

Concepto y estrategias de biorremediación

Edwin Humberto González Rojas*

Resumen

Este artículo de revisión presenta una breve síntesis de las tres metodologías de biorremediación: atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación. Adicionalmente, describe las tecnologías de biorremediación existentes como son: In situ bioventing y air sparging, bioslurry, landfarming y biopilas y finalmente el compostaje.

Palabras clave: biorremediación, Metodologías, tecnologías, Medio Ambiente, microorganismos.

Abstract

This review article presents a brief summary of the three bioremediation methods: natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Additionally, bioremediation describes existing technologies such as: In situ bioventing and air sparging, bioslurry, and finally biopiles landfarming and composting.

Keywords: bioremediation, methodologies, technologies, Environment, microorganisms.

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (su capacidad de biodegradación) para limpiar terrenos o aguas contaminadas (Watanabe, 2001). También se puede definir como un grupo de tratamientos, contra la contaminación de un medio, que aplica sistemas biológicos para catalizar la destrucción o transformación de compuestos químicos en otros menos tóxicos (Atlas & Unterman, 1999; Hughes et al, 2000). Estos microorganismos utilizan su potencial enzimático para mineralizar los compuestos contaminantes o degradarlos hasta productos intermedios, en un ambiente aerobio o anaerobio. Existen factores limitantes (King *et al*, 1997) como son: nutrientes esenciales (nitrógeno y/o fósforo), aceptores adecuados de electrones, condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad), inexistencias de poblaciones microbianas con potencial enzimático.

Desde un punto de vista oficial, la academia americana de microbiología define la biorremediación como “la utilización de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos” (Gibson & Sayler, 1992). Estas técnicas están aprobadas por varias agencias reguladoras en todo el mundo (EPA, Environment

Recibido: 22 febrero de 2011

Aceptado: 26 de mayo de 2011

* Docente-Investigador. Facultad Ingeniería Ambiental. edwigozalez@uan.edu.co

Canada, etc.). La metodología aplicada y sus conclusiones sobre el tema están disponibles en publicaciones, informes y bases de datos de organismos públicos y privados en todo el mundo¹.

El ámbito de aplicabilidad de la biorremediación es amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia (González-Rojas, 2004):

- Sólido: con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.
- Líquido: aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales.
- Gases: emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos.

También se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar (Young & Cerniglia, 1995; Alexander, 1999; Eweis *et al.*, 1999)

En cuanto a contaminantes, en la literatura se pueden encontrar numerosos estudios de biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos. Así, a modo de ejemplo, hay diversos trabajos que muestran la biodegradación aerobia (Kästner *et al.*, 1994; Bastiaens *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2002; Potin *et al.*, 2004) y anaerobia (McNally *et al.*, 1998; Johnson & Ghosh, 1998; Rockne *et al.*, 2000) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos; la biodegradación de clorofenoles y derivados fenólicos utilizados como herbicidas y pesticidas (Kao *et al.*, 2004; Baggi *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2006); la biodegradación de benceno mediante diferentes procesos terminales de aceptación de electrones, incluidas la reducción de Fe(III) (Anderson & Lovley, 1999), la reducción de sulfato (Anderson & Lovley, 2000) y la metanogénesis (Weiner & Lovley, 1998); o la biodegradación de otros hidrocarburos monoaromáticos como el tolueno, etilbenceno y xileno por bacterias (Jahn *et al.*, 2005) y hongos del suelo (Prenafeta-Boldu *et al.*, 2004; Nikolova

& Nenov, 2005). Por otro lado, en los últimos años la puesta a punto de técnicas de biología molecular, proteómica y metabolómica ha relanzado las expectativas de futuro de la biorremediación (Villas-Boas & Bruheim, 2007; Wood, 2008; Zhao & Poh, 2008).

Desde un punto de vista metodológico existen tres conceptos importantes, que determinan a su vez otras tantas aproximaciones principales a la biorremediación, y que se comentan a continuación (González-Rojas, 2009; Llamas *et al.*, 2003)

a Atenuación natural

Se denomina biorremediación intrínseca o atenuación natural a la que se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado (Rosenberg & Ron, 1996; Spain, 1997; Watanabe, 2001). Estos utilizan su potencial enzimático para mineralizar (biodegradar completamente hasta CO₂) los compuestos orgánicos o bien simplemente degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio. En otras ocasiones las transformaciones cometabólicas (llevadas a cabo por enzimas que metabolizan simultáneamente otros compuestos como fuente de carbono; Sánchez & Gallego, 2005) son las responsables de la biodegradación. En cualquier caso los procesos suelen tener lugar mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes.

La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende de las 'habilidades metabólicas' de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y lógicamente de la geoquímica y la hidrogeología en la zona (Gallego *et al.*, 2006a). En relación con el oxígeno, y en un modelo muy simplificado, el proceso se definiría de la siguiente forma:

- En presencia de oxígeno (condiciones aerobias) los microorganismos convertirían en última instancia los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular microbiana. Se habla de biodegradación aerobia o bien de biorremediación aerobia.

¹ Muchos enlaces de interés pueden encontrarse en la sección de biolinks de la página del 'biogroup' www.bioremediationgroup.org

- En el caso de escasez de oxígeno (condiciones anaeróbicas), los microorganismos producen otros compuestos, dependiendo de los aceptores de electrones disponibles (nitrato, sulfato, formas oxidadas de Fe o Mn,...).

Hablaríamos de biodegradación anaerobia o bien de biorremediación anaerobia, proceso generalmente más lento que el aerobio. Abunde o falte el oxígeno en el medio, éste puede reunir unas condiciones ideales en las que los contaminantes se transformarían en compuestos no peligrosos para los posibles receptores. En este caso, la estrategia apropiada de biorremediación puede ser la atenuación natural (Mills et al., 2003)

Desafortunadamente, hay bastantes factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en cualquier medio, señalándose a continuación los más habituales (King et al., 1997):

- Carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno y/o fósforo).
- Ausencia de aceptores adecuados de electrones (citados atrás).
- Inexistencia de condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad).
- Ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático adecuado necesario para degradar los contaminantes.
- Presencia de componentes tóxicos en la mezcla contaminante.

Si aportamos al medio alguno de los elementos de los que carece o bien potenciamos los existentes, favoreceremos la eliminación del posible contaminante (Gallego et al, 2003). En muchos casos este tipo de intervención será necesaria para reforzar el proceso natural o bien para implantar unas condiciones que reduzcan el riesgo ('engineered bioremediation strategies'). En esto se basan las siguientes aproximaciones biotecnológicas: (i) introducción de modificaciones en el medio mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos (bioestimulación, 'biostimulation' o 'enhanced bioremediation') y (ii) la adición de microorganismos (bioaumentación o bioaumentación, 'bioaugmentation') (Gallego et al, 2006b; Gallego et al 2006c).

b. Bioestimulación

La bioestimulación consiste en la complementación del medio en el cual se encuentran los microorganismos con nutrientes o condiciones adecuadas: nitratos, fosfatos, aceptores de electrones (oxígeno) o ajustes de pH (Gallego et al, 2001; Gallego et al, 2005). Esta aproximación se fundamenta en la premisa de que los microorganismos indígenas o autóctonos son capaces de degradar el contaminante tras un proceso más o menos largo de aclimatación.

Existen multitud de técnicas para aplicar la bioestimulación. Una primera división se puede hacer entre prácticas 'in situ' ("bioventing", "air sparging", adición de nutrientes, etc.) y técnicas 'ex situ' ("landfarming", biopilas, biorreactores, etc.), dependiendo de una gran variedad de factores específicos (Kerr, 1994; King et al., 1997; Riser-Roberts, 1998; Atlas & Unterman, 1999; Eweis et al., 1999). En muchos casos será suficiente añadir aceptores de electrones (oxígeno, nitratos, etc.) aunque en otros se podría requerir la adición de nutrientes o ajustes de pH. En todo caso, estas aproximaciones se sostienen en la premisa de que los microorganismos indígenas son capaces de degradar el contaminante tras un proceso más o menos largo de aclimatación.

En lo que se refiere a la adición de nutrientes, la biorremediación requiere que estos entren en contacto con el área impregnada (Morra, 1996) y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población degradadora en el transcurso de las operaciones de remediación. En esta línea, los sistemas 'pump & treat' para aguas subterráneas (Bosma, 2001), que están a caballo entre las técnicas 'in situ' y 'ex situ', se están imponiendo en los últimos tiempos porque permiten utilizar un tanque mezclador como un verdadero biorreactor con el fin de controlar todos los parámetros importantes

c. Bioaumentación

La bioaumentación es la adición de microorganismos especializados y exógenos al medio con el fin de optimizar la remediación (Walter, 1997; Atlas & Unterman, 1999). Puede ser apropiada

para proyectos “ex situ”, con la utilización de consorcios especializados (Viñas *et al.*, 2002). Existe sin embargo, la incertidumbre sobre si estas bacterias son capaces o no de permanecer en el sustrato contaminado y si la capacidad degradadora se mantiene a través del tiempo (Gallego *et al.*, 2007b).

Otras líneas de investigación han llevado a la utilización de microorganismos especializados y exógenos al medio con el fin de optimizar la remediación (Atlas & Unterman, 1999). Esta técnica (bioaumentación o bioaumento) puede ser apropiada para proyectos “ex situ”, especialmente en lo que se refiere a la utilización de consorcios especializados (Viñas *et al.*, 2002). No obstante, falta por demostrar su completa validez en procesos “in situ”, ya que se han señalado una serie de razones que dificultan la aplicabilidad de la misma:

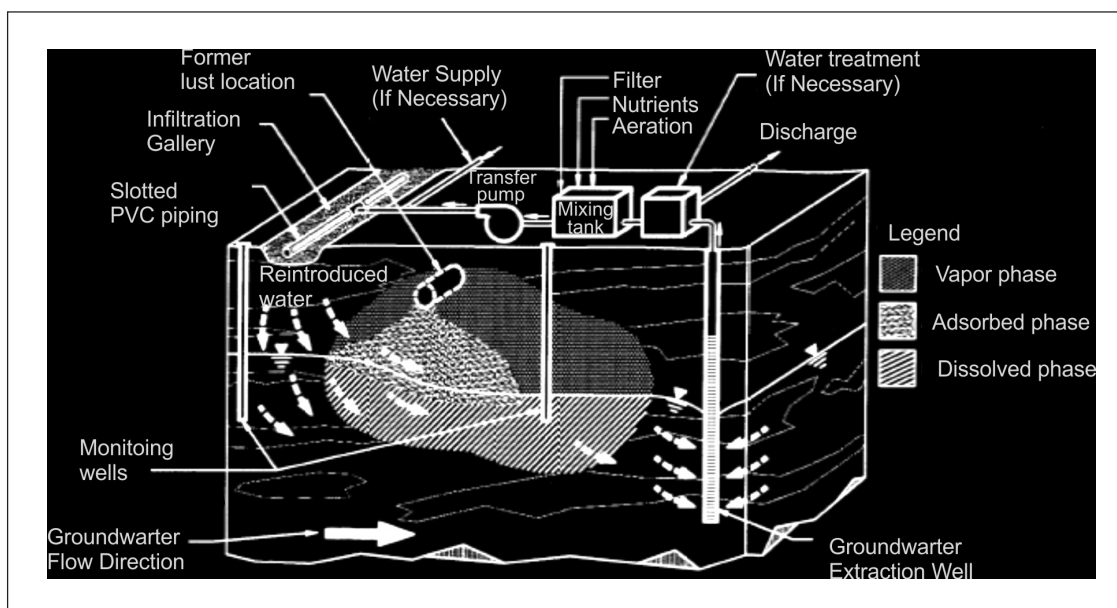
- El tamaño de la población de microorganismos degradadores crece rápidamente como respuesta a la contaminación del medio y es muy difícil, si no imposible, incrementar la

población microbiana más allá de esos valores mediante un inóculo externo.

- La capacidad de carga de muchos ambientes viene determinada por factores tales como la presencia de depredadores, la superficie ‘libre’ de contaminantes y la presencia de abundante materia orgánica (Providenti *et al.*, 1990)
- Los microorganismos añadidos compiten con la población indígena antes de ocupar los nichos potenciales. Ha de tenerse en cuenta que la utilización de microorganismos autóctonos para bioaumentación mejora la eficiencia de este proceso (Alisi *et al.*, 2009)

Pese a todo, la investigación en este terreno avanza a gran velocidad, y se han descrito ya resultados positivos en situaciones experimentales similares a las que se darían en tratamientos “in situ” (Niu *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009); además, la creación de microorganismos desarrollados por ingeniería genética puede con el tiempo ser el factor desencadenante de cambios decisivos en el panorama actual de la biorremediación (Singh *et al.*, 2008).

Figura 1. Sistema de BIS mediante infiltración por zanja



Tomada de ‘How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers’ (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; EPA 510-R-04-002).

Tecnologías de Biorremediación

Una vez estudiados los fundamentos, se describen en este punto las principales técnicas de biorremediación desde el punto de vista de los trabajos a escala real más habituales en emplazamientos contaminados con hidrocarburos. Es válida aquí también la división ya mencionada entre métodos “in situ” y métodos “ex situ” con su variante “on-site” (Gallego et al, 2007b).

a. Biorremediación “in situ” de aguas subterráneas

El tratamiento biológico “in situ” del agua subterránea fomenta el crecimiento de los microorganismos autóctonos de la zona saturada del subsuelo con el fin de que estos degraden los contaminantes disueltos en el agua y los adsorbidos en la matriz del acuífero. Este proceso requiere generalmente mecanismos que estimulen la actividad de los microorganismos mediante algún sistema que dote al medio de aceptores de electrones adecuados (oxígeno en procesos aerobios mediante peróxidos por ejemplo), nutrientes (nitrógeno y fósforo) y en ocasiones una fuente de carbono alternativa al contaminante que fomente la degradación de éste por cometabolismo. (Gallego et al, 2007b).

Inicialmente la biorremediación “in-situ” (en adelante, BIS) se ha utilizado como técnica de “pulido final” para tratamientos de remediación físicos; sin embargo, los tratamientos de BIS están madurando y se está convirtiendo en el principal método de actuación en algunos emplazamientos afectados con gasolinas y/o gasóleos (Jorgensen, 2007). La elección de la estrategia más adecuada se fundamenta en el conocimiento microbiológico, químico, hidrogeológico del emplazamiento así como las técnicas de ingeniería que mejor puedan realizar la inyección y difusión de los estimulantes en las aguas subterráneas (Menéndez-Vega et al., 2007).

La viabilidad de la BIS para descontaminar aguas subterráneas viene determinada por factores microbiológicos, pero fundamentalmente por los hidrogeológicos (Farhadian et al., 2008).

b ‘Bioventing’ y ‘air sparging’.

El ‘bioventing’ consiste en introducir aire en la zona no saturada del suelo para estimular la concentración de oxígeno y la biodegradación aerobia. También se favorece la evaporación de los contaminantes volátiles. A diferencia de la extracción mediante vacío del vapor del suelo, el bioventing usa bajos caudales de aire para suministrar únicamente el oxígeno suficiente para mantener la actividad microbiana.

La introducción de oxígeno puede realizarse por succión o por soplado, en la forma más usual, el oxígeno es suministrado mediante la inyección directa de aire en el suelo.

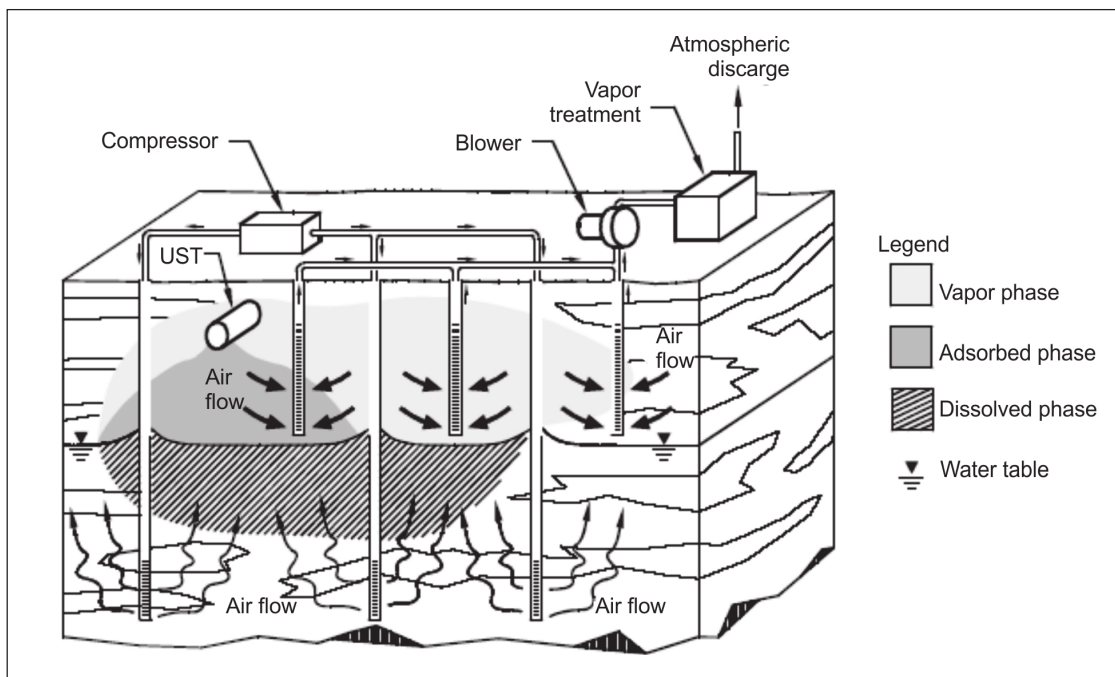
Por otro lado, en el ‘biosparging’ o ‘air sparging’ se inyecta aire directamente en la zona saturada. El aire vaporiza los contaminantes disueltos en el agua o atrapados por capilaridad en los poros. Los contaminantes vaporizados son arrastrados por las burbujas de aire hasta la zona no saturada, donde son biodegradados y/o recuperados con un sistema complementario tipo SVE (extracción de vapores).

c ‘Bioslurry’.

Esta técnica consiste en un tratamiento controlado del suelo en un biorreactor. Tras la excavación del suelo, lo primero es proceder a la separación física de piedras y gravas. Los suelos son entonces mezclados con agua en una concentración predefinida que depende de la concentración del contaminante, del ratio de biodegradación y de la naturaleza física del suelo. La arena limpia puede ser descargada del proceso llevando únicamente al biotratamiento los finos y las aguas de lavado. Típicamente las suspensiones o papillas (‘slurries’) contienen entre el 10% y el 40% de sólidos en peso.

En el biorreactor se pueden controlar la presencia de nutrientes, microorganismos, oxígeno y pH, para favorecer la biodegradación. Una vez finalizado el proceso, el lodo resultante es desecado y los suelos tratados pueden ser devueltos a su emplazamiento de origen.

Figura 2. Sistema de Biosparging



Tomada de 'How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers' (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; EPA 510-R-04-002).

d 'Landfarming' y biopilas

Con estas tecnologías se somete al suelo a un tratamiento en lechos sobre una solera impermeable, con sistemas de recolección de lixiviados para evitar la fuga de contaminantes. Se controla la humedad, la temperatura, los nutrientes y el oxígeno a fin de propiciar la biodegradación. Son sistemas relativamente sencillos de usar y de mantener, aunque ocupan mucho lugar y los tiempos de recuperación del suelo pueden ser largos (Christopher et al., 2004).

Landfarming

Su práctica habitual consiste en excavar el suelo contaminado y extenderlo en lechos poco profundos (unos 50 cm), en una plataforma impermeable con un sistema incorporado para recoger cualquier lixiviado. Periódicamente se ara (oxigenación y mejora de la bioaccesibilidad), se riega y se añaden nutrientes (abonos comerciales o bien fertilizantes oleofílicos), y en ocasiones un surfactante si el suelo es muy arcilloso. Para todos

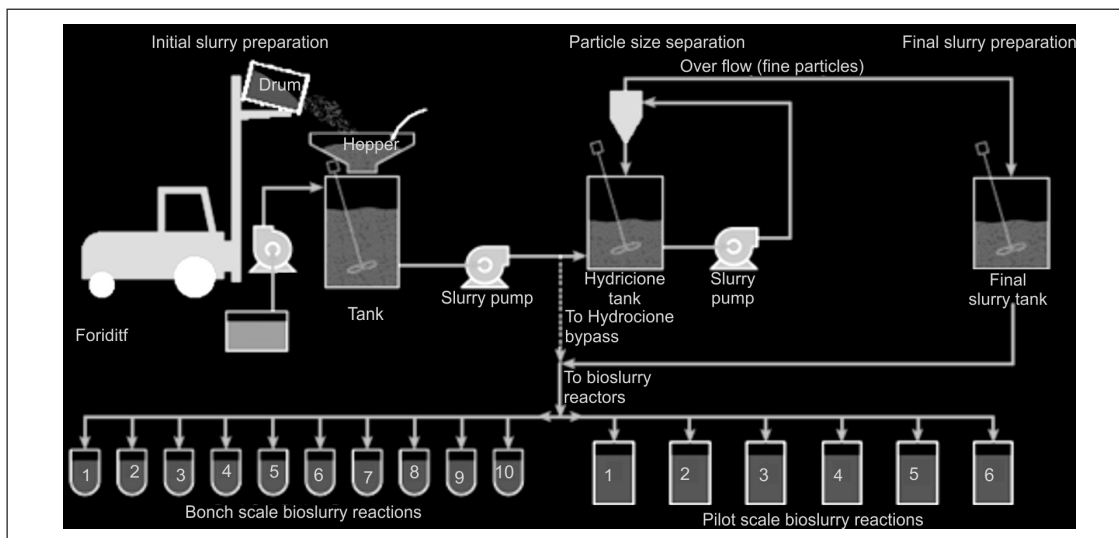
estos parámetros existen parámetros óptimos de aplicación, aunque suele primar el empirismo (Gallego et al, 2001).

Ésta técnica agrícola, es barata y efectiva para un amplio rango de hidrocarburos, típica en refinерías o en grandes espacios de trabajo en zonas de producción. El landfarming ha sido exitoso en el tratamiento de los hidrocarburos de petróleo tales como gasoil, queroseno, lodos de hidrocarburos, preservantes de maderas (creosota), hidrocarburos policíclicos aromáticos en general, residuos de la obtención del coque de petróleo, etc (González-Rojas, 2009).

Son en realidad una variante del landfarming que consiste en la formación de pilas de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado. Estas pilas pueden ser aireadas de forma activa o con una extracción de vapores, volteando la pila, o bien de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación conectados a una soplante.

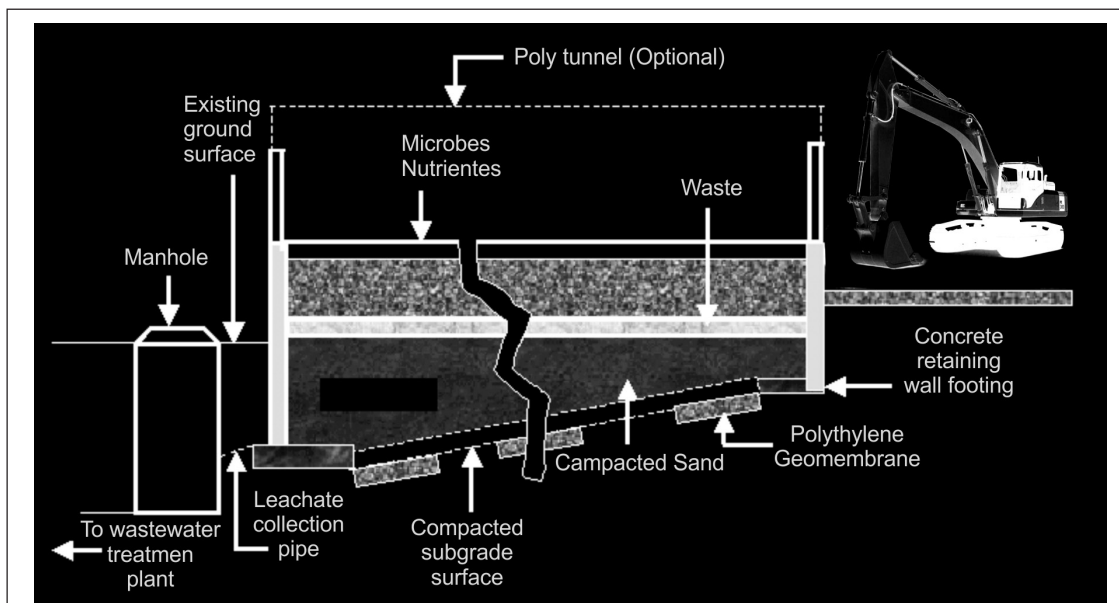
Con tierras excesivamente arcillosas puede ser conveniente añadir algún material estructurante

Figura 3. Esquema de tratamiento de 'bioslurry' con múltiples reactores



(www.epa.gov).

Figura 4. Diagrama conceptual con los elementos principales para la formación de un landfarming. *Biopilas*



(virutas de madera, paja seca, etc.) e incluso materia orgánica (compost). Al no requerir laboreo, como en el landfarming, y no estar limitada la profundidad del lecho a una capa aerobia (30 - 50 cm), puede admitir un mayor volumen de tierras en la misma superficie.

En principio, las biopilas se pueden aplicar al petróleo y la mayoría de sus derivados, aunque

son más eficaces en los compuestos de carácter ligero, combinadas entonces con un sistema de extracción de vapores.

e Compostaje

El compostaje es un proceso biológico aerobio en el que los hidrocarburos son biodegradados en parte, y en parte también transformados en ma-

teria orgánica tipo humus. El funcionamiento del proceso (en hileras o en pilas estáticas) requiere de la optimización de la aireación, temperatura, humedad y pH. Aunque su uso no es demasiado habitual, puede dar buenos resultados en mezclas de hidrocarburos pesados, refractarias a otros tipos de biorremediación. El producto obtenido se denomina "compost", y es un buen abono de liberación lenta y un excelente regenerador orgánico de suelos (González-Rojas, 2009).

Bibliografía

- Alexander, M. 1999 Biodegradation and Bioremediation, 2nd ed. Academic Press, London.
- Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Creminisi, C., Sprocati, A.R. 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Sci. Total Environ.* 407, 3024-3032
- Anderson, R.T., Lovley, D.R. 1999. Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-reducing conditions in petroleum-contaminated aquifers. *Bioremediation Journal* 3, 121-135.
- Anderson, R.T., Lovley, D.R. 2000. Anaerobic bioremediation of benzene under sulphate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology* 34, 2261-2266.
- Atlas, R.M., Unterman R. 1999. Bioremediation. En: Demain AL & Davies JE (Eds) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2nd ed (pp 666-681),
- Baggi, G., Cavalca, L., Francia, P., Zangrossi, M. 2004. Chlorophenol removal from soil suspensions: effects of a specialized microbial inoculum and a degradable analogue. *Biodegradation*, 15 (3): 153-160.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1834-1843.
- Bosma, T. N. P., Middeldorp, P. J. M., Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. (1997). "Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability". *Environmental Science & Technology*, 31(1), 248-252.
- Christopher, W., Kaplan, R., Christopher, L. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1777-1786.
- Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P., Schroeder, E.D. 1999. *Principios de biorrecuperación*. McGrawHill, Madrid.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C. 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology* 99, 5296-5308.
- Gallego, J.R., Loredó, J., Llamas, J.F., Vázquez, F., Sánchez, J. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* 12, 325-335.
- Gallego, J.R., González-Rojas, E., Peláez, A.I., García, M.J., Llamas J.F., Sánchez, J. 2003. *Estudio de aplicabilidad de técnicas de biorremediación en playas de Galicia afectadas por los vertidos del Prestige. XIX Congreso Nacional de Microbiología. Libro de abstracts. Santiago de Compostela.*
- Gallego, J.R., Menéndez-Vega, D., González-Rojas, E., Sánchez, J., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F., 2005. Oleophylic fertilizers and bioremediation: a new perspective. Book of abstracts, *Biomicroworld*. In: 1st Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Badajoz (Spain), pp. 714-715.
- Gallego, J.R., Fernández, L., Fernández, J.R., Díez-Sanz, F., Ordoñez, S., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, J. 2006a. *On Site bioremediation and washing techniques in a cobble beach affected by the Prestige oil spill, en "Recent Research Developments in Multidisciplinary Applied Microbiology. Understanding and Exploiting Microbes and Their Interactions. Biological, Physical, Chemical and Engineering Aspects". Wiley-VCH, pp. 544-548. ISBN: 3-527-31611-6.*
- Gallego, J.R., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, J., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F.

- 2006b. *Effectiveness of bioremediation for the Prestige fuel spill: a summary of case studies in "Advanced Technology in the Environmental Field"*. L. Ubertini, Ed. ACTA Press, Zürich. pp. 68-73. ISBN: 088986-552-3.
- Gallego, J.R., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, J., García-Martínez, M.J., Ortiz, J.E., Torres, T., Llamas, J.F. 2006c. *Natural attenuation and bioremediation of Prestige fuel oil in Atlantic coasts of Galicia (Spain)*. *Organic Geochemistry* 37, 1869-1884.
- Gallego J.R., Fernández, J.R., Díez-Sanz, F., Ordóñez, S., Sastre, H., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, J. 2007a. *Bioremediation for shoreline cleanup: in situ vs. on site treatments*. *Environmental Engineering Science*, 24, 493-524
- Gallego, J.R., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F., Belloch, C., Peláez, A.I., Sánchez, J. 2007b. *Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia*. *Biodegradation* 18, 269-281.
- Gibson and Saylor, 1992 *The American Academy of Microbiology*.
- González-Rojas, E. *Técnicas de biorremediación en litorales afectados por el vertido de fuel pesado del Prestige*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo - España. Julio de 2009
- González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez Martín, J., García, M.J., Llamas J.F., Fernández Berceuelo, I., Álvarez García, R., Rodríguez Gallego, J.L. 2004. *Avances en biorremediación de vertidos marinos de hidrocarburos. El caso del Prestige*. BIOTEC 2004, Congreso Nacional de Biotecnología. Publicación en el libro de abstracts con ISBN 84-609-1771-1, Oviedo.
- Hughes, B.J., Neale, C.N., Ward, C.H. 2000. *Bioremediation*. In: Lederberg J (Ed) *Encyclopedia of Microbiology* 2nd ed., Vol. 1, pp. 587-609. Academic Press, NY.
- Jahn, M.K., Haderlein, S.B., Meckenstock, R.U. 2005. *Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene in sediment-free iron-reducing enrichment cultures*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3355-3358.
- Johnsen, A.R., Winding, A., Karlson, U., Roslev, P. 2002. *Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labelled cell lipids*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6106-6113.
- Johnson, K., Ghosh, S. 1998. *Feasibility of anaerobic biodegradation of PAHs in dredged river sediments*. *Water Science and Technology* 38, 41-48.
- Jorgensen, K.S. 2007. *In situ bioremediation*. *Advances in Applied Microbiology* 61, 285-305.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B. 1994. *Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic hydrocarbons (PAH)*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 267-273.
- Kerr, R.S. 1994. *Handbook of bioremediation*. Lewis Publishers, NY.
- Kao, C.M., Prosser, J. 2001. *Evaluation of natural attenuation rate at a gasoline spill site*. *Journal of Hazardous Materials* 82, 275-289.
- King, R.B., Long, G.M., Sheldon, J.K. 1997. *Practical environmental bioremediation, the field guide*. Lewis Publishers, NY.
- Lima, D., Viana, P., André, S., Chelinho, S., Costa, C., Ribeiro, R., Sousa, J.P., Fialho, A.M., Viegas, C.A. 2009. *Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: the effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches*. *Chemosphere* 74, 187-192.
- Llamas, J.F., García-Martínez, M.J., Gallego, J.R., García, R., Sánchez, J., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, I., Sordo, L. 2003. *Evaluación y aplicación de técnicas de biorremediación en tres playas de la costa de Muxía, Industria y Minería* 352, 19-24.
- McNally, D.L., Mihelcic, J.R., Lueking, D.R. 1998. *Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions*. *Environmental Science and Technology* 32, 2633-2639.
- Menéndez-Vega, D., Gallego, J. R., Peláez, A.I., Fernández de Córdoba, G., Moreno, J., Muñoz, D., Sánchez, J. 2007. *"In situ" bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered*

- hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*, 43, 310-321.
- Mills, M.A., Page, C.A., Autenrieth, R.L. 2003. Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. *Marine Pollution Bulletin* 46, 887-899.
- Morra, M.J. 1996. Bioremediation in soil: influence of soil properties on organic contaminants and bacteria. p. 35-60.
- Nikolova, N., Nenov, V. 2005. BTEX degradation by fungi. *Water Science Technology* 51, 87-93.
- Niu, G.L., Zhang, J.J., Zhao, S., Liu, H., Boon, N., Zhou, N.Y. 2009. Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL73. *Environ Pollut.* 157, 763-771.
- Potin, O., Veignie, E., Rafia, C. 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 51 (1): 71-78.
- Prenafeta-Boldu, F.X., Ballerstedt, H., Gerritse, J., Grotenhuis, J.T. 2004. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Biodegradation*, 15 (1): 59-65.
- Providenti, M.A., Lee H., Trevors, J.T. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J. Ind. Microbiol.* 1, 379-395.
- Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. CRC Press. Lewis publishers, NY.
- Rockne, K.J., Chee-Sanford, J.C., Sandford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T., 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1595-1601.
- Rosenberg, E. and E.Z. Ron. 1996. Bioremediation of petroleum contamination. In: *Bioremediation: Principles and Applications*. R.L. & D.L. Crawford (eds).
- Sánchez, J., Gallego, J.R. 2005. Biorremediación: conceptos esenciales y ámbitos de aplicación en "Biotecnología y Medioambiente". I. Marín, J.L. Sanz, R. Amils (Eds), Ephemera, Madrid, 61-75.
- Shibata, A., Inoue, Y., Katayama, A. 2006. Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils. *The Science of the Total Environment* 367, 979-987.
- Singh, S., Kang, S.H., Mulchandani, A., Chen, W. 2008. Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 437-444.
- Spain, J., 1997. Organic chemicals with potential for natural attenuation. *Bioremediation J.* 1, 1-10.
- Villas-Boas, S.G., Bruheim, P. 2007. The potential of metabolomics tools in Bioremediation studies. *Omics-A journal of Integrative Biology* 11, 305-313
- Viñas, M., Grifoll, M., Sabaté, J., Solanas, A.M. 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 252-260.
- Walter, M. V. 1997. Bioaugmentation In Hurst, Ch. J., Knudsen, Gra. McInerney, M. J., LStetzenbach, L. D. and Walter, M. V. *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology. Eashington D. C. pp:753-757.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 237-241.
- Weiner, J.M., Lovley, D.R. 1998. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1937-1939.
- Wood, T.K. 2008. Molecular approaches in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 572-578.
- Young, L.; Cerniglia, C. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley & Liss. New York. pp 629
- Zhao, B., Poh, C.L. 2008. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics* 8, 874-881.