lacasa, una fenoloxidasa que contiene principalmente cobre [67,84]. El patrón de expresión de esas actividades enzimáticas depende de los diferentes organismos, mientras unos secretan LiP y MnP (no producen lacasas), otros secretan MnP y lacasas (no producen LiP). Existen otras enzimas asociadas con las anteriores en la degradación de lignina de una manera indirecta: glioxal oxidasa (E.C. 1.2.3.5) y superóxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1) que producen H_2O_2 , compuesto requerido para la actividad de LiP y MnP [66]. Finalmente, otras enzimas actúan como nexos de unión entre las distintas vías de degradación de la lignocelulosa: glucosa oxidasa (E.C. 1.13.4), aril alcohol oxidasa (E.C. 1.13.7), celobiosa quinona oxidoreductasa (E.C.1.15.1) y celobiosa deshidrogenasa (E.C.1.199.18) [66,84]. Leonowicz et al. han propuesto un modelo de interacción de estas enzimas en el proceso de degradación de lignina por hongos ligninolíticos [66].

La inespecificidad química y la intensa actividad oxidante de estas enzimas les otorga una considerable capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con una estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina. Entre los diferentes xenobióticos que pueden ser transformados por hongos basidiomicetos, se encuentran fundamentalmente: pesticidas, hidrocarburos aromáticos (benzo α -pireno, fenantreno, pireno, etc.) compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados...) azocolorantes, etc. [9,16,30-32,34,35,38,39,42,78,84,86,]. En los últimos años, los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca han sido utilizados para descontaminar suelos o aguas por su especial capacidad para degradar compuestos xenobióticos del tipo de hidrocarburos aromáticos policíclicos, aspectos sobre los que se han realizado amplias revisiones por varios autores [5,9,12,13,60,78]. Asimismo, se ha mostrado la capacidad de estos organismos para decolorar efluentes de industrias aceiteras, textiles o pape-leras [2,27,28,38,93,100].

Como se puede constatar en la bibliografía, durante los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento de la fisiología de los hongos basidiomicetos

y su aplicación en procesos relacionados con la degradación de lignina y el tratamiento de contaminantes. Se ha estudiado la capacidad de estos hongos para degradar o modificar diferentes sustratos tales como, pulpas papeleas, clorofenoles, hidrocarburos policíclicos aromáticos, lignina kraft, sustratos lignocelulósicos, etc. con lacasas y MnP de *Trametes versicolor* [27,44,50,53-57,88,103]; pulpa kraft, hidrocarburos policíclicos aromáticos y carbonos de baja calidad con lacasas de *Pycnoporus cinnabarius* [10,55,99]; creosota con lacasa de *Pleurotus ostreatus* [30]; compuestos aromáticos con lacasa de *Marasmius quercophilus* [33], diversos contaminantes con lacasa de *Cerrena unicolor* [36]; lignina con MnP de *Phlebia radiata* y *Nematoloma fordwardi* [49]; residuos de la industria de aceite de oliva con lacasa, LiP y MnP de *Lentinula edodes*, *Phanerochaete flavido-alba*, *P. chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* [26,61,79]; lignina con lacasas azules y amarillas de *Panus tigrinus* [68]; hidrocarburos aromáticos policíclicos con lacasa de *Corioloopsis gallica* [82,83]; lignina kraft con crudo de *Trametes cingulata* [77]. Algunos de los tratamientos con lacasa se han potenciado aplicando a los cultivos mediadores o inductores como es el caso del 1Hidroxibenzotriazol (HBT) [14,37,53,54,70,89,95] que en algunos casos cumplen la función de estabilizadores de estas proteínas prolongando su actividad en el tiempo. Asimismo, se han publicado diversos trabajos sobre tratamiento de colorantes industriales con enzimas de basidiomicetos [89,91].

Estos avances han impulsado a numerosos grupos a investigar la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, utilizando hongos de podredumbre blanca y/o sus enzimas. Se han publicado diversos trabajos de los que se concluye la gran diversidad de basidiomicetos con capacidad de degradar cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos: naftaleno, fluoranteno, criseno y benzo a-pireno. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la participación de las LiPs, MnPs y lacasas difiere en función de las especies estudiadas y de las condiciones de cultivo [6,45]. El tratamiento del antraceno ha permitido determinar como se produce la apertura del anillo aromático por hongos [47]. Se ha estudiado, asimismo, la expresión de los genes *lip*, durante el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* y la oxidación de antraceno en suelos contaminados por dicho hidrocarburo. Experimentos en medio sólido han demostrado la habilidad de diversas especies y/o sus enzimas extracelulares para degradar numerosos hidrocarburos aromáticos [74]. También se ha observado esa capacidad en tratamientos *in situ* de suelos contaminados con compuestos xenobióticos, como en el caso de *Phanerochaete sordida* [62]. Otros grupos han demostrado la viabilidad de estos tratamientos, en condiciones naturales, depositando inóculos de estirpes miceliales en el suelo y constatando la efectividad de los mismos al obtener reducciones de hasta el 40% para diferentes moléculas de hidrocarburos aromáticos policíclicos [23,69].

En una revisión [25], Cullen hace una valoración de los avances obtenidos en la biología molecular de los hongos basidiomicetos en los últimos 10 años y analiza los principales resultados que ha proporcionado el estudio del sistema de degradación de *Phanerochaete chrysosporium* a nivel molecular. Propone que el estado actual de la biología molecular en estas especies se apoya fundamentalmente en los siguientes avances metodológicos: i) estandarización para la producción de auxótrofos, ii) análisis de recombinación, iii) puesta a punto de un sistema rápido de purificación de ARN y ADN y iiiii) transformación genética por complementación auxótrofa y por resistencia a marcadores [87].

El resultado más espectacular de los estudios de expresión, ha sido la confirmación de que en los sistemas de producción de enzimas oxidantes extracelulares están implicadas familias de genes, que a su vez codifican para familias de isoenzimas reguladas por parámetros medio-ambientales. La elucidación del papel y las interacciones de las isoenzimas individuales en la degradación de lignina y de hidrocarburos aromáticos contaminantes, requiere la identificación de isoenzimas específicas en sustratos complejos. En este sentido, experimentos específicos con técnicas de inmunocitoquímica han permitido localizar LiP, MnP y xilanasas sobre maderas atacadas por basidiomicetos [11]. Asimismo, los experimentos llevados a cabo por Lamar et al. [63] utilizando RT-PCR cuantitativa en suelo contaminado por hidrocarburos, permitieron detectar la expresión de genes *lip*.

El análisis por RT-PCR ha aportado valiosa información sobre los factores que disparan los mecanismos de regulación de la expresión [18-20,43], de la misma manera que las técnicas de transformación con ADN, permitirán el uso de constructos para estudios de las interacciones individuales promotor-regulador. Los estudios de mutagénesis sitio dirigida [101,102] y sistema antisentido, junto con la expresión de sistemas recombinantes, podrá aportar mayor información acerca de la contribución directa de los diferentes genes en los procesos de reciclaje en la naturaleza. La función de estos genes está dirigida tanto hacia los ecosistemas naturales como aquellos que están degradados por productos resultantes de la intervención humana.

El hecho que *P. chrysosporium* haya demostrado su capacidad para degradar fenantreno en condiciones no ligninolíticas y que otros hongos oxiden antraceno por algún sistema independiente de lignina peroxidasa [12,24,47], sugiere que este grupo de hongos posee mecanismos para degradar polímeros aromáticos, alternativos a los conocidos para degradar la lignina de la madera, que deberán ser objeto de futuras investigaciones.

Los hongos responsables de la degradación de lignina en la naturaleza y sus enzimas tienen, por lo expuesto anteriormente, unas perspectivas importantes de aplicación, no sólo en la industria papelera donde la eficiencia de eliminación de lignina es un aspecto primordial (biopulpeo y bioblanqueo de pastas), sino también en los procesos de biorremediación de contaminaciones diversas. El interés de la aplicación de estos microorganismos en suelos contaminados se refleja en las publicaciones y patentes que han aparecido en los últimos años sobre el estudio y desarrollo de procesos de biodegradación de diferentes contaminantes. Como en el caso de aplicación de cualquier tecnología, la biodescontaminación con hongos debe ser, además de factible de aplicarse en condiciones de campo –y sobre este punto se están llevando a cabo cuantiosas investigaciones que deberán esclarecer la naturaleza exacta y la regulación de la actividad enzimática de los hongos basidiomicetos–, respetuosa con el entorno natural en el que tiene que desarrollarse y competitiva desde un punto de vista económico. En estos últimos aspectos, los hongos degradadores de lignina reúnen características ecológicas y metabólicas muy valiosas ya que son degradadores naturales de compuestos xenobióticos y se encuentran frecuentemente asociados a los espacios contaminados por dichos compuestos. Por otro lado, su capacidad de desarrollarse sobre residuos agrícolas y forestales de bajo coste [15,30,92] y el hecho de que sus inóculos puedan ser producidos masivamente mediante técnicas convencionales de uso industrial habitual, les hace candidatos singulares para su utilización en procesos de biorremediación.

Conclusiones

La biodescontaminación es un proceso espontáneo o dirigido en el cual se utilizan procedimientos biológicos, fundamentalmente microbiológicos, para degradar o transformar los contaminantes hasta formas menos tóxicas o no tóxicas y mitigar, como consecuencia, la contaminación ambiental. En presencia de oxígeno suficiente (condiciones aerobias) y nutrientes, los microorganismos convierten, finalmente, muchos contaminantes orgánicos en dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana. En ausencia de oxígeno, (condiciones anaerobias), el aceptor electrónico es otro compuesto distinto del oxígeno molecular, tal como sulfato, nitrato o dióxido de carbono y los contaminantes se metabolizan finalmente a metano, cantidades limitadas de dióxido de carbono y trazas de hidrógeno. Hasta la fecha, la mayoría de las tecnologías de descontaminación biológica se han desarrollado para el tratamiento de contaminaciones por compuestos orgánicos, aunque muchos de los contaminantes más persistentes en el medioambiente, tales como bifenilos policlorados (PCB) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), son difícilmente degradables por la acción de los microorganismos.

Un buen número de condiciones ambientales pueden hacer más lento o, incluso, detener un proceso de biodegradación. Es importante, por lo tanto, realizar previamente un estudio de viabilidad que permita prever la eficiencia de un tratamiento biológico y decidir finalmente sobre la conveniencia de ponerlo en marcha. Algunos de los parámetros más importantes a tomar en consideración para la caracterización del emplazamiento, incluyen la biodegradabilidad, la distribución del contaminante en las distintas fases, el potencial de lixiviación, la reactividad química de los contaminantes, el tipo y propiedades del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia o ausencia de sustancias inhibitoras. Aunque la biodescontaminación es en principio una técnica prometedora, deben conocerse y tenerse en cuenta sus limitaciones y los criterios para el uso adecuado de dicho proceso. Entre las limitaciones, se encuentra el grado final de descontaminación alcanzable, el tiempo requerido para alcanzarlo, la posibilidad de que se generen productos intermedios tóxicos, etc. Los costes de un proceso biológico de tratamiento varían mucho dependiendo de diversos factores tales como, tipo y cantidad de contaminantes presentes, condiciones del emplazamiento, volumen de material a procesar, objetivo final específico del tratamiento, extensión y profundidad de la contaminación, uso de microorganismos exógenos y/o aditivos para aumentar la tasa de descontaminación, etc.

La utilización de las capacidades degradadoras de los microorganismos es la base fundamental de los tratamientos biológicos de contaminaciones orgánicas. En consecuencia, el conocimiento de las características fisiológicas y bioquímicas así como de la ecología y genética de las especies o consorcios microbianos involucrados, es un requisito esencial, junto con el conocimiento de la naturaleza del emplazamiento y la elección de un protocolo adecuado, para lograr el objetivo de dichos tratamientos. El uso de metodologías adecuadas para determinar el estado de "salud" de un suelo, un ambiente acuático o la atmósfera, mediante tecnologías que incluyen la aplicación de biosensores, puede ser de gran utilidad y abre nuevas líneas en la investigación en enclaves contaminados. El éxito final de un proceso de descontaminación biológica en condiciones reales requiere una aproximación multidisciplinar que incluya a especialistas en muy diversos campos. El desarrollo y aplicación de tecnologías baratas, eficaces y respetuosas con el medio ambiente depende de la integración de diversas disciplinas, así como de la profundización en el conocimiento básico de los factores fisicoquímicos, biológicos y ecológicos que gobiernan la degradación de contaminantes orgánicos *in situ* y *ex situ*.

Las técnicas de tratamiento de contaminaciones por métodos biológicos, requieren todavía muchos estudios adicionales para conocer con mayor profundidad los mecanismos biológicos responsables de la degradación de los contaminantes, así como el conjunto de características (tanto bióticas como abióticas) que conforman el complejo entorno (suelo, aire, agua) en el que se produce la contaminación y para el que hay que diseñar sistemas específicos de tratamiento en cada caso.

En este contexto, se puede añadir, finalmente, que los hongos basidiomicetos, que han mostrado su capacidad incluso para solubilizar parcialmente el carbón, un compuesto altamente polimérico más complejo que la lignina, se configuran como uno de los grupos biológicos con más posibilidades de ser aplicados en procesos de biorremediación en el futuro.

Los autores agradecen la contribución técnica de José María Carbajo.

Bibliografía

- Allard AS, Neilson AH. Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects. *Int Biodeter Biodegr* 1997; 39: 253-285.
- Ashoka C, Geetha MS, Sullia, SB. Biobleaching of composite textile dye effluent using bacterial consortia. *Asian J Microb Biotech Env Sci* 2002; 4: 65-68.
- Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 1981; 45: 180-209.
- Atlas RM, Cerniglia CE. Bioremediation of petroleum pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioSci* 1995; 5: 332-338.
- Aust SD. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microb Ecol* 1990; 20: 197-209.
- Baker Lee CJ, Fletcher MA, Avila OI, Callanan J, Yunker S, Munnecke DM. Bioremediation of MGP soils with mixed fungal and bacterial cultures. En: RE Hinchee, J Fredrickson, BC Alleman (Eds.) Bioaugmentation of site remediation. Columbus Ohio, Battelle Press, 1995: 195-202.
- Barbaro JR, Barker JF, Lemon LA, Mayfield CI. Biotransformation of BTEX under anaerobic, denitrifying conditions: Field and laboratory observations. *J Contamin Hydrol* 1992; 11: 245-272.
- Barker JF, Patrick GC, Major D. Natural attenuation of aromatic hydrocarbons in a shallow sand aquifer. *Ground Water Monit Rev* 1987; 7: 64-71.
- Barr DP, Aust SD. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol* 1994; 28: 78-87.
- Bermek H, Li KC, Eriksson K-EL. Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. *J Biotechnol* 1998; 66: 117-124.
- Blanchette B, Abad AR, Farrell RL, Leathers TD. Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by basidiomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 1457-1465.
- Bogan BW, Schoenike B, Lamar RT, Cullen D. Expression of *lip* genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 3697-3703.
- Bogan BW, Schoenike B, Lamar RT, Cullen D. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2381-2386.
- Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4627-4632.
- Boyle CD. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. *Can J Microbiol* 1995; 41: 345-353.
- Boyle CD, Wiesner C, Richardson A. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. *Soil Biol Biochem* 1998; 30: 873-882.
- Britton JN. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. En: Microbial degradation of organic compounds. Gibson DT (Ed.). New York, Marcel Dekker, 1984: 89-129.
- Broda P, Birch PRJ, Brooks PR, Sims PFG. PCR-mediated analysis of ligno cellulolytic genes transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate dependent differential expression within gene families. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2358-2364.
- Broda P, Birch PRJ, Brooks PT, Sims PFG. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Gene families and gene expression for a complex process. *Mol Microbiol* 1996; 19: 923-932.
- Brooks PR, Sims PF, Broda P. Isozyme-specific polymerase chain reaction analysis of differential gene expression: a general methods applied to lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biol Technol* 1993; 11: 830-834.
- Cauwenbergh L, Roote DS. In situ bioremediation. GWRAC (Ed.) report: O series. TO-98-01. 320 William Pitt Way. Pittsburgh, PA 15238. EEUU 1998.
- Chang M-K, Voice TC, Criddle CS. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotech Bioeng* 1993; 11: 1057-1065.
- Chapelle JA, Lamar RT, Lestan D, Lestan M. Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *J Ind Microbiol* 1996; 16: 286-294.
- Collins, PJ, Dobson ADW. Oxidation of fluorene and phenanthrene by Mn (II) dependent peroxidase activity in whole cultures of *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Biotechnol Lett* 1996; 18: 801-804.
- Cullen D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J Biotech*. 1997; 53: 273-289.
- D'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Giovannozzi Sermani G. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J Biotechnol* 2000; 77: 265-273.
- de Carvalho MEA, Monteiro MC, Sant'Anna GL. Laccase from *Trametes versicolor* - Stability at temperature and alkaline conditions and its effect on biobleaching of hardwood kraft pulp. *Appl Biochem Biotech* 1999; 77-9: 723-733.
- Eaton DC, Chang H-M, Kirk TK. Fungal decolorization of kraft bleach plant effluents. *Tappi J* 1980; 63: 103-106.
- Eaton RA, Hale MDC. Wood, decay, pests and prevention. London, Chapman and Hall, 1993.
- Eggen T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production - *Pleurotus ostreatus* - for bioremediation of creosote contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 1999; 44: 117-126.
- Eggen T, Majcherczyk A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int Biodeter Biodegr* 1998; 41: 111-117.
- Eggen T, Sveum P. Decontamination of aged creosote polluted soil: the influence of temperature, white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, and pretreatment. *Int Biodeter Biodegr* 1999; 43: 125-133.
- Farnet AM, Criellet S, Tagger S, et al. Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Can J Microbiol* 2000; 46: 189-194.
- Fernando T, Bumpus JA, Aust SD. Bioremediation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1666-167.
- Field JA, De Jong E, Costa GF, De Bont JAM. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2219-2226.
- Filazzola MT, Sannino F, Rao MA, Gianfreda L. Effect of various pollutants and soil-like constituents on laccase from *Cerrena unicolor*. *J Environ Qual* 1999; 28: 1929-1938.
- Fritz Langhals E, Kunath B. Synthesis of aromatic aldehydes by laccase-mediator assisted oxidation. *Tetrahedron Lett* 1998; 39: 5955-5956.
- Garg S, Modi D. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. *Crit Rev Biotechnol* 1999; 19: 85-112.
- Gevao B, Semple KT, Jones KC. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ Pollut* 2000; 108: 3-14.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed J* 1999; 3: 1-25.
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5973-5977.
- Glenn JK, Gold MH. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1983; 45: 1741-1747.
- González, T. Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62. Tesis Doctoral Universidad de Alcalá, España, 2001.
- Grey R, Hofer C, Schlosser D. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J Basic Microbiol* 1998; 38: 371-382.
- Hammel KE. Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular peroxidase. In: H Sigel, A Sigel (Eds.) Metal ions in biological systems. Vol. 28. Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes. New York, Marcel Dekker, 1992: 41-60.
- Hammel KE. Fungal Degradation of Lignin. In: Plant Litter Quality and Decomposition. G Gadish, KE Giller (Eds.) 1997: 33-41.
- Hammel KE, Green B, Gai WZ. Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 10605-10608.
- Herrling B, Bürmann W. A new method for in-situ remediation of volatile contaminants groundwater - numerical simulation of the flow regime - In: "Computational Methods in Subsurface Hydrology", Springer Verlag, Berlin-Heidelberg- New-York 1990; 299-304.
- Hofrichter M, Vares K, Scheibner K, Galkin S, Sipilä J, Hatakka A. Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *J Biotechnol* 1999; 67: 217-228.
- Itoh K, Fujita M, Kumano K, Suyama K, Yamamoto H. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biol Biochem* 2000; 32: 85-91.
- Jeffries TW. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* 1990; 1: 163-176.
- Jeffries TW. Biodegradation of lignin and hemicellulose. In: Biochemistry of microbial degradation. Ratledge C (Ed). Kluwer, Dordrecht 1994; 233-277.
- Johannes C, Majcherczyk A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 524-528.
- Johannes C, Majcherczyk A, Hüttermann A. Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *J Biotechnol* 1998; 61: 151-156.

55. Jonas U, Hammer E, Schauer F, Bollag J-M. Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products. *Biodegradation* 1997; 8: 321-328.
56. Jonsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn Hagerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998; 49: 691-697.
57. Kawai S, Asukai M, Ohya N, Okita K, Ito T, Ohashi H. Degradation of a non-phenolic beta-O-4 substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 170: 51-57.
58. Khan A, Kuek C, Chaudhry M, Khoo CS, W.J. Hayes WJ. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 2000; 21: 197-207.
59. Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 465-505.
60. Kirk TK, Lamar RT, Glaser JA. The potential of white-rot fungi in bioremediation. In: S Mongkolsuk, PS Lovett, JE Trempey (Eds.) *Biotechnology and environmental science-molecular approaches*. New York, Plenum Press, 1992: 131-138.
61. Kissi M, Mountadar M, Assobhei O, Gargiulo E, Palmieri G, Giardina O, Sanna G. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 57: 221-226.
62. Lamar RT, Davis JW, Dietrich DM, Glaser JA. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-contaminated soil using the lignin degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biol. Biochem* 1994; 26: 1603-1611.
63. Lamar RT, Schoenike B, Vanden Wymelenberg A, Stewart P, Dietrich DM, Cullen D. Quantitation of fungal mRNAs in complex substrates by reverse transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium* in soil. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2122-2126.
64. Landmeyer JE, Chapelle FH, Bradley PM. Assessment of intrinsic bioremediation of gasoline contamination in the shallow aquifer, Laurel Bay Exchange, Marine Corps Air Station, Beaufort, South Carolina. USGS Water-Resources Investigations Report 96-4026, 1996.
65. Larane A. Using on-site biological methods to clean up soil. *Biocycle* 1999; 12: 70-72.
66. Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojta-Wasilewska M, Cho N-S, Hofrichter M. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genet Biol* 1999; 27: 175-185.
67. Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojta-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* 2001; 41: 185-220.
68. Leontievsky AA, Myasoedova NM, Baskunov BP, Golovleva LA. Reactions of blue and yellow fungal laccases with lignin model compounds. *Biochemistry (Engl Transl Biokimiya)* 1999; 64: 1150-1156.
69. Lestan D, Lamar RT. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2045-2052.
70. Li D, Alic M, Brown JA, Gold MH. Regulation of Manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress and molecular oxygen. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 341-345.
71. López Archilla, AI. Estudio de la comunidad microbiana de un ecosistema extremo: el Río Tinto. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 1994.
72. Lovley DR, Lonergan DJ. Anaerobic oxidation of toluene, phenol and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organisms. *Appl Environ Microbiol* 1990; 6: 1858-1864.
73. Mc Eldowney S, Hardman DJ, Waite S. Treatment Technologies. In: *Pollution Ecology and Biotreatment Technologies*. Singapore, Longman Singapore Publishers, 1993.
74. Morgan P, Lewis ST, and Watkinson RJ. Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991; 34: 693-696.
75. Morgan P, and Watkinson RJ. Biodegradation of components of petroleum. In: *Biochemistry of Microbial Degradation*. C. Ratledge (Ed.) Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1994; 1-31.
76. Northcott GL, Jones KC. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ Pollut* 2000; 108: 19-43.
77. Nutsuhidze NN, Sarkanen S, Schmidt EL, Shashikanth S. Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *Trametes cingulata*. *Phytochemistry* 1998; 49: 1203-1212.
78. Paszczynski A, Crawford RL. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Prog* 1995; 11: 368-379.
79. Pérez J, de la Rubia T, BenHamman O, Martínez J. *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2726-2729.
80. Pérez J, García G, Esparza F. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva* 2002; 21: 297-300.
81. Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. Biodegradation and Biological Treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol* 2002; 5: 53-63.
82. Pickard MA, Vandertol H, Roman R, Vazquez-Duhalt R. High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Can J Microbiol* 1999; 45: 627-631.
83. Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3805-3809.
84. Pointing SB. Feasibility of bioremediation using white rot fungi. *Appl Microb Biotech* 2001; 57: 20-33.
85. Rao PS, Davis GB, Johnston CD. Technologies for enhanced remediation of contaminated soils and aquifers: an overview, analysis and case studies. In: *Contaminants and the Soil Environment in the Australia Pacific Region*. R Naidu, R Kookana, D Oliver, S Rogers, M McLaughlin (Eds.) London, Kluwer Academic Publishers, 1996: 361-410.
86. Reddy CA. The potential of white rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6: 320-328.
87. Reddy CA, D'Souza TM. Physiology and Molecular Biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13: 137-152.
88. Reid ID. Fate of residual lignin during delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2117-2125.
89. Reyes P, Pickard MA, Vázquez-Duhalt R. Hydroxybenzotriazole increase the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnol Lett* 1999; 21: 875-880.
90. Reid BJ, Jones KC, Semple KT. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments. A perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ Pollut* 2000; 108: 103-112.
91. Rodríguez E, Pickard MA, Vázquez-Duhalt R. Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 1999; 38: 27-32.
92. Rodríguez S, Santoro R, Cameselle C, Sanromán A. Effect of different parts of the corn cob employed as a carrier on ligninolytic activity in solid state cultures by *P. chrysosporium*. *Bioprocess Eng* 1998; 18: 251.
93. Sami A, Radhaune S. Role of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill waste water. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1098-1103.
94. Sijm D, Kraaij R, Belfroid A. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environ Pollut* 2000; 108: 113-119.
95. Silva R. Obtención de enzimas ligninolíticas producidas por hongos basidiomicetos. Evaluación de su aplicación al blanqueo de pastas de maderas. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, España, 2002.
96. Sugiyama H, Terada H, Shibata H, Morita Y, Kato F. Radiocesium Concentrations in wild mushrooms and characteristics of cesium accumulation by the edible mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *J of Health Sci* 2000; 46 (5): 370-375.
97. Tabak HH, Govind R, Fu C, and Gao C. Protocol for determining bioavailability and biodegradation kinetics of organic soil pollutants in soil systems to enhance bioremediation of polluted soil sites. *Bioremed Prot*. ISBN: 0-89603-437-2. Serie: Meth in Biotechnol 1997; 2: 223-240.
98. Tan CK, Gómez G, Ríos Y, Guentzel MN and Hudson J. Case study: Degradation of diesel fuel with in situ microorganisms. Superfund'90. Proceedings of the 11th. National Conference. November 26-28, 1990; 776-779.
99. Temp U, Meyrahn H, Eggert C. Extracellular phenol oxidase patterns during depolymerization of low-rank coal by three basidiomycetes. *Biotechnol Lett* 1999; 21: 281-287.
100. Thompson G, Swain J, Kay M, Forster CF. The treatment of pulp and paper mill effluents: a review. *Biores Technol* 2001; 77: 169-183.
101. Timofeevski SL, Nie G, Reading NS, Aust SD. Addition of veratryl alcohol oxidase activity to manganese peroxidase by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 500-504.
102. Torres, E, Sandoval JV, Rosell FI, Grant Mauk A, Vazquez-Duhalt R. Site-directed mutagenesis improves the biocatalytic activity of iso-1-cytochrome c in polycyclic hydrocarbon oxidation. *Enz Microb Technol* 1995; 17: 1014-1020.
103. Ullah MA, Bedford CT, Evans CS. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 53: 230-234.
104. U.S. EPA Remedial Technology Fact Sheet. Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons, EPA/600/F-98/021, 1999.
105. Vicuña R. Ligninolysis. A very peculiar microbial process. *Mol Biotech* 2000; 14: 173-176.
106. Weller MG, Simon E, Pfortner P, Dosch M, Niessner R. Detection of bound residues by enzyme immunoassay. En: *Pesticide Bound Residues in Soil*. State Commission for the Assessment of Chemicals used in Agriculture. Wiley-VCH, DFG Publ, Report No. 2, 1998.