

TRABAJO FIN DE MÁSTER

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS CON AISLADOS MICROBIANOS PROCEDENTES DE PROCESOS DE COMPOSTAJE



Alumna:

María López Martín

Directora:

María del Carmen Vargas García

Convocatoria 23/09/2011

TRABAJO FIN DE MÁSTER

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS CON AISLADOS MICROBIANOS PROCEDENTES DE PROCESOS DE COMPOSTAJE



Alumna:

Directora

María López Martín

Mª del Carmen Vargas García

ÍNDICE

1. <i>Introducción</i>	<i>Pag. 1</i>
1.1. Metales pesados. Origen y problemática	Pag. 1
1.2. Remediación de suelos contaminados por metales	Pag. 2
1.3. El compostaje como reservorio de especies microbianas útiles en biorremediación	Pag. 4
1.4. Objetivos	Pag. 6
2. <i>Material y métodos</i>	<i>Pag. 7</i>
2.1. Procesos de compostaje	Pag. 7
2.2. Determinaciones analíticas	Pag. 8
2.3. Colección de cepas resistentes a metales pesados	Pag. 8
2.4. Selección de cepas	Pag. 9
2.5. Determinación del mecanismo de acción	Pag. 10
2.6. Capacidad biosorbente de la biomasa muerta	Pag. 10
2.7. Análisis estadístico	Pag. 11
3. <i>Resultados y discusión</i>	<i>Pag. 11</i>
3.1. Colección de cepas tolerantes a metales pesados	Pag. 13
3.2. Estudio de células en crecimiento	Pag. 18
3.3. Estudio de células muertas	Pag. 20
4. <i>Conclusiones</i>	<i>Pag. 22</i>
5. <i>Bibliografía</i>	<i>Pag. 23</i>

RESUMEN

Los beneficios que nos procura la actual sociedad en la que vivimos son indudables. Sin embargo, tal grado de desarrollo conlleva una serie de aspectos negativos que pueden llegar a suponer un importante riesgo, tanto a nivel económico y social, como sanitario y ambiental. Uno de esas consecuencias negativas es la contaminación, ya sea por sustancias de carácter orgánico como inorgánico. Entre estos últimos, destacan los metales pesados, elementos de elevada recalcitrancia y toxicidad. Desde que se ha tomado conciencia del grave problema que supone su acumulación en entornos naturales, son diversos los métodos aplicados tendentes a disminuir su concentración o grado de toxicidad. Las técnicas biológicas muestran considerables ventajas en comparación con los más tradicionales métodos físico-químicos: su ausencia de contaminaciones secundarias, su relativa facilidad de operación y su mayor eficacia en relación al coste. Plantas y microorganismos son principales protagonistas de los métodos de biorremediación. Estos últimos muestran capacidad para modificar el estado oxidativo de numerosos metales pesados y, en consecuencia, disminuir su grado de toxicidad, o acumularlos superficial o intracelularmente, con lo que se evita su diseminación. El presente trabajo se ha centrado en la búsqueda de especies microbianas potencialmente capacitadas para ser aplicadas en procesos de biorremediación. Como reservorio de tales organismos, se han utilizado procesos de compostaje realizados con distintos materiales residuales, a partir de los cuales se lograron aislar 51 microorganismos tolerantes a una mezcla de metales pesados (Cd, Cr, Ni, Pb y Zn). Un estudio más detallado de la colección permitió la selección de 5 cepas especialmente válidas en cuanto a su capacidad de eliminación de metales pesados, analizando con posterioridad el mecanismo predominante de eliminación (adsorción superficial o acumulación intracelular), así como la eficacia de la biomasa muerta para ejercer como biosorbente. Los resultados obtenidos avalan tanto la potencial aplicabilidad de los microorganismos en procesos de biorremediación, como la idoneidad del compostaje como fuente de dichas especies.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales características de nuestra actual sociedad es el elevado grado de desarrollo industrial y tecnológico que muestra. Los aspectos positivos derivados de este importante nivel de desarrollo son claras, aunque ello no debe hacer olvidar las también evidentes consecuencias negativas asociadas. Una de las más significativas la encontramos en la contaminación, tanto por compuestos orgánicos de carácter xenobiótico como por contaminantes de naturaleza inorgánica. Entre estos últimos, sin duda, los más destacados son los metales pesados. Desde un punto de vista ecológico, se considera como metal pesado todo aquel elemento de naturaleza metálica con potencial para dañar el medio ambiente y elevada capacidad de resistencia a la biodegradación (Sarma *et al.*, 2011)

1.1. Metales pesados. Origen y problemática

La contaminación de entornos naturales por metales pesados es actualmente una de las preocupaciones ambientales más importantes. En cierta medida, la presencia de este tipo de elementos tiene un origen natural: procesos de meteorización, erupciones volcánicas, incendios, transporte aéreo de partículas, etc., contribuyen a los niveles de metales pesados en diferentes nichos ecológicos (MacKenzie y Canil 2008; Shcherbov *et al.* 2008; Balabanova *et al.* 2011). No obstante, son actividades antropogénicas tales como la minería, la fundición, la agricultura la eliminación de residuos o vertidos por parte de diferentes industrias las principales responsables de la acumulación en cantidades no deseables de una gran variedad de metales como Ag, As, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Rd, Sn, Th, U y Zn. La mayor parte de ellos pueden producir efectos nocivos en seres humanos s cuando alcanzan niveles que no pueden ser procesados por el organismo. Entre los daños descritos se encuentran reacciones de hipersensibilidad, efectos carcinogénicos, nefro-, osteo- e inmunotoxicidad, afectación fetal y reproductiva o daños a nivel neuromuscular y neurológico

(Beyersmann and Hartwig 2008; Smith *et al.* 2009; Berny *et al.* 2010; Guitart *et al.* 2010a, 2010b; Gundacker *et al.* 2010b; Nagajyoti *et al.* 2010; Soderland, *et al.* 2010). La fauna y la flora, así como la microbiota, también se ven afectados por estos efectos perjudiciales (Berny *et al.* 2010; Guitart *et al.* 2010a, 2010b; Nagajyoti *et al.* 2010; Hinojosa *et al.*, 2005), lo que es importante no sólo desde un punto de vista ecológico y económico, sino que, de forma indirecta, afecta al ser humano en su calidad de último eslabón de la cadena trófica (Peralta-Videa *et al.*, 2009).

1.2. Remediación de suelos contaminados por metales

En la eliminación de contaminantes metálicos se han aplicado tanto métodos físicos como químicos. Sin embargo, todos ellos presentan ciertas desventajas, entre ellas su excesivamente alta relación costo-efectividad, la generación de subproductos peligrosos o su ineficiencia cuando la concentración de metales en los entornos contaminados está por debajo de 100 mg L⁻¹ (Gavrilescu, 2004; Wang y Chen, 2009). Por otra parte, muchas de estas técnicas se llevan a cabo "*ex situ*", lo que provoca un deterioro significativo de la estructura del entorno afectado, especialmente en el caso de suelos lo que, junto a su generalmente elevado coste, limita su uso en aquellas zonas en las que el grado de contaminación es elevado.

Los métodos biológicos resuelven estos inconvenientes, ya que son fáciles de operar, no producen contaminación secundaria y muestran una mayor eficiencia a concentraciones bajas de metales (Chen *et al.*, 2005; De *et al.*, 2008.), además de poder ser aplicados "*in situ*" (Farrel y Jones, 2010). Dos son las técnicas principales que, mediante la acción de organismos, consiguen minimizar los efectos negativos ocasionados por los metales pesados. Por un lado, los microorganismos (biorremediación) y, por otro, las plantas (fitorremediación) En este sentido, tanto unos como otras permiten no sólo la disminución de los niveles de metales

tóxicos, sino que además propician su recuperación para un posterior uso comercial (Leitao, 2009).

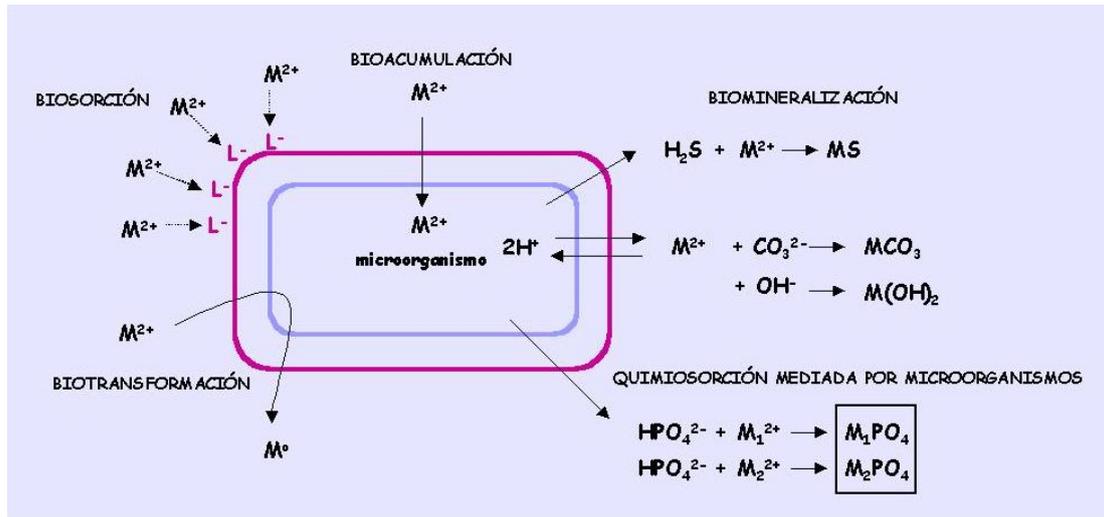
La biorremediación se fundamenta en la acción de distintas especies microbianas capacitadas para alterar el estado oxidativo de determinados metales pesados. Dicha actuación provoca, en numerosas ocasiones, una disminución en el grado de toxicidad de tales elementos o un incremento de la capacidad acumulativa de los microorganismos, ya sea en superficie o intracelularmente. Su aplicación es posible tanto en sistemas acuáticos como edáficos, ya sea a nivel superficial o en profundidad.

La eficacia de los procesos de biorremediación se encuentra condicionada por diversos factores dependientes de los distintos actores implicados en el proceso: microorganismo o microorganismos, metal o metales y propiedades físico-químicas y nutricionales del entorno de actuación. Así, condicionantes genéticos, fenómenos de cometabolismo, naturaleza del metal, biodisponibilidad del contaminante, disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, contenido en agua o características geológicas del ambiente contaminado determinan el éxito del proceso detoxificante.

Los mecanismos de actuación a través de los cuales los microorganismos pueden reducir el grado de toxicidad de los metales pesados o su concentración incluyen biosorción (adsorción del metal a la superficie celular por mecanismos físico-químicos, donde los principales grupos funcionales son: carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo), biolixiviación (movilización de metales pesados a través de la excreción de ácidos orgánicos o reacciones de metilación), biomineralización (inmovilización de metales pesados mediante la formación de sulfuros insolubles o complejos poliméricos o bien la precipitación como carbonatos e hidróxidos mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos), acumulación intracelular, mediada por un sistema de transporte de membrana, o la transformación catalizada por enzimas (reacciones redox, en las cuales se suelen obtener

compuestos volátiles o poco solubles y que suelen ser más tóxicos que el propio metal) (Lloyd, 2002; Vullo, 2003) (Fig. 1).

Figura 1. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos (Vullo, 2003)



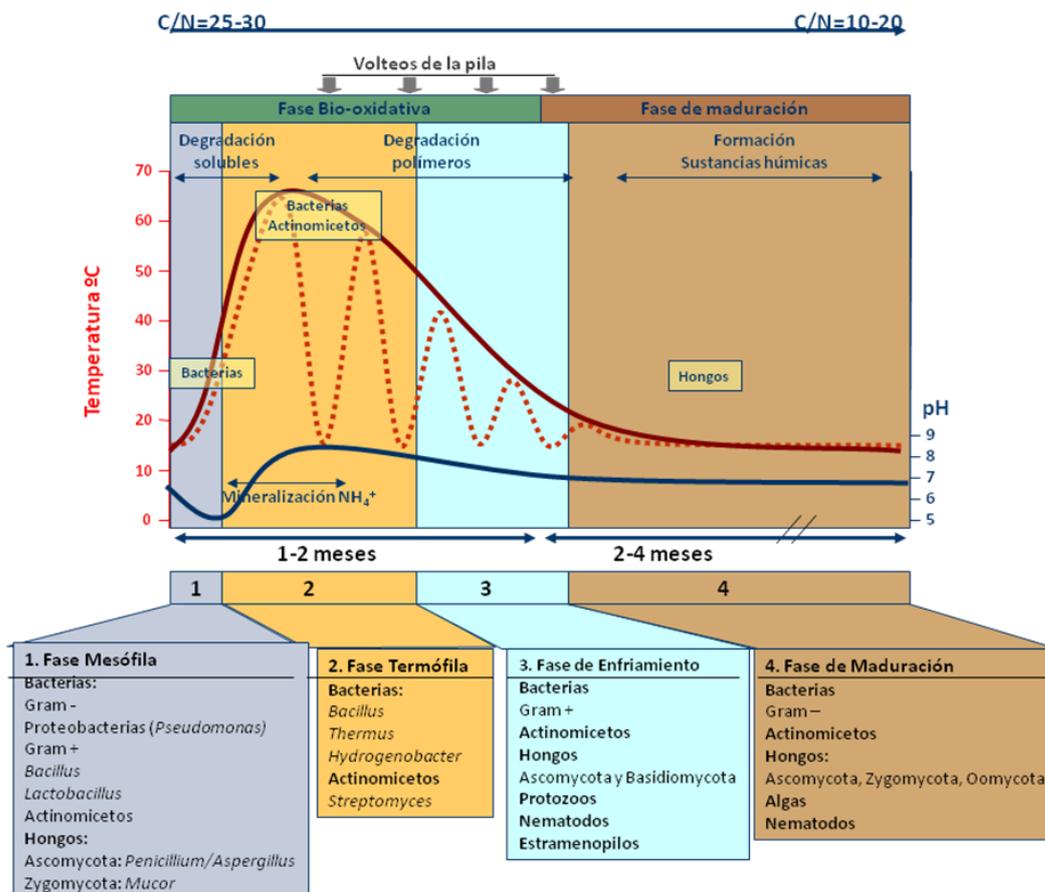
Desde un punto de vista energético, la biosorción parece ser el mecanismo más eficaz (Haferburg y Knothe, 2007). Este es el único mecanismo disponible. Además, esta es la única opción cuando los agentes microbianos aplicados en el proceso biorremediativo son células muertas. Sin embargo, los sistemas con células vivas propician procesos más efectivos, no sólo por la mayor diversidad de mecanismos potencialmente implicados, sino por su capacidad para auto-reponerse (Malik *et al.*, 2004). Por el contrario, las células vivas muestran una mayor sensibilidad a las condiciones ambientales y a las fuentes de demanda nutricional y energética.

1.3. El compostaje como reservorio de especies microbianas útiles en biorremediación

Según Soliva *et al.* (2008), el compostaje se puede definir como “Proceso biooxidativo sobre un sustrato orgánico (sólido y heterogéneo) que evoluciona a través de una fase termófila y temporal liberando fitotoxinas, que producen CO_2 , agua, minerales y materia

orgánica estabilizada”. *Grosso modo*, se pueden diferenciar dos fases principales en el proceso de compostaje: la fase biooxidativa, caracterizada por una alta disponibilidad de nutrientes y rápido crecimiento microbiano, y la de maduración, en la que la escasa disponibilidad de nutrientes fácilmente asimilables provoca que la actividad microbiana pase a un segundo plano en favor de las transformaciones físico-químicas. Durante la fase biooxidativa, las variaciones térmicas provocadas por la actividad microbiana permiten diferenciar diversas etapas: mesófila, termófila y de enfriamiento caracterizadas, a su vez, por la presencia de poblaciones microbianas especialmente adaptadas a las condiciones imperantes en cada momento (Figura 2).

Figura 2. Fases del proceso de compostaje y poblaciones microbianas asociadas (Moreno y Mormeneo, 2008)



En lo que respecta a metales pesados, el compost ha sido tradicionalmente aplicado en ambientes contaminados como fuente de sustancias húmicas adecuadas para reducir los niveles de biodisponibilidad de los metales (Walker *et al.*, 2004), efecto que también se logra como consecuencia de aumentos en el valor del pH y en el contenido en agua (Alvarenga *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Adicionalmente, la aportación de nutrientes derivada de la incorporación de compost a un entorno contaminado genera un efecto bioestimulante sobre la población microbiana autóctona (Fornes *et al.*, 2009), efecto que se ve incrementado por la microbiota propia del producto (Ros *et al.* 2006; De la Fuente *et al.* 2011).

La microbiota asociada al proceso de compostaje muestra una amplia diversidad. La variedad de condiciones ambientales y nutricionales que se suceden a lo largo del proceso da lugar favorece la presencia de comunidades microbianas de muy diferentes características. En un alto porcentaje, dichas especies exhiben capacidades metabólicas que las hacen especialmente interesantes a nivel industrial y ambiental. En este sentido, y en relación con los metales pesados, diversos estudios apuntan la capacidad de diferentes microorganismos presentes en procesos de compostaje para actuar sobre este tipo de contaminantes (Cao *et al.*, 2010; Rihani *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2009). Así, el compostaje no sólo puede resultar válido como tratamiento dirigido a la reducción de los niveles de metales pesados presentes en residuos orgánicos, sino como reservorio de especies microbianas capacitadas para biotransformar y/o bioacumular este tipo de contaminantes.

1.4. Objetivos

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se plantea con la finalidad de aislar microorganismos resistentes a metales pesados, capacitados para reducir el potencial contaminante de este tipo de elementos tóxicos, así como investigar los posibles mecanismos de actuación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Procesos de compostaje

Los materiales empleados para el desarrollo de los procesos de compostaje estudiados lo largo del presente trabajo fueron los siguientes: restos vegetales (RV), lodos de depuradora desecados (LD), y residuos sólidos urbanos (RSU). Los restos vegetales se constituyeron a partir de restos de plantas de tomate sin el fruto, procedentes de la planta de compostaje de Ejido Medio Ambiente, los lodos de depuradora fueron proporcionados por la Estación Depuradora de Aguas Residuales El Bobar, responsable del tratamiento de las aguas residuales generadas en la ciudad de Almería y, finalmente, los residuos sólidos urbanos fueron obtenidos de la Planta Municipal de Compostaje de Almería.

Los procesos de compostaje realizados con restos vegetales y lodos de depuradora, molturados a un tamaño de partícula en torno a 2 cm, fueron llevados a cabo en la planta de compostaje que el área de Microbiología posee en la finca experimental perteneciente al Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (IFAPA) y localizado en La Cañada de San Urbano. En ambos casos, se constituyeron pilas de: 1,5 m de alto, 1 m de largo y 1 metro de ancho con cada uno de los residuos mencionados como material mayoritario, adicionando cáscara de almendra molida en calidad de acondicionante que permitiese alcanzar una adecuada relación C:N. Las proporciones utilizadas en cada caso, expresadas en base a volúmenes, fueron las siguientes:

Pila RV: RV (75%) + cáscara de almendra molida (25%)

Pila L: L (37,5%) + RV (37,5) + cáscara de almendra molida (25%)

Durante el desarrollo del proceso, las pilas fueron aireadas diariamente a intervalos de 4 horas con un flujo comprendido entre 7.5 y 9.0 L kg⁻¹. Adicionalmente, cada 15 días fueron

sometidas a volteo, operación durante la cual se ajustaba el nivel de humedad a los niveles fijados inicialmente (40-50%), en caso de ser necesario.

El estudio de los distintos procesos se realizó a partir de muestras obtenidas por mezcla de 9 submuestras procedentes de distintos puntos de la pila, localizados a diferentes profundidades y longitudes, representativos de las diversas condiciones imperantes en su totalidad. Los tiempos de muestreo fueron seleccionados de acuerdo a las pautas marcadas por la evolución térmica de los procesos. A continuación se relacionan los tiempos establecidos en cada caso:

- Fase 1: al comienzo del proceso de compostaje (0 días).
- Fase 2: etapa termófila (2 días; 7 días para las pilas de RSU).
- Fase 3: etapa de enfriamiento (60 días; 30 días para las pilas de RSU).
- Fase 4: a mitad de la etapa de maduración (106 días; 85 días para las pilas de RSU).
- Fase 5: al final del proceso (185 días; 125 días para las pilas de RSU).

2.2. Determinaciones analíticas

El carbono orgánico total y el nitrógeno total fueron cuantificados según el método modificado de Mebius (1960) y el protocolo Kjeldahl (Bremmer y Mulvaney, 1982), respectivamente. Para la determinación del pH, 5 g de material fresco procedente de las muestras fueron depositados en un vaso de precipitado conteniendo 45 ml de agua destilada. El pH fue medido tras 5 minutos de agitación.

2.3. Colección de cepas resistentes a metales pesados

La colección de cepas resistentes a diferentes metales pesados se obtuvo a partir de los microorganismos aislados tras un proceso de presión selectiva en el que se efectuaron tres

pases consecutivos a sendos matraces erlenmeyer de 250 mL con Caldo Nutritivo conteniendo 50 ppm de Cd(II), Cr(VI), Ni(II), Pb(II) y Zn(II) (Medio MP). Para el primer pase, 5 g de material fresco fueron añadidos a un volumen de medio de 95 mL, mientras que los dos pases restantes se efectuaron inoculando 5 mL del medio precedente en 45 mL de medio fresco. En todos los casos, los medios se incubaron durante 7 días, a 30 °C y 80 rpm. A partir del último medio, se realizó una siembra en un medio sólido de similares características. Todos los morfotipos diferentes observados en dichos medios fueron aislados, obteniendo así la colección de cepas resistentes a metales pesados. El mantenimiento a corto plazo de dichos aislados se realizó en tubos inclinados de Agar MP, crecidos entre 48 y 120 h a 30 °C y conservados a 4 °C, mientras que a largo plazo las cepas fueron conservadas mediante liofilización.

2.4. Selección de cepas

Todos los aislados de la colección fueron estudiados en cuanto a su capacidad para retirar los metales pesados presentes en medios líquidos. Para ello, 3 ml de solución salina estéril al 0.9% fueron adicionados sobre la biomasa presente en un tubo inclinado de Agar MP fresco. La suspensión obtenida fue equitativamente distribuida en 3 matraces erlenmeyer conteniendo 25 mL de medio MP. Los medios fueron incubados durante 5 días, a 30 °C y 80 rpm. Tras la incubación, las células fueron separadas mediante centrifugación durante 5 min a 10000 rpm (Digicen 20-R, Orto Alresa, Madrid). El sobrenadante obtenido fue digerido con HNO₃ al 67% y H₂O₂ al 30% (v/v), y la concentración remanente de metales pesados fue estimada mediante espectrometría de absorción atómica (ThermoElectron Corporation S Series AA Spectrometer, Massachusetts, EE.UU). Las cepas que retiraron los metales pesados en mayor proporción fueron seleccionadas para la realización de los siguientes estudios.

2.5. Determinación del mecanismo de acción

Las cepas seleccionadas en la etapa anterior fueron sometidas a un segundo estudio que permitiera determinar el mecanismo predominante en la retirada de los metales pesados. Para ello se realizó un ensayo en el que la presencia de metales pesados se determinó tanto en el sobrenadante acelular como en el interior de las células. 50 mL de medio MP fueron inoculados con fragmentos de 1 cm² de agar MP crecido durante 72 h a 30 °C. Los medios fueron incubados a 30 °C y 100 rpm durante 120 h, tras lo cual fueron centrifugados en las condiciones anteriormente descritas. La biomasa fue lavada tres veces con NaOH 1N y, al igual que el sobrenadante, fue digerida con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (ambos compuestos fueron utilizados en las concentraciones previamente mencionadas). La concentración de metales pesados fue determinada en ambos casos mediante espectrometría de absorción atómica.

2.6. Capacidad biosorbente de la biomasa muerta

Con objeto de establecer la posibilidad de utilizar la biomasa de las cepas seleccionadas para la biosorción de metales pesados, se preparó un ensayo en similares condiciones al estudio descrito en el epígrafe anterior. La biomasa obtenida mediante centrifugación fue lavada tres veces con agua destilada, desecada y molida a un tamaño de partícula de 1 mm. Alícuotas de 25 mg de la biomasa así preparada fueron añadidos a 25 mL de una solución de metales pesados conteniendo 50 ppm de cada uno de los elementos en estudio. Las muestras fueron mantenidas a 30 °C y en agitación (120 rpm) durante 90 min. A continuación la biomasa fue retirada mediante un proceso combinado de centrifugación y filtración y la concentración de metales pesados remanentes fue estimada según el protocolo referido con anterioridad.

2.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, expresándose los resultados como el valor medio de los tres datos obtenidos. Adicionalmente, fueron estadísticamente tratados mediante aplicación del programa Statgraphics Plus para Windows versión 4.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, Estados Unidos). De forma específica y siempre que el tipo de datos obtenidos así lo permitió, se determinó la influencia de los distintos factores en estudio mediante la realización del Análisis Factorial de Varianza (ANOVA), y se comprobó la existencia de diferencias significativas entre los distintos niveles ensayados para cada factor con la aplicación del Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (MDS). En todos los casos, los análisis se realizaron para un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tres procesos de compostaje realizados con diferentes tipos de residuos orgánicos fueron muestreados con objeto de llevar a cabo un proceso de búsqueda y selección de aislados microbianos con capacidad para ser aplicados en tratamientos de biorremediación de metales pesados. Todos los procesos transcurrieron de acuerdo a lo esperado para este tipo de biotransformaciones.

La temperatura durante la fase bio-oxidativa se ajustó al típico perfil descrito para un proceso de estas características (Fig. 3), con un rápido incremento de los niveles térmicos, especialmente en el caso de las pilas constituidas por residuos vegetales y lodos de depuradora, alcanzándose valores en torno a los 60 °C y 75 °C, respectivamente. Los volteos realizados en ambos casos dieron lugar a nuevas etapas termófilas, con temperaturas siempre superiores para la pila de lodos. En el caso de la pila elaborada con residuos sólidos urbanos, se observó una única etapa termófila, de mayor duración que en los casos anteriores, y con

valores térmicos máximos a los alcanzados en el proceso efectuado con residuos vegetales. La temperatura se estabilizó entre los 40 y los 60 días, dando paso a la etapa de maduración.

Figura 3. Evolución térmica durante la fase bio-oxidativa de los diferentes procesos de compostaje realizados

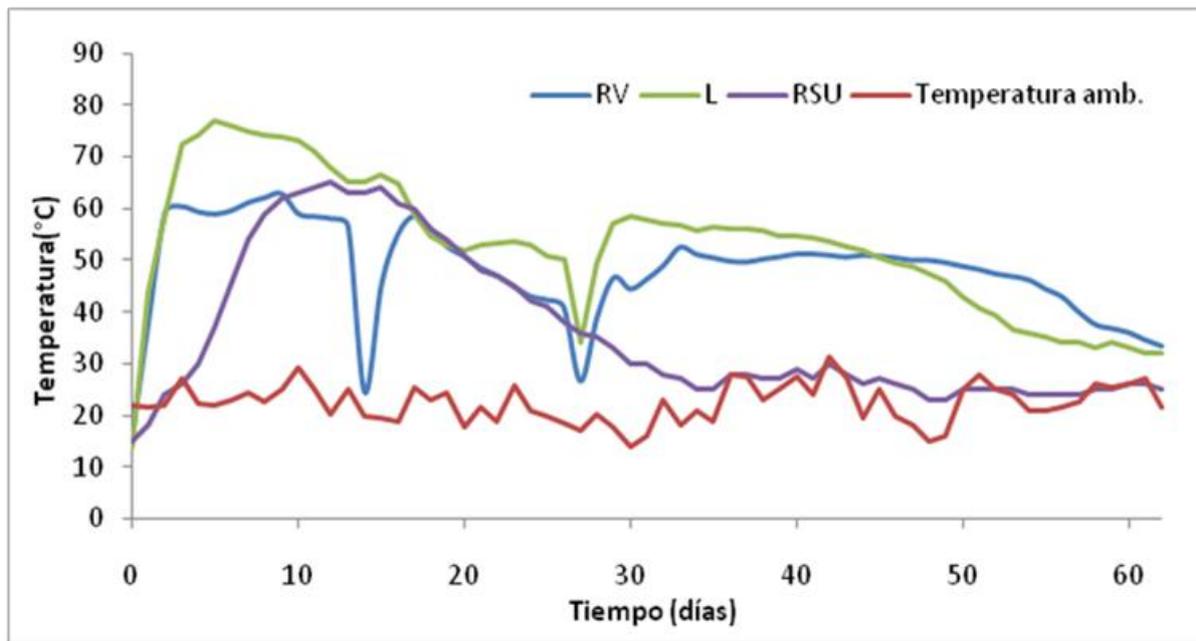


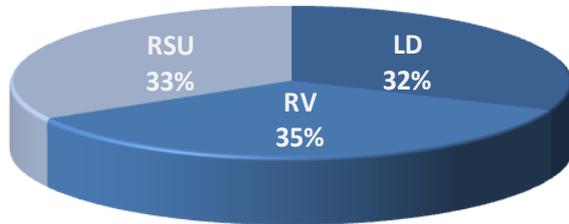
Tabla 1. Valores de la relación C:N y del pH al inicio y al final del proceso

Material	Relación C:N		pH	
	Inicio del proceso	Final del proceso	Inicio del proceso	Final del proceso
L	22.23 ± 1.61	12.23 ± 1.48	8.46 ± 0.42	7.89 ± 0.08
RV	25.22 ± 0.94	10.98 ± 2.62	7.92 ± 0.12	8.85 ± 0.04
RSU	22.28 ± 0.49	11.86 ± 0.35	4.70 ± 0.04	8.47 ± 0.01

La etapa de maduración también transcurrió de forma adecuada, tal y como se desprende de los valores detectados para la relación C:N. Este parámetro, usualmente utilizado como indicativo de la madurez alcanzada por el material, ha de mostrar niveles en torno a 12 tras la conclusión del proceso (Greenway y Song, 2002), valores en torno al cual se situaron los tres procesos realizados (Tabla 1). Dicha disminución refleja la pérdida de carbono en forma de CO₂ como consecuencia de la acción microbiana sobre los compuestos carbonados. También el pH evoluciona de forma típica, con incrementos importantes en el

inicio del proceso, como consecuencia de la producción de amonio y otros compuestos nitrogenados (Sánchez Monedero *et al.*, 2001) y una posterior estabilización en torno a

Figura 4. Distribución de aislados entre los procesos de compostaje realizados



valores neutros o ligeramente básicos, que se mantienen hasta el final del proceso. En los tres procesos realizados, los niveles finales de pH arrojaron valores ligeramente por encima de la neutralidad. En relación con la potencial utilización del compost como enmienda

orgánica en suelos contaminados con metales pesados, estos valores de pH resultan especialmente interesantes, ya que contribuyen a incrementar el nivel de este parámetro y, por tanto, favorecen los fenómenos que reducen la biodisponibilidad de tales elementos (Gadepalle *et al.*, 2009; Velásquez y Dussan, 2009)

Figura 5. Distribución de aislados de acuerdo al tratamiento dado a las muestras

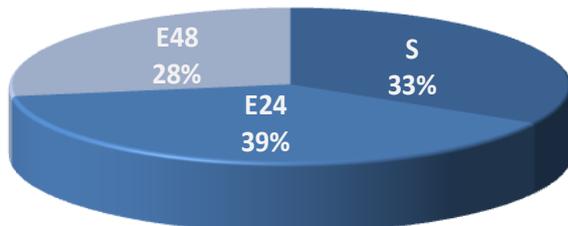
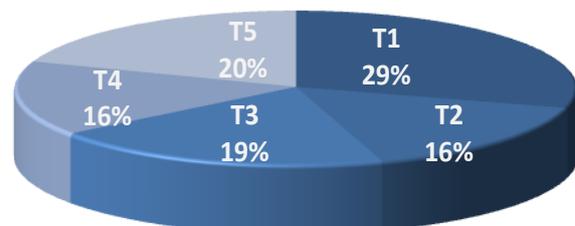


Figura 6. Distribución de aislados por tiempo de muestreo



3.1. Colección de cepas tolerantes a metales pesados

La aplicación del protocolo de búsqueda y selección permitió el aislamiento de 51 cepas (28 bacterias y 23 hongos), siendo similar el número de aislados procedentes de cada tipo de proceso (Fig. 4). En cambio, la distribución de aislados según el tipo de tratamiento que se dispensó a las muestras (sólidas, extracto de 24 h y extracto de 48 h) mostró diferencias más acusadas, procediendo el mayor número de cepas de los extractos acuosos generados tras 24 horas de tratamiento (Fig. 5). En relación con las distintas fases del proceso,

el número máximo de aislados se obtuvo al inicio de los procesos (Fig. 6), siendo las diferencias escasas para el resto de los muestreos.

La naturaleza del material residual a compostar suele influir en los niveles de las poblaciones microbianas detectadas a lo largo del proceso (Chroni *et al.*, 2009). No obstante, tales diferencias se manifiestan mayoritariamente en términos absolutos y en relación con determinadas comunidades microbianas (Vargas García *et al.*, 2010). En el caso de especies tolerantes a metales pesados, en un elevado porcentaje de microorganismos, dicha capacidad deriva de su actuación como biosorbentes y, en consecuencia, de la presencia en las cubiertas celulares de determinadas moléculas, presentes en diferentes especies y grupos microbianos. Así, tanto bacterias, ya sean Gram negativas o positivas, como hongos, disponen de componentes superficiales que pueden propiciar la adsorción/absorción de elementos metálicos (Gadd, 2004; Joo *et al.*, 2010). Por otra parte, tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo, el número de microorganismo suele ser mayor en el inicio del proceso (Rebollido *et al.*, 2008), justificando así la mayor abundancia de aislados procedentes de las muestras obtenidas en esta fase del proceso.

Tabla 2. Influencia de los factores en estudio sobre la capacidad de retirada de los distintos metales pesados analizados según el análisis de varianza ($P < 0.05$)

FACTOR	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
<i>A: Origen</i>	0.0010	0.0059	0.1016	0.0013	0.0002
<i>B: Tiempo</i>	0.0000	0.0000	0.1363	0.0003	0.0000
<i>C: Tipo</i>	0.0001	0.0003	0.0007	0.0014	0.0000
<i>D: Microorganismo</i>	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000	0.0000
INTERACCIONES					
<i>A x B</i>	0.0005	0.0011	0.1068	0.0000	0.0000
<i>A x C</i>	0.0056	0.0072	0,0509	0.0006	0.0034
<i>A x D</i>	0.7634	0.6985	0.4654	0.7781	0.3788
<i>B x C</i>	0.0029	0.0102	0.0934	0.0016	0.0002
<i>B x D</i>	0.1202	0.1975	0.7267	0.0076	0.0104
<i>C x D</i>	0.2895	0.4391	0.0474	0.0712	0.1170

Todos los aislados fueron estudiados en cuanto a su capacidad para retirar metales pesados en medios de cultivo líquidos adicionados de metales pesados. En todos los casos, la concentración de metales presentes en el sobrenadante acelular transcurrido el tiempo de cultivo fue inferior a la de inicio, así como a la detectada en los medios control sin presencia microbiana. No obstante, se apreciaron diferencias en el comportamiento de las cepas ensayadas, destacando especialmente la inferior capacidad, en términos generales, de los aislados procedentes de la pila constituida por residuos sólidos urbanos, así como la mayor eficacia de los microorganismos aislados en los muestreos 1 y 4, correspondientes respectivamente al inicio del proceso y al ecuador de la etapa de maduración. Por el contrario, las especies procedentes del producto final, último tiempo de muestreo, fueron las que, en conjunto, permitieron una mayor concentración remanente de metales pesados en los sobrenadantes. En relación con la influencia de los tratamientos dados a las muestras, en todos los casos, los aislados procedentes de aquellas materiales no sometidos a procesos de extracción mostraron mayor capacidad para retirar los metales pesados ensayados de los medios líquidos, siendo similares los niveles obtenidos para ambos extractos generados. Finalmente, y con respecto a la naturaleza de los microorganismos, las especies fúngicas siempre retiraron los diferentes metales utilizados en el estudio en mayor proporción que las bacterianas (Tabla 3).

Según Leitao (2009), la morfología microscópica de los hongos, con presencia de hifas, propicia una mayor capacidad de penetración, lo que favorece la exploración de extensiones más amplias y, en consecuencia, incide positivamente sobre el potencial de retirada de metales pesados, especialmente en suelos. En esta misma línea, la elevada superficie de contacto que proporcionan las hifas puede ser otro factor a considerar a la hora de explicar la mayor capacidad de retirada de los hongos en comparación con la que muestran las bacterias.

Tabla 3. Test de rangos múltiples para los distintos metales pesados analizados ($P < 0.05$)

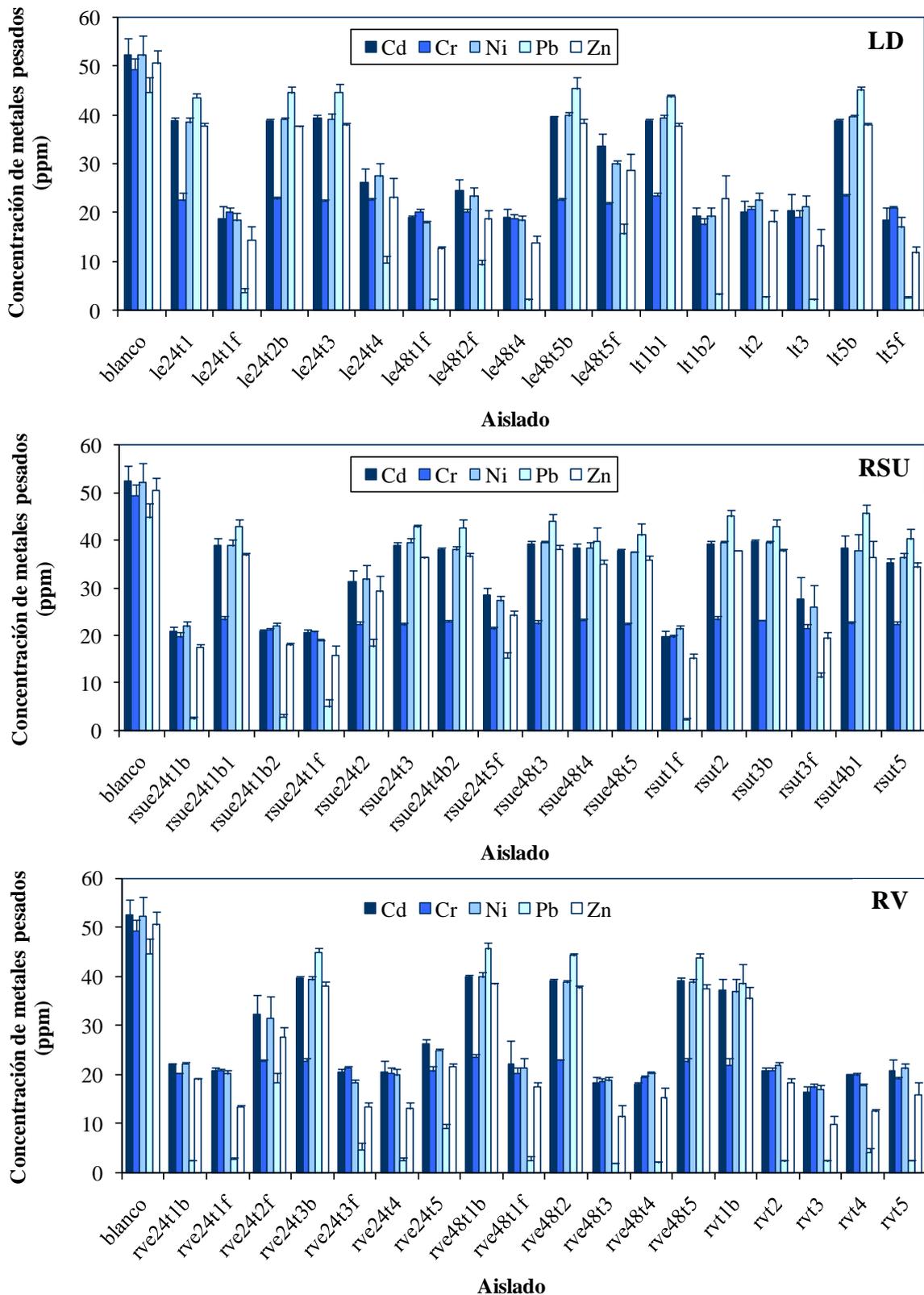
FACTOR	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
<i>ORIGEN</i>					
LD	A	A	A	B	A
RSU	B	B	B	C	B
RV	A	A	A	A	A
<i>TIEMPO</i>					
1	A	A	A	A	A
2	BC	B	B	BC	BC
3	B	B	A	C	B
4	A	A	AB	AB	A
5	C	B	B	C	C
<i>TIPO DE MUESTRA</i>					
Sólido	A	A	A	A	A
Extracto 24 h	B	B	C	B	B
Extracto 48 h	B	B	B	B	B
<i>MICROORGANISMO</i>					
Bacteria	B	B	B	B	B
Hongo	A	A	A	A	A

Nota: Los grupos de homogeneidad reflejan concentraciones mayores en el sobrenadante siguiendo el orden alfabético

Un dato a destacar se encuentra en los resultados obtenidos para el plomo. En relación con este elemento se observó un comportamiento opuesto entre cepas según estas mostrasen de forma general mayor o menor capacidad para retirar todos los metales presentes en la solución. Así, en aquellos casos en los que el porcentaje de metales remanente en solución fue alto, los niveles presentes de plomo fueron generalmente los más elevados entre los cinco metales analizados. Por el contrario, en aquellas que mostraron una importante capacidad de retirada, el plomo fue sistemáticamente el elemento remanente en menor cantidad (Fig. 7)

Especialmente destacables fueron los resultados generados por las cepas LE48T1F, RVT3, RVE48T3, LE48T4 y LT5F. En todos los casos, estos aislados mostraron una capacidad de retirada superior al 60% de la concentración inicial presente en el medio, con niveles especialmente remarcables para el plomo, en cuyo caso la concentración remanente nunca fue superior a 2.5 ppm, siendo la de partida en torno a 50 ppm.

Figura 7. Concentración de metales pesados remanentes en los medios líquidos tras la incubación con los aislados microbianos



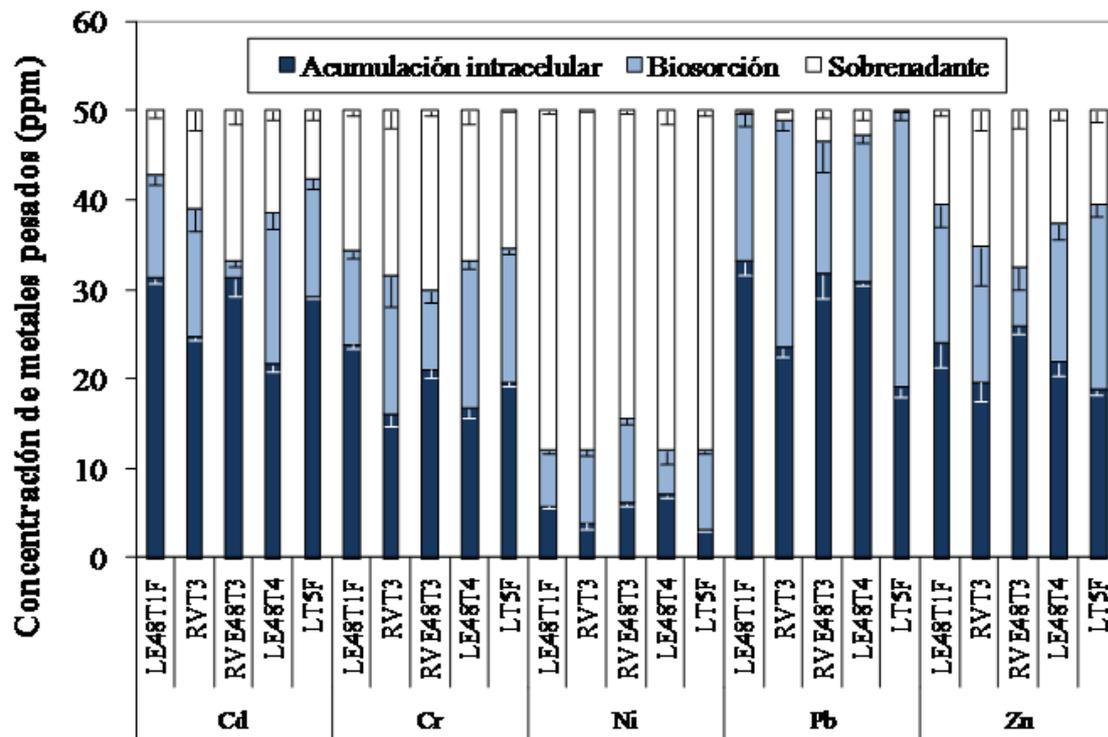
3.2. Estudio de células en crecimiento

Los metales pesados fueron retirados de manera eficiente por el cultivo de células de todos los aislamientos seleccionados en la fase previa, con el níquel como contaminante más recalcitrante y el plomo el más afectado por la acción microbiana, tal y como se había observado con anterioridad (Fig. 8). Otros autores han descrito el níquel como uno de los metales pesados más resistente a la biorremediación (Filipović-Kovačević *et al.*, 2000; Malik, 2004; Moore *et al.*, 2008), ya sea mediante biosorción o acumulación intracelular. En este sentido, se postula que tal recalcitrancia en el caso de la biosorción pueda ser causada por impedimentos estéricos debidos a las características del catión (Wong *et al.*, 2000), mientras que la bioacumulación podría verse obstaculizada por la falta de algunas proteínas transportadoras en los microorganismos protagonistas (Pervez *et al.* 2009). En el extremo opuesto se sitúa el plomo, para el que se han descrito niveles de detoxificación próximos al 100% (Kim *et al.*, 2007). Estos resultados están en su mayoría asociados a estudios multielementales, como éste, en los que la presencia de otros metales parece disminuir la toxicidad del Pb^{2+} para especies fúngicas como las empleadas en el presente estudio (Pan *et al.*, 2009), lo que contribuye a incrementar la capacidad de retirada de estos microorganismos en comparación con estudios individuales. Este efecto fue también descrito por Yan y Viraraghavan (2003) cuando analizaron la capacidad de biosorción de *Mucor rouxii* para diferentes metales pesados en soluciones binarias y ternarias.

Los niveles de retirada para Cd^{2+} , Cr^{6+} , y Zn^{2+} se situaron entre el 85% y el 60%, siendo la acumulación intracelular el mecanismo predominante en la mayor parte de los casos (Gráfica 1). Pan *et al.* (2009) observaron resultados similares con *Penicillium* y *Fusarium* como agentes detoxificantes, así como Ting y Choong (2009) en su estudio comparativo entre la capacidad bioacumulativa y biosorbente de un aislado de. De acuerdo con Zucconi *et al.* (2003) y Chojnacka (2007), la bioacumulación implica un primer paso de biosorción, en el

que rápidamente se alcanza el equilibrio, y que da paso a la posterior captación intracelular. Por lo tanto, la bioacumulación tiende a ser más importante cuanto mayor es el tiempo de contacto entre los metales pesados y las células en desarrollo.

Figura 8. Capacidad de retirada de metales pesados mediante distintos mecanismos de acción por parte de células en crecimiento de los aislados seleccionados



De acuerdo a los resultados generados por el análisis estadístico (Tabla 4), los aislados LE48T1F y LT5F fueron las más eficaces en cuanto a la retirada general de metales pesados, considerando para ello la concentración de metal remanente en el sobrenadante. Así, los niveles presentes en el medio líquido tras finalizar el ensayo siempre fueron inferiores en estas dos cepas en comparación con el resto de microorganismos ensayados. La excepción a este patrón fue el Ni(II), elemento para el que la el aislado más eficaz fue la cepa RVE48T3. El mecanismo predominante en el aislado LT5F parece ser la biosorción, mientras que en la cepa LE48T1F lo es la acumulación intracelular.

Tabla 4. Test de rangos múltiples para los distintos aislados analizados en relación con el ensayo de células en crecimiento ($P < 0.05$)

CONCENTRACIÓN METÁLICA	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
<i>Sobrenadante</i>					
LE48T1F	A	A	B	A	A
RVT3	B	BC	B	A	BC
RVE48T3	C	C	A	B	C
LE48T4F	B	AB	B	B	AB
LT5F	A	A	B	A	A
<i>Biosorción</i>					
LE48T1F	B	A	A	A	B
RVT3	CD	B	B	B	B
RVE48T3	A	A	B	A	A
LE48T4F	D	B	A	A	B
LT5F	BC	B	B	C	C
<i>Acumulación intracelular</i>					
LE48T1F	D	C	C	C	BC
RVT3	B	A	B	B	A
RVE48T3	D	B	C	C	C
LE48T4F	A	A	D	C	AB
LT5F	C	B	A	A	A

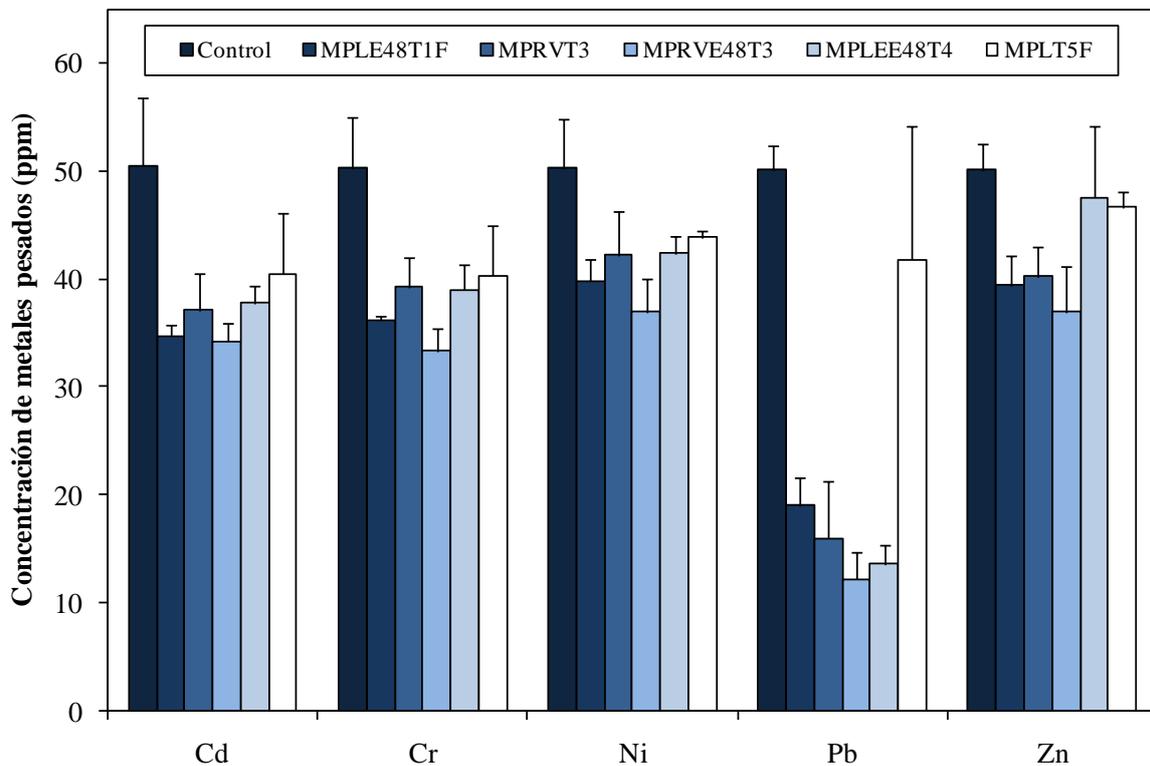
Nota: Los grupos de homogeneidad reflejan concentraciones mayores siguiendo el orden alfabético

3.3. Estudio de células muertas

La capacidad biosorbente de las células muertas de los cinco aislados seleccionados fue claramente inferior a la mostrada por las células en desarrollo. En este caso, la capacidad de eliminación osciló entre el 6% y el 34%, con la excepción de Pb^{2+} (Fig. 9). Al igual que sucedió con las células en desarrollo, el porcentaje de biosorción observado para este elemento fue netamente superior al encontrado para los restantes metales, siendo los niveles detectados mayores al 65%. Este resultado es opuesto al obtenido por Chatterjee *et al.* (2010), quienes encontraron que el Pb^{2+} fue el metal pesado eliminado en menor proporción por *Geobacillus thermodenitrificans* en una solución con diferentes contaminantes, pero es similar al descrito por Amini y Younesi (2009) y Chen y Wang (2010). Según estos autores, la

eficiencia en la eliminación de Pb^{2+} fue mayor que la obtenida para los restantes metales presentes en las muestras.

Figura 9. Capacidad de retirada de metales pesados por parte de células muertas de los aislados seleccionados



Al-Garni *et al.* (2009) registraron una disminución entre el 15% y el 44% al comparar los resultados obtenidos para células vivas y muertas de *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum*. Zucconi *et al.* (2003) encontró que las células vivas de *Paecilomyces lilacinus* mostraron una mayor capacidad que las células muertas (30% vs 23%). Por el contrario, otros autores describen resultados opuestos (Gabr *et al.*, 2008; Kaushik *et al.*, 2008.), probablemente como consecuencia del método utilizado para preparar la biomasa muerta, lo cual afecta la eficiencia del biosorbente (Bishnoi y Garima, 2005).

A pesar de la inferior capacidad de las células muertas en comparación con las que se encuentran en crecimiento, todos los aislados se diferenciaron significativamente del control

(Tabla 5). Es decir, en todos los casos se observó una disminución en los niveles disponibles en solución de los metales pesados (la excepción fueron las cepas LE48T4F y LT5F en relación con el Zn(II)). La biomasa más eficaz en cuanto a retirada de metales fue la perteneciente a la cepa RVE48T3, aunque de forma genérica no se apreciaron niveles diferenciados de retirada.

Tabla 5. Test de rangos múltiples para los distintos aislados analizados en relación con el ensayo de células muertas ($P < 0.05$)

CONCENTRACIÓN METÁLICA	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
LE48T1F	A	AB	AB	A	A
RVT3	A	B	AB	A	AB
RVE48T3	A	A	A	A	A
LE48T4F	A	B	B	A	C
LT5F	A	B	B	B	BC
Control	B	C	C	C	C

Nota: Los grupos de homogeneidad reflejan concentraciones mayores siguiendo el orden alfabético

4. CONCLUSIONES

Los procesos de compostaje se muestran como un buen reservorio de especies microbianas útiles en la detoxificación de ambientes contaminados con metales pesados. En este sentido, los hongos exhiben un mayor grado de eficacia, especialmente cuando se aplican células en crecimiento, las cuales actúan tanto mediante mecanismos de biosorción como acumulación intracelular, aunque este último método parece darse en mayor proporción. Igualmente destacable resulta la capacidad multivalente de los aislados ensayados, útiles para retirar porcentajes importantes de todos los elementos metálicos presentes en las muestras, con especial intensidad en el caso del plomo. Aunque son necesarios estudios más profundos, los resultados aquí obtenidos constituyen un punto de partida especialmente prometedor en cuanto a la utilización de los procesos de compostaje como hábitat adecuado para la búsqueda y selección de especies potencialmente interesantes en biorremediación y su posterior aplicación.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Garni S, Ghanem KM y Bahobail AS. 2009. Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution. *African Journal of Biotechnology* 8, 4163-4172.
- Alvarenga P, Gonçalves AP, Fernandes RM, de Varennes A, Duarte E, Cunha-Queda AC, y Vallini G. 2009. Reclamation of a mine contaminated soil using biologically reactive organic matrices. *Waste Management & Research* 27, 101-111.
- Amini M y Younesi H. 2009. Biosorption of Cd(II), Ni(II) and Pb(II) from aqueous solution by dried biomass of *Aspergillus niger*: Application of response surface methodology to the optimization of process parameters. *Clean - Soil, Air, Water* 37, 776-786.
- Balabanova B, Stafilov T, Šjan R y Bačeva K. 2011. Distribution of chemical elements in Attic dust as reflection on their geogenic and anthropogenic sources in the vicinity of the copper mine and flotation plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 173-184.
- Berny P, Caloni F, Croubels S, Sachana M, Vandebroucke V, Davanzo F y Guitart R. 2010. Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *The Veterinary Journal* 183, 255-259.
- Beyersmann D y Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology* 82, 493-512.
- Bishnoi NR y Garima A. 2005. Fungus - An alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research* 64, 93-100.
- Bremner M y Mulvaney CS. 1982. Nitrogen-Total. En: Page AL et al., (Eds.). *Methods of soil analysis, Part.2*, pp. 595-624. *Agron. Monogr.* 9. ASA and SSSA, Madison, Wisconsin, EE.UU.
- Cao X, Ma L, Shiralipour A y Harris W. 2010. Biomass reduction and arsenic transformation during composting of arsenic-rich hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 586-594.
- Chen C y Wang J. 2010. Removal of heavy metal ions by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Environmental Engineering* 136, 95-102.

- Chroni C, Kyriacou A, Manios T y Lasaridi KE. 2009. Investigation of the microbial community structure and activity as indicators of compost stability and composting process evolution. *Bioresource Technology* 100, 3745-3750.
- Chatterjee SK, Bhattacharjee I y Chandra G. 2010. Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of Hazardous Materials* 175, 117-125.
- Chen XC, Wang YP, Lin Q, Shi JY, Wu WX y Chen YX. 2005. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46, 101-107.
- Chojnacka K. 2007. Bioaccumulation of Cr(III) ions by blue-green alga *Spirulina* sp. Part I. A comparison with biosorption. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2, 218-223.
- De J, Ramaiah N y Vardanyan L. 2008. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Marine Biotechnology* 10, 471-477.
- De la Fuente C, Clemente R, Martínez-Alcalá I, Tortosa G y Bernal MP. 2011. Impact of fresh and composted olive husk and their water-soluble fractions on soil heavy metal fractionation, microbial biomass and plant uptake. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1283-1289.
- Farrell M y Jones DL. 2010. Use of composts in the remediation of heavy metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 175, 575-582.
- Filipović-Kovačević Z, Sipos L y Briški F. 2000. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions. *Food Technology and Biotechnology* 38, 211-216.
- Fornes F, García de la Fuente R, Belda RM y Abad M. 2009. "Alperujo" compost amendment of contaminated calcareous and acidic soil: Effects on growth and trace element uptake by five *Brassica* species. *Bioresource Technology* 100, 3982-3990.
- Gabr RM, Hassan SHA y Shoreit AAM. 2008. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 195-203.

- Gadd GM. 2004. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals, and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111, 3-49.
- Gadepalle VP, Ouki SK, et al. 2009. Remediation of copper and cadmium in contaminated soils using compost with inorganic amendments. *Water, Air, and Soil Pollution* 196, 355-368.
- Gavrilescu M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences* 4, 219-232.
- Greenway GM y Qi JS. 2002. Heavy metal speciation in the composting process. *Journal of Environmental Monitoring* 4, 300-305.
- Guitart R, Croubels S, Caloni F, Sachana M, Davanzo F, Vandebroucke V y Berny P. 2010a. Animal poisoning in Europe. Part 1: Farm livestock and poultry. *The Veterinary Journal* 183, 249-254.
- Guitart R, Sachana M, Caloni F, Croubels S, Vandebroucke V y Berny P. 2010b. Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. *The Veterinary Journal* 183, 260-265.
- Gundacker C, Gencik M y Hengstschläger M. 2010. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: Mercury and lead. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705, 130-140.
- Haferburg G y Kothe E. 2007. Microbes and metals: Interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* 47, 453-467.
- Hinojosa MB, Carreira JA, García-Ruiz R y Dick RP. 2005. Microbial response to heavy metal-polluted soils: Community analysis from phospholipid-linked fatty acids and ester-linked fatty acids extracts. *Journal of Environmental Quality* 34, 1789-1800.
- Joo JH, Hassan SHA y Oh SE. 2010. Comparative study of biosorption of Zn^{2+} by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 734-741.
- Kaushik S, Juwarkar A, Malik A y Satya S. 2008. Biological removal of Cr(VI) by bacterial isolates obtained from metal contaminated sites. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 43, 419-423.

- Kim SU , Cheong YH, Seo DC, Hur JS, Heo JS y Cho JS. 2007. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus* spp.). *Water Science & Technology* 55, 105-111.
- Leitão AL. 2009. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6, 1393-1417.
- Liu L, Chen H, Cai P, Liang W and Huang Q. 2009. Immobilization and phytotoxicity of Cd in contaminated soil amended with chicken manure compost. *Journal of Hazardous Materials* 163, 563-567.
- Lloyd JR. 2002. Bioremediation of metals: The application of microorganisms that make and break minerals. *Microbiology Today* 29, 67-69.
- MacKenzie JM y Canil D. 2008. Volatile heavy metal mobility in silicate liquids: Implications for volcanic degassing and eruption prediction. *Earth and Planetary Science Letters* 269, 487-495.
- Malik A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261-278.
- Mebius LJ. 1960. A rapid method for the determination of organic carbon in soil. *Analytica Chimica Acta* 22, 120-124.
- Moore BA, Duncan JR y Burgess JE. 2008. Fungal bioaccumulation of copper, nickel, gold and platinum. *Minerals Engineering* 21, 55-60.
- Moreno J y Mormeneo S. 2008. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno J, Moral R (Eds.). *Compostaje*, pp. 111-140. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Nagajyoti PC, Lee KD y Sreekanth TVM. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8, 199-216.
- Pan R, Cao L y Zhang R. 2009. Combined effects of Cu, Cd, Pb and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. *Journal of Hazardous Materials* 171, 761-766.
- Peralta-Videa JR, López ML, Narayan M, Saupe G y Gadea-Torresday J. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1665-1677.

- Pervez A, Shahbaz S, Shah MM, Mahmood Q y Mirza N. 2009. Assessing bioaccumulation of heavy metals in sporocarp of *Pleurotus ostreatus*. *World Applied Sciences Journal* 7, 1498-1503.
- Rebollido R, Martínez J, Aguilera Y, Melchor K, Koerner I y Stegman R. 2008. Microbial populations during composting process of organic fraction of municipal solid waste. *Applied Ecology and Environmental Research* 6, 61-67.
- Rihani M, Malamis D, Bihaoui B, Etahiri S, Loizidou M y Assobhei O. 2010. In-vessel treatment of urban primary sludge by aerobic composting. *Bioresource Technology* 101, 5988-5995.
- Ros M, Pascual JA, García C, Hernández MT e Insam H. 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3443-3452.
- Sánchez Monedero MA, Roig A, Paredes C y Bernal MP. 2001. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresource Technology* 78, 301-308.
- Sarma H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology* 4, 118-138.
- Shcherbov BL, Strakhovenko VD y Sukhorukov FV. 2008. The ecogeochemical role of forest fires in the Baikal region. *Geography and Natural Resources* 29, 150-155.
- Shukla OP, Rai UN y Dubey S. 2009. Involvement and interaction of microbial communities in the transformation and stabilization of chromium during the composting of tannery effluent treated biomass of *Vallisneria spiralis* L. *Bioresource Technology* 100, 2198-2203.
- Smith SS, Reyes JR, Arbon KS, Harvey WA, Hunt LM y Heggland SJ. 2009. Cadmium-induced decrease in RUNX2 mRNA expression and recovery by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in the human osteoblast-like cell line, Saos-2. *Toxicology in vitro* 23, 60-66.
- Soderland P, Lovekar S, Weiner DE, Brooks DR y Kaufman JS. 2010. Chronic kidney disease associated with environmental toxins and exposure. *Advances in Chronic Kidney Disease* 17, 254-264.

- Soliva M, López M y Huerta O. 2008. Antecedentes y fundamentos del proceso de compostaje. En: Moreno J, Moral R (Eds.). Compostaje, pp. 75-92. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Ting ASY y Choong CC. 2009. Bioaccumulation and biosorption efficacy of *Trichoderma* isolate SP2F1 in removing copper (Cu(II)) from aqueous solutions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25, 1431-1437.
- Vargas García MC, Suárez Estrella F, López M y Moreno J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management* 30, 771-778.
- Velásquez L y Dussan J. 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Hazardous Materials* 167, 713-716.
- Vullo Diana L. 2003. Microorganismos y metales pesados: interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva* 2, 93-104.
- Walker DJ, Clemente R y Bernal MP. 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by piritic mine waste. *Chemosphere* 57, 215-224.
- Wang J y C Chen 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances* 27, 195-226.
- Wong JPK, Wong SY y Tam NFY. 2000. Nickel biosorption by two *Chlorella* species, *C. vulgaris* (a commercial species) and *C. miniata* (a local isolate). *Bioresource Technology* 73, 133-137.
- Yan G y Viraraghavan T. 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research* 37, 4486-4496.
- Zucconi L, Ripa C, Alianiello F, Benedetti A y Onofri S. 2003. Lead resistance, sorption and accumulation in a *Paecilomyces lilacinus* strain. *Biology and Fertility of Soils* 37, 17-22.