

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**ESTRATEGIAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS  
POR TRICLOROETILENO BASADAS EN EL USO DE  
VERMICOMPOST DE ALPERUJO Y ESPECIES VEGETALES CON  
POTENCIAL FITORREMEDIADOR**

**TESIS DOCTORAL**

**Beatriz Moreno Sánchez**

**Granada, 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Beatriz Moreno Sánchez  
D.L.: GR. 2103-2009  
ISBN: 978-84-692-2716-9



**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**ESTRATEGIAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR  
TRICLOROETILENO BASADAS EN EL USO DE VERMICOMPOST DE  
ALPERUJO Y ESPECIES VEGETALES CON POTENCIAL  
FITORREMEDIAADOR**

**Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Ambientales**

**Beatriz Moreno Sánchez**

**para aspirar al Título de Doctor**

**Fdo.: Beatriz Moreno Sánchez**

**VºBº de los Directores de la Tesis Doctoral**

**Fdo.: Emilio Benítez León  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Científico Titular del CSIC**

**Fdo.: Rogelio Nogales Vargas-Machuca  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Investigador Científico del CSIC**

**Universidad de Granada**

**2009**



Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Protección Ambiental (Grupo de investigación "Relaciones Planta-Suelo") de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada). El presente estudio se encuadró dentro de los objetivos científicos-técnicos propuestos en los Proyecto de investigación subvencionados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y cofinanciado con fondos FEDER REN2003-05359 "*Recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos alifáticos clorados. Estrategias de descontaminación basadas en el uso combinado de enmiendas orgánicas con elevada actividad hidrolítica y especies vegetales mediterráneas con potencial fitorremediador*" y CGL2006-05437 "*Biodiversidad bacteriana, actividad bioquímica y calidad de la materia orgánica del suelo: bioindicadores de sostenibilidad agrícola en agroecosistemas mediterráneos de olivar*". Para la realización del presente trabajo la Lda. Beatriz Moreno Sánchez disfrutó de una Beca Predoctoral de Formación de Personal de Investigación (FPI) del MEC asociada al proyecto REN2003-05359.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral se encuentran en revisión o ya han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Vivas A., **Moreno B.**, García Rodríguez S., Benítez E. (2009) Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. **Bioresource Technology** 100: 1319-1326

**Moreno B.**, Vivas A., Nogales R., Benitez E. (2009) Solvent tolerance acquired by *Brevibacillus brevis* during an olive-waste vermicomposting process. **Ecotoxicology and Environmental Safety (Enviado)**

**Moreno B.**, Vivas A., Nogales R., Macci C., Masciandaro G., Benitez E. (2008) Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes. **Environmental Science and Pollution Research DOI 10.1007/s11356-008-0035-y**

**Moreno B.**, Nogales R., Benitez E. (2009) Microbial Eco-physiological Profiles to Estimate the Effectiveness of Rhizoremediation of Trichloroethylene-Contaminated Soils. **FEMS Microbial Ecology (Enviado)**





# ÍNDICE





# ÍNDICE

## Introducción

<b>1. La Industria del Aceite de Oliva</b> .....	3
1.1. El Olivo .....	3
<b>1.2. Elaboración del Aceite de Oliva</b> .....	4
<b>1.3. Valorización de los Residuos Obtenidos en la Extracción de Aceite de Oliva por el Sistema de Centrifugación de Dos Fases</b> .....	6
<b>1.3.1. Tratamientos Físico-Químicos</b> .....	7
1.3.1.1. Secado y Extracción de Aceite de Orujo .....	7
1.3.1.2. Cogeneración de Energía .....	7
1.3.1.3. Producción de Carbón Activo .....	8
<b>1.3.2. Tratamientos Biotecnológicos</b> .....	8
1.3.2.1. Digestión Anaerobia .....	8
1.3.2.2. Fermentación en Estado Sólido .....	8
1.3.2.3. Detoxificación Fúngica .....	8
1.3.2.4. Compostaje y Vermicompostaje .....	9
<b>2. Compostaje y Vermicompostaje</b> .....	9
2.1. Compostaje .....	9
2.2. Vermicompostaje .....	10
<b>2.3. Estabilidad y Madurez de Composts y Vermicomposts. Condición para su Aplicación al Suelo</b> .....	14
<b>3. Los Hidrocarburos Alifáticos Halogenados</b> .....	16
3.1. Características Generales .....	16
3.2. Tricloroetileno (TCE) .....	17
<b>4. Mecanismos Bacterianos de Resistencia y Degradación de Solventes</b> .....	18

<b>4.1. Mecanismos Bacterianos de Resistencia a Solventes</b> .....	18
<b>4.1.1. Modificaciones de la Membrana Celular</b> .....	18
<b>4.1.2. Bombas de Expulsión</b> .....	19
<b>4.2. Mecanismos Bacterianos de Degradación de Solventes</b> .....	20
<b>4.2.1. Degradación Anaeróbica</b> .....	21
<b>4.2.2. Degradación Aeróbica</b> .....	21
<b>5. Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos Alifáticos Clorados</b> .....	22
<b>5.1 Características Generales</b> .....	22
<b>5.2 Tipos de Procesos de Biorremediación</b> .....	23
<b>5.2.1. Biorremediación Intrínseca o Atenuación Natural</b> .....	23
<b>5.2.2. Biorremediación Dirigida</b> .....	24
<b>5.2.2.1. Bioestimulación</b> .....	24
<b>5.2.2.2. Bioestimulación</b> .....	24
<b>5.2.2.3. Fitorremediación</b> .....	25
<b>5.3 Formas de Aplicación de los Procesos de Biorremediación</b> .....	27
<b>5.3.1. Biorremediación "In Situ"</b> .....	27
<b>5.3.1.1. Bioventing</b> .....	27
<b>5.3.1.2. Inyección de Peróxido de Hidrógeno</b> .....	28
<b>5.3.1.3. Aplicación de Compost o Vermicompost</b> .....	27
<b>5.3.2. Biorremediación "Ex Situ"</b> .....	29
<b>5.3.2.1. Laboreo Agrícola o "Landfarming"</b> .....	29
<b>5.3.2.2. Biopilas</b> .....	29
<b>5.3.2.3. Compostaje y Vermicompostaje</b> .....	30
<b>5.3.2.4. Biorreactores</b> .....	30
<b>5.4 Bioindicadores de los Procesos de Biorremediación</b> .....	31
<b>5.4.1. Actividad Microbiana</b> .....	32
<b>5.4.2. Biomasa Microbiana</b> .....	34
<b>5.4.3. Diversidad Microbiana</b> .....	35
<b>Interés del trabajo. Objetivos</b> .....	39

## **Materiales**

<b>1. Residuos Orgánicos Seleccionados</b> .....	43
<b>2. Vermicompost de Alperujo</b> .....	43
<b>3. Compost de Alperujo</b> .....	45
<b>4. Suelo</b> .....	46
<b>5. Métodos Utilizados para el Análisis de los Residuos Orgánicos y Suelo.</b> .....	48
<b>5.1. Análisis Granulométrico (M.A.P.A., 1986)</b> .....	48
<b>5.2. pH (M.A.P.A., 1986)</b> .....	48
<b>5.3. Conductividad Eléctrica (M.A.P.A., 1986)</b> .....	48
<b>5.4. Carbonato Total del Suelo (M.A.P.A., 1986)</b> .....	48
<b>5.5. Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)</b> .....	49
<b>5.6. Bases de cambio</b> .....	49
<b>5.7. Carbono Orgánico Total (M.A.P.A., 1986)</b> .....	49
<b>5.8. Carbono Hidrosoluble</b> .....	49
<b>5.9. Carbono Extraíble Total y Ácidos Húmicos</b> .....	49
<b>5.10. Polifenoles Totales Extractables (Clifford &amp; Ramírez-Martínez 1991b; Khazaal y col., 1994)</b> .....	50
<b>5.11. Nitrógeno Kjeldahl Total (Jackson, 1970)</b> .....	50
<b>5.12. Análisis de otros Elementos. Mineralización Nítrico-Perclórica de las Muestras (AOAC, 1984)</b> .....	50
<b>5.13. Fósforo Total del Mineralizado (C.I.I., 1969)</b> .....	50
<b>5.14. Potasio Total del Mineralizado (C.I.I., 1969)</b> .....	50
<b>5.15. Calcio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre y Zinc del Mineralizado</b> .....	50
<b>5.16. Análisis de la Fitotoxicidad (Zucconi y col., 1981a)</b> .....	51

<b>6. Tricloroetileno (TCE)</b> .....	51
---------------------------------------	----

## **Resultados**

### **Capítulo 1. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste**

<b>Resumen</b> .....	57
<b>Introduction</b> .....	59
<b>Methods</b> .....	60
<b>Results</b> .....	62
<b>Discusion</b> .....	65
<b>Conclusions</b> .....	66
<b>References</b> .....	66

### **Capítulo 2. Solvent tolerance acquired by *Brevibacillus brevis* during an olive-waste vermicomposting process**

<b>Resumen</b> .....	71
<b>Introduction</b> .....	73
<b>Materials and methods</b> .....	74
<b>Results</b> .....	75
<b>Discusion</b> .....	76
<b>Conclusions</b> .....	78
<b>References</b> .....	78

### **Capítulo 3. Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes**

<b>Resumen</b> .....	83
<b>Background, aim and scope</b> .....	86

<b>Materials and Methods</b> .....	87
<b>Results</b> .....	90
<b>Discusion</b> .....	90
<b>Conclusions and perspectives</b> .....	95
<b>References</b> .....	95

**Capítulo 4. Microbial eco-physiological profiles to estimate the effectiveness of rhizoremediation of trichloroethylene-contaminated soils**

<b>Resumen</b> .....	99
<b>Introduction</b> .....	101
<b>Materials and methods</b> .....	102
<b>Results</b> .....	104
<b>Discusion</b> .....	106
<b>Conclusions</b> .....	110
<b>References</b> .....	110
<b>Discusión General</b> .....	115
<b>Conclusiones</b> .....	129
<b>Bibliografía</b> .....	133



# **INTRODUCCIÓN**

**[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]**





## Introducción

### 1. La Industria del Aceite de Oliva

#### 1.1. El Olivo

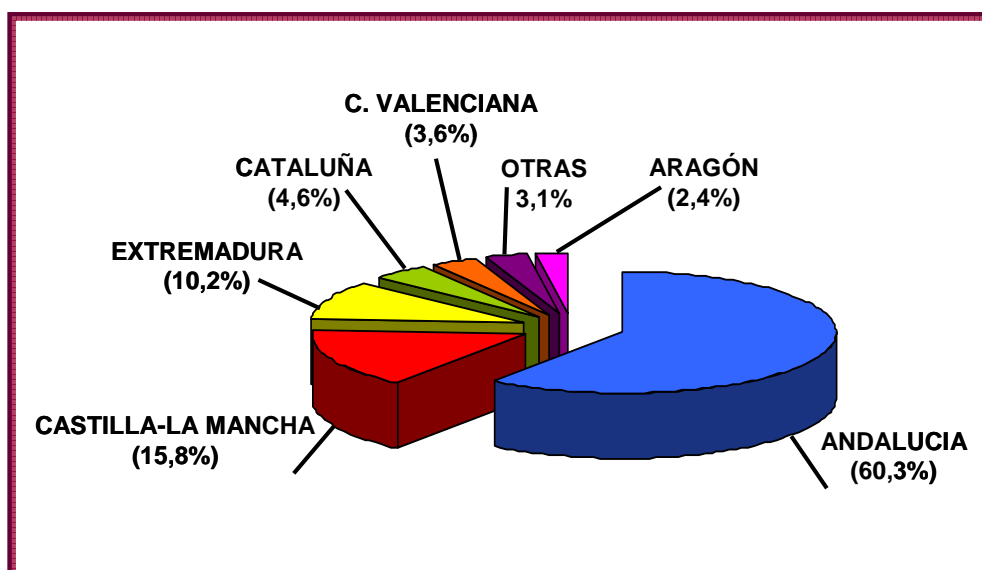
El olivo (*Olea europaea*) es una variedad doméstica del acebuche (*olea europaea var. sylvestris*). Originario del Oriente Próximo, logró una rápida expansión durante el periodo clásico, pasando a través de Egipto a Grecia y a la península italiana. Fenicios y griegos fueron los introductores de este cultivo en Andalucía, que, durante los siglos XVI y XVII pasó a América. Actualmente también se cultiva en Sudáfrica, China, Japón y Australia.

La adaptabilidad de esta especie a las condiciones ecológicas de la cuenca mediterránea es proverbial. Son realmente pocas las limitaciones que el medio ofrece a la extensión del olivo: se afianza en todo tipo de suelos (salvo aquéllos excepcionalmente húmedos o salinos), coloniza altitudes incluso superiores a los dos mil metros y soporta condiciones climáticas extremas (precipitaciones de menos de 200 milímetros anuales, altas temperaturas, heladas, etc.).

Su hábitat se concentra entre las latitudes 30° y 45° tanto en el Hemisferio Norte como en el Sur, en todas aquellas regiones con un clima Mediterráneo, concentrándose en los países de esta región el 98% del área mundial cultivada.

España ocupa el primer lugar tanto por la superficie dedicada al cultivo de olivar (2 513.419 Ha) como por el número de olivos productivos (215.000.000) (MAPA, 2008). La producción de aceite de oliva en España supone un 43 % del total mundial, aunque este porcentaje varía dependiendo de la campaña oleícola. En la campaña 2007-2008 la producción de aceite de oliva se estimó en 1.220.400 Tm. Aunque este cultivo se encuentra distribuido en varias comunidades autónomas españolas (Figura 1), un 60,3% de la superficie cultivada y casi un 85 % de la producción de aceite en España se concentran en Andalucía.

**Figura 1.** Distribución de la superficie de olivar por comunidad autónoma. Fuente: S.G de Estadísticas Agroalimentarias. ESYRCE 2007. MAPA



### 1.2. Elaboración del Aceite de Oliva

El aceite de oliva virgen es el zumo oleoso de las aceitunas separado de los demás componentes, cuando se obtiene por sistemas de extracción adecuados y procede de frutos frescos y de buena calidad, sin defectos ni alteraciones, y con la adecuada madurez. El aceite de oliva posee excepcionales características de aspecto, fragancia y sabor, siendo prácticamente el único de los aceites vegetales que puede consumirse crudo. Conserva íntegro su contenido en vitaminas y ácidos grasos esenciales (Alba, 1998). El aceite de oliva es el que más se consume en España, ya que representa el 53% del consumo per capita del aceite vegetal (11,71 l año<sup>-1</sup> sobre un total de 22,2 l año<sup>-1</sup>) (Parras y Torres, 1994).

Antes de proceder a la extracción de aceite de oliva se deben llevar a cabo diferentes operaciones preliminares tales como:

- **Limpieza** de las aceitunas recolectadas mediante aire, para eliminar los objetos menos pesados que la aceituna, y agua, para solubilizar y separar los cuerpos más pesados. Durante esta operación se generan dos subproductos, hojas de olivo u hojín y aguas de lavado de aceitunas.
- **Molienda** de las aceitunas, donde se rompen los tejidos vegetales de las mismas, dejando libres los glóbulos de aceite que van uniéndose entre sí para formar gotas de tamaño variable.
- **Batido** de las aceitunas, proceso que facilita la reunión de los glóbulos de aceite en gotas de mayor tamaño. En este proceso se controla la temperatura, debido fundamentalmente a las alteraciones que se pueden producir en el aceite a temperaturas superiores a 25 °C, que hacen que los componentes volátiles que determinan al aroma se pierdan o se degraden rápidamente.
- **Extracción** del aceite de oliva, que puede llevarse a cabo por tres diferentes sistemas: el sistema tradicional de molinos y prensas, el sistema de centrifugación de tres fases y el sistema de centrifugación de dos fases.
- **Purificación** del aceite de oliva, donde se lava el aceite extraído en el proceso anterior para obtener el aceite de oliva virgen. Durante este proceso se genera un residuo: las aguas de lavado del aceite.

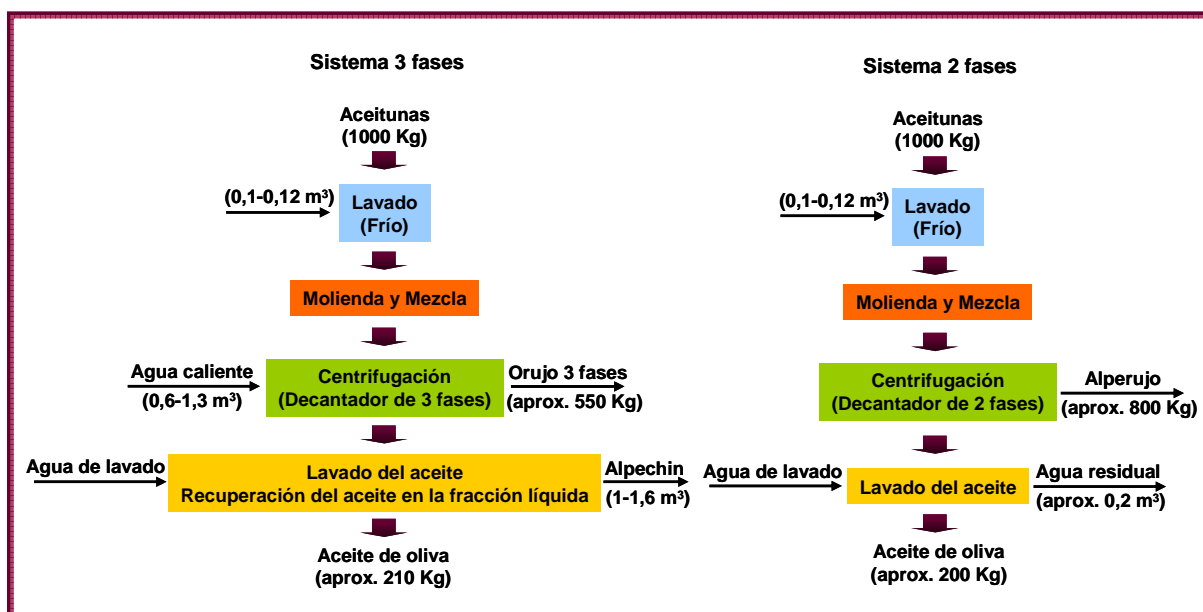
Los sistemas de obtención del aceite de oliva han experimentado en las últimas décadas una profunda transformación, dirigida fundamentalmente a: mejorar los rendimientos y la productividad de la industria oleícola, obtener aceites de oliva de gran calidad, reducir los consumos de agua y energía y, evitar en lo posible la generación de subproductos o residuos, algunos de los cuales presentan un elevado potencial contaminante. Estos cambios se han circunscrito sobre todo al método de extracción.

De ese modo, del tradicional sistema de molinos y prensas se pasó al sistema de centrifugación de tres fases (Figura 2), que automatizaba el proceso de extracción de aceite de oliva incrementando el rendimiento del proceso y, permitiendo la obtención de aceite de mayor calidad. Sin embargo, este sistema presentaba ciertos inconvenientes asociados al consumo de gran cantidad de agua y energía para llevar a cabo el proceso (Tabla 1), y a la generación de un gran volumen de residuos (Roig y col., 2006). Los residuos producidos

mediante este sistema son de dos tipos: los sólidos, denominados orujo tres fases, y los líquidos conocidos como alpechines. Los alpechines se producen a razón de 1,25 litros por kg de aceitunas procesadas (Borja y col., 2006). Entre otras características, los alpechines poseen un elevado grado de contaminación orgánica (valores muy altos de la demanda química de oxígeno), pH ácido (entre 3 y 6), elevada conductividad eléctrica, y alto contenido en polifenoles (López-Camino, 1993; González-López y col., 1994) que los convierte en residuos altamente contaminantes.

Durante años los alpechines fueron vertidos de forma incontrolada a suelos y ríos, lo que provocó un serio problema medioambiental en el área Mediterránea. Aunque se realizó un notable esfuerzo científico y técnico dirigido a reutilizar, directamente o previa transformación (desechación en balsas, compostaje mezclados con otros residuos orgánicos), estos efluentes con fines agroindustriales o industriales (Borja y col., 1993; Paredes y col., 2000; Tomati y col., 1995; Gallardo-Lara y col., 2000), los escasos avances alcanzados constituyeron uno de los principales argumentos que favorecieron la sustitución acelerada de los sistemas de centrifugación de tres por el de dos fases (Figura 2), un nuevo sistema de centrifugación que reducía en un 75% el total de residuos generados y evitaba la producción de alpechín (García Ortiz, Frías Ruiz, 1994).

**Figura 2.** Sistemas de centrifugación de tres fases y dos fases. (Alburquerque y col., 2004)



El sistema de centrifugación de dos fases se inició a finales de la campaña oleícola 91-92. Se denominó de centrifugación de dos fases al dar lugar a dos fracciones: una líquida, el aceite de oliva, y un residuo semi-sólido, el alperujo u orujo dos fases. Este sistema permite la separación del aceite de oliva con rendimientos similares a los obtenidos con el sistema de tres fases, pero de mayor calidad en términos de contenido en polifenoles (Niaounakis y Halvadakis, 2004). El aceite obtenido tiene mayor potencial antioxidante ya que las sustancias fenólicas que posee lo protegen del ataque del oxígeno del aire, impidiendo su enranciamiento (Sequeiros y col., 1995, Uceda y col., 1995). Este sistema de centrifugación reduce el consumo de energía hasta un 20% y la cantidad de agua hasta 1m<sup>3</sup> por Tm de aceite (Tabla 1) necesarios para llevar a cabo el proceso de extracción (Sequeiros y Méndez, 1995). Por estas razones, desde su implantación, el sistema de dos fases se ha generalizado en todos los países productores de aceite de oliva. Así, en España casi un 90% de la

extracción del aceite de oliva se lleva a cabo por el sistema de dos fases, el 7% mediante el sistema de tres fases y 3% restante por medio de las prensas tradicionales. A pesar de todas las ventajas que presenta el sistema de centrifugación de dos fases frente al de tres fases, este nuevo sistema genera un nuevo residuo, el alperujo u orujo dos fases con características diferentes de los residuos obtenidos anteriormente con los otros sistemas, pero con un similar potencial tóxico para microorganismos y plantas.

**Tabla 1.** Consumo de agua ( $l\ kg^{-1}$ ) de los diferentes sistemas de elaboración del aceite de oliva (Adaptado de Sequeiros y Méndez, 1995)

Procesos	Presión	Centrifugación	
		3 fases	2 fases
<b>Lavado aceitunas <math>l\ kg^{-1}</math></b> (Aguas de lavado de aceitunas)	0.04	0.09	0.05
<b>Separación sólido-líquido <math>l\ kg^{-1}</math></b> (Alpechín)	0.40	0.90	0.00
<b>Separación líquido-líquido <math>l\ kg^{-1}</math></b> (Aguas de lavado del aceite)	0.20	0.20	0.15
<b>Limpieza en general <math>l\ kg^{-1}</math></b>	0.02	0.05	0.05
<b>Efluente total <math>l\ kg^{-1}</math></b>	0.66	1.24	0.25

### 1.3. Valorización de los Residuos Obtenidos en la Extracción de Aceite de Oliva por el Sistema de Centrifugación de Dos Fases

Como ya se ha indicado anteriormente, la extracción de aceite de oliva por el sistema de centrifugación de dos fases genera subproductos de diferente tipología. Una descripción más detallada de los mismos aparece a continuación.

- **Líquidos:** constituidos por las **aguas de lavado de aceitunas, de lavado de aceite y de la limpieza de almazaras**. Estas aguas pueden ser reutilizadas para riego, aunque para ello deben ajustarse en su composición a las mismas restricciones impuestas por el Ministerio de Medio Ambiente para las aguas destinadas a ese fin:  $600\ mg\ kg^{-1}$ , DBO:  $2000\ mg\ kg^{-1}$  y DQO:  $2500\ mg\ kg^{-1}$ . Además deben cumplir el requisito de aviso previo y una limitación al esparcimiento en el terreno de  $30\ m^3\ ha^{-1}$  cada siete días.
- **Sólidos:** constituidos por las **hojas de olivo u hojín**. Se genera durante la limpieza de las aceitunas en las almazaras. Pueden ser utilizados en alimentación animal o como materiales estructurantes en procesos de compostaje y vermicompostaje. Además las hojas del olivo son una fuente de compuestos antioxidantes y se venden en herbolarios para su uso en infusiones con propiedades antioxidantes y diuréticas.
- **Semi-sólidos:** constituido por el **orujo dos fases o alperujo**. El alperujo está formado por un residuo sólido (mezcla de restos de hueso y de pulpa de las aceitunas) y por el agua de vegetación de la aceituna procesada. Su composición final se ve afectada por un gran número de factores: proceso de producción, estado de madurez y variedad de la aceituna, condiciones agronómicas y edafoclimáticas del cultivo, tiempo de almacenamiento, etc. Roig y col. (2006) recopilaron las propiedades de diferentes alperujos de oliva determinadas por numerosos autores y concluyeron que este residuo tiene un pH ligeramente ácido (5-5,5), elevada relación

C/N (30-55), alto contenido en materia orgánica (>90%) y es rico en potasio (15-25 g/Kg). Su contenido en lignina también es elevado (35-45%), aunque depende notablemente del rendimiento del proceso de extracción. El reducido tamaño de partícula del alperujo junto con su alto contenido de humedad, entre el 55% y el 70%, hacen de él un material con una textura semi-sólida, poco porosa, plástica y susceptible a la compactación. Estas características encarecen y dificultan su manipulación y transporte. Además el alperujo presenta una fracción pequeña pero activa de compuestos fenólicos (Alburquerque y col. 2004), los cuales están relacionados con la toxicidad que ejerce este residuo sobre los microorganismos (Benitez y col. 2004) y sobre la germinación de semillas vegetales (Saavedra y col. 2006). La presencia de estos compuestos en el alperujo, junto con su elevado contenido en constituyentes lipídicos, hacen del mismo un residuo muy contaminante, que debe ser tratado y transformado en un material inocuo antes de ser liberado al ambiente.

Las cantidades de residuos semi-sólidos producidas en el proceso de centrifugación de dos fases son enormes; sólo en Andalucía se generaron 3.100.000 Tm. de alperujo en la campaña oleícola 2006/07 (Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 2006). En esta región, la eliminación de este residuo procedente de la industria del olivar se ha convertido por tanto en un problema medioambiental de magnitud considerable.

El alperujo puede ser revalorizado mediante tratamientos físico-químicos y transformaciones biotecnológicas.

### 1.3.1. Tratamientos Físico-Químicos

#### 1.3.1.1. Secado y Extracción de Aceite de Orujo

En un principio se pensó revalorizar el alperujo de la misma manera que el orujo tres fases, esto es, secándolo y llevando a cabo una nueva extracción de aceite con solventes (el conocido como "aceite de orujo"). Pero el alto contenido en humedad del alperujo causaba problemas técnicos durante su secado en las almazaras tradicionales. Estos problemas condujeron a la búsqueda de nuevas formas de secado. Por ello, Krokida y col. (2002) diseñaron un "secador rotatorio industrial" económicamente viable. Posteriormente Arjona y col. (2005) desarrollaron un sistema que incrementaba la automatización del proceso y mejoraba la producción y la eficiencia energética.

Sin embargo, el secado del alperujo requería mayor consumo de energía y por lo tanto mayores costes. Debido a esto y al descenso en la demanda de aceite de orujo, surgió la necesidad de buscar otras alternativas para la revalorización del alperujo.

#### 1.3.1.2. Cogeneración de Energía

Tras la segunda extracción de aceite, se obtiene un residuo sólido, denominado orujo seco y extractado u orujillo, que puede ser usado como combustible para la obtención de energía (Masghouni y Hassairi, 2000). Estos sistemas originan beneficios para las almazaras y empresas oleícolas por la venta del excedente de energía y por las ayudas que concede tanto la Junta de Andalucía como el Gobierno Central. Presenta la ventaja de necesitar poco terreno para su implantación, y reduce el peso de los alperujos en un 70% y el volumen en un 80-90%. Sin embargo, gran parte de la energía obtenida se utiliza para secar el alperujo fresco siendo baja la energía total recuperada (Azbar y col., 2004). Por otro lado, este sistema genera una gran cantidad de **cenizas**, que aunque pueden ser reutilizadas como

## **Introducción**

enmiendas inorgánicas para el suelo (Nogales y col., 2006), normalmente son abandonadas en vertederos adyacentes.

La gasificación de biomasa es un nuevo método físico-químico que consiste en transformar la biomasa sólida en gas sintético o "singas". Este gas sintético está formado por una mezcla de  $\text{CO}$  y  $\text{H}_2$  y se utiliza para obtener productos químicos tales como  $\text{CH}_3\text{OH}$  o  $\text{NH}_3$ , así como para preparar combustible sintético. Los subproductos obtenidos durante la extracción de aceite de oliva han sido propuestos como materia prima para la producción de "singas" (Jurado y col., 2003).

### **1.3.1.3. Producción de Carbón Activo**

En la búsqueda de nuevas vías de reutilización de los alperujos, que permitan su tratamiento y la valorización de sus diversos componentes, se ha desarrollado un sistema de separación y centrifugación, en el que los componentes del alperujo se dividen obteniendo tres fracciones diferenciadas: **pulpa + piel, huesos triturados de aceituna y alpechín concentrado (REF)**. Parte de los huesos triturados se utilizan para la obtención de carbón activo. Estos residuos sólidos son carbonizados a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  y posteriormente activados mediante aire, vapor de agua o  $\text{CO}_2$  a  $850\text{ }^\circ\text{C}$  (Mameri y col., 2000)

## **1.3.2. Tratamientos Biotecnológicos**

### **1.3.2.1. Digestión Anaerobia**

La digestión anaerobia produce biogas, que es una mezcla de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , y materia orgánica parcialmente estabilizada. El biogas puede ser utilizado para obtener energía y la materia orgánica como sustrato para el suelo. Tekin y Dalgıç (2000) produjeron biogas a partir de orujo de oliva y observaron que su contenido en metano se encontraba entre el 75 y el 80%. En otro estudio a escala de laboratorio enfocado a producir la digestión anaerobia del alperujo en condiciones mesofílicas, se determinó que la producción de gas metano era reproducible a la del estudio anterior con una desviación inferior al 10% (Borja y col., 2003). Sin embargo, la concentración de alperujo actuaba como factor limitante en la producción de metano, principalmente debido al aumento en el contenido de compuestos fenólicos y a la biotoxicidad del residuo a medida que aumenta la concentración del mismo.

### **1.3.2.2. Fermentación en Estado Sólido**

El alperujo también se ha propuesto como alimento para ganado (Molina Alcaide y Nefzaoui, 1996). Sin embargo, el alperujo contiene gran cantidad de fibras poco digeribles y baja concentración de proteínas. Por ello la fermentación sólida puede mejorar las propiedades nutricionales del alperujo. Este proceso es llevado a cabo por microorganismos en un medio sólido y se ha utilizado para la producción de alimentos animales, combustible y enzimas. Haddadin y col. (1999) utilizaron esta técnica para incrementar el porcentaje de proteínas del orujo seco y extractado u orujillo desde un 5,9% hasta un 40,3%.

### **1.3.2.3. Detoxificación Fúngica**

La detoxificación de estos residuos ha sido abordada mediante el tratamiento con ciertas especies de hongos (Sampedro y col., 2004; Aranda y col., 2006; Saavedra y col., 2006), obteniéndose un subproducto orgánico con unas características apropiadas para su posterior uso como enmendante del suelo.

### **1.3.2.4. Compostaje y Vermicompostaje**

El elevado contenido en materia orgánica que presentan estos residuos los hace potenciales enmendantes orgánicos de suelos (Nogales y col., 1999; Albuquerque y col., 2004). Sin embargo, éstos no pueden ser aplicados directamente al suelo debido a su contenido en materia orgánica no estabilizada y polifenoles, los cuales les confieren propiedades fitotóxicas y antimicrobianas. Por tanto, para abordar la reutilización del alperujo como enmienda orgánica del suelo, este subproducto debe ser previamente estabilizado y biotransformado con objeto de obtener sustratos orgánicos estables, que eviten los efectos nocivos que estos residuos en crudo pueden generar sobre el suelo y los cultivos vegetales (Nogales y col., 1998).

El compostaje y el vermicompostaje son dos de los procesos más utilizados para la estabilización de residuos sólidos orgánicos. El compostaje implica la acción de los microorganismos para acelerar la degradación de la materia orgánica bajo condiciones controladas. En este proceso la materia orgánica pasa por una característica fase termofílica que desinfecta el residuo, eliminando los organismos patógenos del mismo (Lung y col., 2001). El vermicompostaje implica la acción conjunta de lombrices y microorganismos para llevar a cabo la biooxidación y la estabilización del material orgánico. Las lombrices son los principales elementos del proceso, ya que airean, acondicionan y fragmentan el sustrato. Además las lombrices modifican el estado físico y químico de la materia orgánica debido a que reducen gradualmente su relación C/N y a que incrementan el área superficial expuesta a los microorganismos, favoreciendo la actividad de los mismos y en consecuencia la descomposición del material orgánico (Domínguez y col., 1997). Son apreciables los estudios sobre compostaje (Albuquerque y col., 2006a; Cayuela y col., 2008a) y vermicompostaje de alperujo (Plaza y col., 2008; Nogales y col., 2008; Melgar y col., 2009), obteniéndose a través de esta tecnologías un material orgánico libre de toxicidad y con un grado elevado de estabilidad y madurez (Benitez y col., 2004; Melgar y col. 2009)

En la presente Tesis Doctoral, las tecnologías de bajo coste de compostaje y vermicompostaje aplicadas a la revalorización del alperujo, han sido el objeto de estudio. Por o que las características principales de cada proceso, así como las aplicaciones de los subproductos compostados o vermicompostados, son discutidas de forma más extensa a continuación.

## **2. Compostaje y Vermicompostaje**

### **2.1. Compostaje**

El compostaje es un proceso biológico aeróbico mediante el cual la materia orgánica es degradada de forma acelerada por las actividades de sucesivos grupos de microorganismos. En este proceso pueden distinguirse cuatro fases: fase mesofílica, fase termofílica, fase de enfriamiento y fase de maduración. La fase mesofílica es la fase más dinámica del proceso y se caracteriza por un rápido incremento de la temperatura (una media de 20°C), grandes cambios en el pH y la degradación de los compuestos orgánicos simples (Schloss y col., 2003). La fase termofílica, es la etapa donde la materia orgánica se descompone de forma más intensa; esta fase constituye la fase activa del compostaje y es la responsable de la eliminación de los microorganismos patógenos que se encuentran en el residuo (Lung y col., 2001). La duración de la fase termofílica depende de las características del residuo (contenido en sustancias fácilmente degradables) y de la gestión de los parámetros de control del proceso (aireación y humedad). La fase de enfriamiento viene marcada por el



## **Introducción**

descenso de la temperatura hasta alcanzar un estado mesofílico. En la fase de maduración se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización de las sustancias húmicas.

El proceso de compostaje requiere condiciones adecuadas de pH, temperatura, humedad, oxigenación y nutrientes que permitan el desarrollo de las poblaciones microbianas (De Bertoldi, 1992). Además, los cambios que se produzcan en estas condiciones afectarán a la proliferación de cierta microflora durante el proceso, lo cual incidirá en la degradación de la materia orgánica. La abundancia, composición y actividad de las poblaciones microbianas van cambiando durante el proceso de compostaje. La madurez del mismo viene relacionada con una alta diversidad pero una baja actividad microbiana (Ryckeboer y col., 2003). Además, esta madurez puede estimarse por la medida de diferentes parámetros en el compost resultante, entre los que se encuentran el contenido en carbono orgánico, la temperatura, el pH, el contenido en sustancias húmicas, el contenido en fenoles, el índice de germinación y la dinámica de ciertas actividades enzimáticas (Cayuela y col., 2008a). Al tratarse de un proceso mediado por microorganismos, la dinámica y actividad metabólica de las propiedades microbianas proveen de una información valiosa sobre la evolución del proceso y la calidad de los productos finales.

El compostaje es una tecnología de bajo coste que se ha empleado ampliamente en la revalorización de diferentes residuos orgánicos, incluido el alperujo procedente de la extracción del aceite de oliva (Cayuela y col., 2004). Debido a sus propiedades físicas y químicas (muy baja porosidad, elevada humedad y bajos contenidos en fósforo y nitrógeno), el alperujo tiene que ser mezclado con otros tipos de residuos que actúen como agentes estructurantes. Estos agentes permiten que se produzca un adecuado intercambio gaseoso y previenen la compactación excesiva del sustrato a compostar. Como agentes estructurantes del alperujo se han utilizado distintos residuos como las hojas de olivo o los rabillos de las uvas (Alburquerque y col., 2006c), residuos de algodón (Alburquerque y col., 2009), serrín de álamo (*Populus alba*) y astillas de corteza (Filippi y col., 2002), etc. Además, en ocasiones el alperujo también es mezclado con estiércol de diferentes animales para mejorar su contenido en nitrógeno y fósforo (Canet y col., 2008). En todos los casos, el producto final estaba libre de toxicidad y mostraba un buen grado de estabilidad y madurez. Sin embargo, el compost obtenido de la mezcla del alperujo con otros residuos agrícolas puede mostrar un pH elevado, lo que representa una limitación para su aplicación al suelo (Roig y col., 2006). En este caso, los autores sugirieron la adicción de sulfuro elemental durante el compostaje de dicha mezcla como estrategia para controlar los niveles de pH.

Por lo tanto, el compostaje se ha considerado como una buena estrategia para convertir los residuos procedentes de la industria del olivar en productos detoxificados, con un buen grado de humificación y un contenido considerable en nutrientes minerales (Alburquerque y col., 2006a), lo que permite su posterior uso como enmienda orgánica (Alburquerque y col., 2006b; Alburquerque y col., 2007).

## **2.2. Vermicompostaje**

El vermicompostaje es un proceso que ocurre bajo condiciones mesofílicas, por el cual la materia orgánica es biooxidada y estabilizada a través de la acción combinada de microorganismos y ciertas especies de lombriz de tierra, del cual se obtiene un producto denominado vermicompost. Aunque son los microorganismos los que degradan bioquímicamente la materia orgánica, las lombrices juegan un papel fundamental en el acondicionamiento del sustrato y modifican la biomasa y la actividad microbiana del mismo (Aira y col., 2007a). Las lombrices pueden producir esta alteración microbiana bien de forma

directa, por el mucus que segregan, el cual constituye una fuente de carbono fácilmente asimilable para los microorganismos (Doube y Brown, 1998) o por los "casts" que excretan, los cuales contienen formas disponibles de carbono, nitrógeno y fósforo (Scheu, 1987; Aira y col., 2004), o bien de forma indirecta, ya que el residuo es fragmentado a su paso por el interior de la lombriz, incrementando el área superficial donde puede desarrollarse la actividad microbiana (Domínguez, 2004).

Durante el vermicompostaje, las lombrices ingieren, trituran y digieren el residuo orgánico con la ayuda de la microflora aeróbica y anaeróbica presente en el interior de su intestino, convirtiendo el residuo en un material mucho más fino, humificado y microbially activo (Elvira y col., 1998). Además, la acción conjunta de lombrices y microorganismos aceleran la mineralización y humificación del sustrato orgánico, mediante procesos de descomposición, resíntesis y polimerización, dando lugar a compuestos orgánicos complejos y relativamente estables que se asemejan a las sustancias húmicas nativas del suelo (Edwards, 2004; Benitez y col. 2005).

Las sustancias húmicas de los suelos afectan positivamente al crecimiento de la planta, bien de forma directa, a través de efectos fisiológicos positivos, o bien de forma indirecta, afectando a las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos (Stevenson, 1994; Senesi y Loffredo, 1999). Así, los ácidos húmicos, componentes principales de estas sustancias húmicas, sirven como fuentes de nitrógeno, fósforo y azufre para los microorganismos y las plantas, y como estructurantes del suelo, mejorando su aireación y su capacidad de retención de agua (Stevenson, 1994; Senesi y Loffredo, 1999). Además, los ácidos húmicos favorecen la ingesta de nutrientes por la planta incrementando la permeabilidad de las paredes radicales (Valdrighi y col., 1996), estimulando el crecimiento radicular o aumentando la proliferación de pelos radicales (Tallini y col., 1991). Por ello, cuanto mayor contenido húmico (semejante a los ácidos húmicos de los suelos) posea la enmienda, mayores serán sus propiedades estructurales y por lo tanto esta enmienda será agrónomicamente más eficiente y medioambientalmente más segura (Senesi y col., 2007).

También durante el vermicompostaje, los nutrientes presentes en el residuo original, tales como N, P, K, Ca, etc., se transforman en formas más solubles y asimilables para las plantas (Edwards y Burrows, 1988; Ndegwa y Thompson, 2001), y se favorece la producción de sustancias que pueden actuar con acción fitohormonal sobre las plantas (Tomati y col., 1987).

Por lo tanto, el vermicompostaje genera un producto final estable y homogéneo, el vermicompost, con bajos niveles de contaminantes, y de un gran valor como enmienda o fertilizante orgánico para los cultivos (Aranda y col., 1999)

En el vermicompostaje pueden diferenciarse dos fases: una fase activa donde las lombrices procesan el residuo modificando su estado físico y su composición microbiana (Lores y col., 2006), y una fase de maduración, marcada por el desplazamiento de las lombrices hacia las capas del residuo sin procesar y por la descomposición del residuo por parte de los microorganismos. Como en el compostaje, la duración de la fase activa no es fija, y dependerá de la especie, de la densidad de las lombrices, y de su capacidad para ingerir el residuo. Al desarrollarse en condiciones mesofílicas, la eliminación de patógenos no está asegurada, aunque algunos estudios han demostrado la supresión de este tipo de microorganismos (Monroy y col., 2008).

Las lombrices utilizadas en los procesos de vermicompostaje pertenecen al grupo de las epígeas. Habitan sobre la superficie de los suelos, en acumulaciones de materia orgánica y

## Introducción

no cavan galerías. Poseen ciertas propiedades que les aseguran la supervivencia en gran diversidad de ambientes como son: su alta capacidad de reproducción y de aprovechamiento de alimentos, su capacidad para producir capullos resistentes y la de adoptar el color del entorno (homocromía). Las lombrices epigeicas aceleran el proceso de compostaje de forma significativa y además la calidad del vermicompost obtenido es mayor que la de los composts obtenidos mediante los procesos de compostaje tradicionales (Ndegwa y Thompson, 2001). Dentro del grupo de las epigeicas, *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Foto 1) y *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Foto 2) son las especies más eficientes, en climas templados, para el tratamiento de residuos orgánicos.

**Foto 1.** *Eisenia fetida*



**Foto 2.** *Eisenia andrei*



Estas especies han transformado exitosamente residuos de orígenes muy diversos entre los que se encuentran: lodos de depuradora (Benitez y col., 1999; Gupta y Garg, 2008), restos de "chapapote" (Martín-Gil y col., 2008), residuos procedentes de la industria textil (Kaushik y Garg, 2003; Garg y col., 2006), residuos animales (Aira y col., 2007a, 2007b; Lazcano y col., 2008) residuos procedentes de la industria del papel (Elvira y col., 1998) residuos procedentes de la industria vitivinícola (Nogales y col., 2005), e incluso residuos procedentes de la industria del olivar (Nogales y col., 1998; Benitez y col., 2002; Benitez y col., 2005; Plaza y col., 2008).

Algunos residuos no soportan el crecimiento y la reproducción de las lombrices por sí solos, como es el caso de los lodos de depuradora (Gupta y Garg, 2008) o de los residuos procedentes de la extracción de aceite de oliva (Nogales y col., 1998) principalmente debido a su elevada relación C/N. Por ello necesitan ser mezclados con otros residuos ricos en nitrógeno a una proporción que permita disminuir la relación C/N del residuo y, por lo tanto, la supervivencia de las lombrices. En otros casos es necesario, antes de introducir las lombrices, modificar la estructura de los materiales mediante una mezcla con otros residuos, con el objetivo de obtener un sustrato lo suficientemente aireado y poroso que permita el desplazamiento de las lombrices (Hall y col. 1986). Pero además de éstos, existen otros muchos factores que influyen en el correcto desarrollo del proceso de vermicompostaje como son:

- **Humedad.** *E. fetida* y *E. andrei* necesitan una humedad superior al 70%, encontrándose su óptimo alrededor del 85% (Edwards, 1988; Domínguez y Edwards, 1997).

- **Temperatura.** El proceso de vermicompostaje debe llevarse a cabo a temperaturas comprendidas entre 10 y 35°C, aunque el óptimo se sitúa cercano a los 25°C.
- **Aireación.** El sustrato orgánico debe tener unas condiciones de aireación óptimas para el desarrollo de las lombrices y por ende el buen funcionamiento del proceso de vermicompostaje. Este parámetro puede verse reducido por un exceso de agua o por la compactación del material debido a una estructura demasiado densa o por un exceso de peso.
- **Densidad de población.** Una elevada densidad de lombrices conllevaría una competencia entre los individuos que ralentizaría el proceso (Venter y Remecke, 1988; Reinecke y Viljoen, 1990; Domínguez, 1996).
- **Concentración de iones** en el sustrato orgánico. Este parámetro va a determinar la adecuación de un sustrato para la supervivencia de las poblaciones de lombrices y el desarrollo del proceso. Diferentes estudios realizados con *E. fetida* y *E. andrei*, determinan que conductividades del extracto de saturación superiores a 8 dS m<sup>-1</sup> son letales (Edwards, 1988).
- **Concentración de amonio.** Niveles de amonio por encima de 0,5 mg g<sup>-1</sup> de sustrato son tóxicos para las poblaciones de *E. fetida* y *E. andrei* (Edwards, 1988).
- **pH.** Existe un pH óptimo para la supervivencia y reproducción de las lombrices, que prefieren valores cercanos a la neutralidad. A la hora de vermicompostar residuos orgánicos, es aconsejable utilizar especies que presenten un rango de tolerancia a la variación del pH más amplio, como es el caso de *E. fetida* y *E. andrei* que toleran valores comprendidos entre 5 y 9, debido a la propia naturaleza de los mismos y a su dinámica de degradación.
- **Concentración de metales pesados.** Estos metales pueden provocar alteraciones en el metabolismo de las lombrices, afectando al crecimiento, desarrollo sexual, producción de cápsulas e incluso a la supervivencia de éstas. Además, la mayoría de estos metales pasan de nuevo al medio por las deyecciones de la lombriz, lo cual afectaría negativamente a los vermicomposts obtenidos.

El vermicompost en sus diferentes acepciones se define como el producto final resultante del proceso de vermicompostaje, que presenta unas óptimas condiciones físicas, un contenido variable en materia orgánica parcialmente humificada, y contenidos igualmente variables de nutrientes y sustancias fitoregularoras del crecimiento. Un breve resumen de las propiedades de los vermicomposts en función de la bibliografía consultada (Tomati *y col.*, 1987; Edwards y Burrows, 1988; Benitez *y col.*, 2000b; Ndegwa y Thompson, 2001; Benitez *y col.*, 2005; Nogales y Benitez, 2006; Pramanik *y col.*, 2007; Plaza *y col.*, 2008) se expone a continuación:

- Contienen elevados contenidos en materia orgánica (entre 20-60%), parte de la cual se encuentra parcialmente humificada (ácidos húmicos y fúlvicos).
- Poseen una capacidad "tampón" del pH, alcanzando un pH neutro o ligeramente alcalino.

## Introducción

- Contienen nutrientes a concentraciones variables., por lo que su aplicación al suelo aumenta los niveles totales y asimilables de estos elementos en el medio edáfico.
- Pueden presentar concentraciones elevadas de micronutrientes esenciales para la planta (Fe, Mn, Cu, Zn, B).
- Contienen enzimas extracelulares acomplejadas con las sustancias húmicas del suelo, por lo que permanecen estables y activas independientemente de las condiciones que se den en el suelo.
- Presentan sustancias con carácter fitohormonal, de esta manera estimulan el crecimiento de los cultivos.
- Tienen elevada capacidad para fijar metales pesados no esenciales para la planta. Esto evita la posible entrada de los mismos en la cadena trófica (vía planta) y la aparición de toxicidad en el medio.

### 2.3. Estabilidad y Madurez de Composts y Vermicomposts. Condición para su Aplicación al Suelo.

El R.D. 824/2005 sobre fertilizantes, es la normativa española donde se regula el uso de vermicompost como enmiendas orgánicas (Anexo 1, grupo 6) y regula los requisitos de los productos fertilizantes constituidos, total o parcialmente, por residuos orgánicos biodegradables (Tabla 2). El vermicompost, según la normativa se define como el producto estabilizado obtenido a partir de materiales orgánicos, por digestión de lombrices, bajo condiciones controladas.

**Tabla 2.** Características que deben cumplir los vermicomposts para ser usados como enmiendas orgánicas.

<b>N orgánico</b>	>1%
<b>Materia orgánica total</b>	> 40%
<b>Relación C/N</b>	<20
<b>Humedad</b>	30-40%
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (recomendado)</b>	>1%
<b>K<sub>2</sub>O (recomendado)</b>	>1%
<b><i>E. coli</i></b>	< 1000 NMP g <sup>-1</sup> compost
<b><i>Salmonella</i></b>	Ausente en 25 g de compost
<b>Limite máximo metales pesados</b>	Según su contenido en Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg; Cr existen tres clases de fertilizantes (Clase A, B y C). Anexo V
El 90% de las <b>partículas</b> pasarán por malla de 25 mm	
Las <b>partículas de plástico y otros inertes</b> deberán pasar por malla de 10mm	
Las <b>materias primas</b> deberán declararse cuando alcancen el 30%	

La orden APA/863/2008 ha modificado en el R.D. 824/2005 los límites admisibles para los vermicompost en lo relativo al contenido en MO (>30%) y humedad máxima (=40%).

La madurez y la estabilidad de los composts y vermicomposts constituyen importantes factores a considerar antes de la aplicación al suelo de estos materiales con objeto de evitar efectos adversos sobre el suelo y la planta, así como un impacto negativo sobre el medio ambiente agrícola (Nogales y col., 1995). La estabilidad normalmente se define como la resistencia que presenta la materia orgánica contenida en estos materiales la degradación (Brewer y Sullivan, 2003). Los materiales que contienen mucha materia orgánica disponible generan una elevada actividad microbiana y son considerados inestables. La madurez se define como la idoneidad de estos materiales para soportar el crecimiento de las plantas y con frecuencia ha sido asociado al grado de humificación del compost (Cooperband y col., 2003). Algunos criterios para la determinación del grado de madurez de los compost y vermicompost de los residuos orgánicos se exponen en la tabla 3.

**Tabla 3.** Criterios para determinar la madurez de composts y vermicomposts procedentes de residuos orgánicos.

<b>Olor</b>	Tierra húmeda	<b>C/N extracto</b>	5-6
<b>Color</b>	Oscuro-negro. Y 11-13	<b>C hidrosoluble g kg<sup>-1</sup></b>	< 5
<b>pH</b>	≥ 7	<b>NH<sub>4</sub> g kg<sup>-1</sup></b>	< 0.4
<b>CIC meq/100g</b>	> 60	<b>IH: NH/AH+AF</b>	< 1
<b>C/N fase sólida</b>	< 20	<b>IG en <i>Lepidium</i> (%)</b>	> 60

IH: Índice de humificación, NH:Fracción no humificada, AH: Ácidos húmicos, AF: Ácidos fúlvicos, IG: Índice de germinación.

Lazcano y col., (2008) encontraron que el vermicompost poseía mejores propiedades para ser utilizado como sustrato orgánico que el compost. Otros autores pudieron observar mayor crecimiento y floración de una planta ornamental (*Crossandra undulaefolia*) cuando el suelo era enmendado con vermicompost más que compost (Gajalakshmi y Abbasi, 2002). Sin embargo no es posible generalizar sobre la mayor calidad de un producto sobre el otro (compost o vermicompost), ya que ésta viene determinada por las propiedades del residuo original y por la tecnología empleada para llevar a cabo el compostaje (Tognetti y col., 2005; Tognetti y col., 2008).

Como hemos dicho anteriormente, la estabilidad de los composts o vermicomposts es un factor esencial para que su aplicación a los cultivos sea beneficiosa. La fase termofílica del compostaje condiciona en gran medida las comunidades microbianas que se van a desarrollar en el compost (Klamer y Baath, 1998) al igual que ocurre en el vermicompostaje cuando las lombrices ingieren el residuo, alterando su composición microbiana (Lores y col., 2006). Los microorganismos son los principales responsables de la degradación del residuo, por lo que los cambios que inducen los diferentes procesos sobre las comunidades microbianas condicionarán el grado en que se produce la descomposición del residuo así como el establecimiento y supervivencia de organismos beneficiosos (bacterias promotoras del crecimiento de la planta) o perjudiciales (coliformes fecales) para su posterior aplicación al suelo (Lazcano y col., 2008). Las comunidades microbianas presentes en composts y vermicomposts han sido objeto de estudio por varios autores (Anastasi y col., 2005; Lazcano y col., 2008). Estos trabajos proporcionan una valiosa información acerca de las poblaciones fúngicas presentes en composts y vermicomposts, pero en lo que respecta a las poblaciones bacterianas, la información aportada es escasa. También se han investigado la diversidad funcional (García y col., 1993; Benitez y col., 2005) y estructural (Fracchia y col., 2006; Yang

## **Introducción**

y col., 2007) de estos co-productos. Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado trabajos que lleven a cabo una comparación entre las actividades y comunidades microbianas desarrolladas en un compost y un vermicompost que procedan del mismo residuo original.

El suelo es un complejo micro-hábitat que regula la productividad de los cultivos y mantiene los ciclos biogeoquímicos gracias a la acción de los microorganismos que habitan en él. El deterioro del suelo puede afectar negativamente al aire, agua superficial y agua subterránea, por lo que la conservación de la salud del suelo es un aspecto fundamental para mantener la integridad del ecosistema (Nannipieri y col., 2003). La calidad del suelo depende en parte de su composición natural, y de los cambios provocados por el uso y manejo humano (Pierce y Larson, 1993). El mal manejo del suelo como el laboreo intensivo sin rotación de cultivos (Reeves, 1997), o la contaminación debida a vertidos deliberados o accidentales de residuos urbanos o industriales (Edwards, 2002), son las principales causas de la degradación y de la pérdida de la productividad de los suelos.

Esta pérdida de productividad de los suelos ha llevado a la búsqueda y utilización de enmiendas orgánicas, que actúen en sentido positivo sobre la fertilidad del medio edáfico, mejorando las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Dentro de las enmiendas o fertilizantes se encuentran los composts de residuos orgánicos y por semejanza en sus características, los vermicomposts de residuos orgánico. Aunque en general este tipo de enmiendas orgánicas tienen un efecto positivo sobre el suelo, este efecto viene determinado tanto por la naturaleza de la enmienda, como por el tipo de suelo al que es aplicada (Pérez-Piqueres y col., 2006).

En estos últimos años se ha estado investigando sobre el potencial para utilizar el compost o vermicompost de orujillo o de alperujo como enmiendas orgánicas para múltiples usos entre los que podemos destacar el soporte de cultivos (Benitez y col., 2000a; Albuquerque y col., 2006b; Albuquerque y col., 2007), la recuperación de suelos degradados o contaminados con metales pesados (Benitez y col., 2004; Romero y col., 2005; Nogales y Benitez, 2006) y la biorremediación de suelos contaminados por diferentes plaguicidas (Delgado-Moreno y Peña, 2008, Fernandez-Bayo y col., 2007, 2008). Sin embargo, bajo nuestro conocimiento, hasta la realización de esta tesis doctoral la aplicación de vermicompost de alperujo para la recuperación de suelos contaminados por solventes clorados no había sido investigada.

## **3. Los Hidrocarburos Alifáticos Halogenados.**

### **3.1. Características Generales**

Uno de los grupos de sustancias químicas orgánicas, que han suscitado una mayor atención por parte de las Agencias de Protección Medioambiental debido a su gran potencial contaminante, son los hidrocarburos alifáticos clorados o solventes clorados. Este grupo de sustancias químicas procedentes del petróleo se agrupan fundamentalmente en cuatro tipos: tricloroetileno, tricloroetano, cloruro de metileno y tetracloroetileno o percloroetileno, y se encuadran dentro del grupo de los compuestos orgánicos volátiles. Debido a su estabilidad, bajo potencial de inflamabilidad y explosión, los hidrocarburos alifáticos clorados sintéticos se usan como solventes y como desengrasantes de metales y componentes electrónicos. Asimismo, también intervienen en la fabricación de semiconductores, limpieza en seco,

extracción de cafeína del café, manufactura de plásticos y formando parte de sustancias pesticidas y funguicidas (Hanson y Brusseau, 1994).

De los diferentes solventes clorados, el tricloroetileno (TCE) ha requerido una especial atención. Este compuesto orgánico fue definido por la comunidad científica como sustancia potencialmente cancerígena (Schaumburg, 1990), hecho posteriormente confirmado por la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer (IARC), que lo encuadró dentro del grupo de peligrosidad 2A (IARC, 1995). Desde ese momento, se convirtió en uno de los productos químicos regulados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) y la Agencia de Seguridad y Salud (OSHA) norteamericanas. El hecho de que el TCE sea un agente cancerígeno está aún en debate. A nivel celular, Davidson y Beliles (1992) detectaron que los hidrocarburos alifáticos clorados producen efectos sobre el ADN, y como consecuencia del aumento de células alteradas genéticamente, la progresión de células cancerígenas. En todo caso, sí es hecho demostrado científicamente que son agentes hepatotóxicos y neurotóxicos (Cothorn y col., 1986; Kilburn y Warshaw, 1992; Hanioka y col., 1997).

### **3.2. Tricloroetileno (TCE)**

El TCE se produce de forma sintética y no tiene fuentes naturales conocidas. Debido a sus propiedades, se ha usado generalmente como ingrediente en soluciones industriales de limpieza y como desengrasante universal. En menores proporciones, también se ha utilizado como ingrediente en adhesivos, como solvente en la extracción de grasas, aceites, ceras, pinturas y alquitranes, así como agente refrigerante.

Aunque normalmente el TCE es volátil, esta sustancia se ha detectado en numerosos suelos (Kao y Yang, 2000), hecho relacionado fundamentalmente con prácticas inadecuadas de almacenamiento y vertido. Una vez en el suelo, el TCE no puede evaporarse a la atmósfera y, debido a su estabilidad química, se convierte en un contaminante persistente (Anderson y Andersen, 1996; EPA, 1996). Se estima que la persistencia en suelos no saturados de este hidrocarburo alifático clorado es de 2-18 meses (DVGW, 1988). Asimismo, debido a problemas de lixiviación, o fundamentalmente por vertido directo, el TCE es uno de los contaminantes más frecuentemente detectados en las aguas subterráneas (Roberts y col., 1990), con una vida media de 300 días en un acuífero (Geiger y Molner-Kubica, 1977; Wilson y col., 1983a; 1983b; 1983c).

En el suelo, los compuestos orgánicos volátiles como el TCE se ven sometidos a procesos de volatilización, solubilización y adsorción, con lo que se encuentran distribuidos entre la atmósfera, la solución y la fase sólida del suelo. Generalmente, un compuesto químico que se encuentra en la solución del suelo está disponible para los microorganismos, al contrario que la proporción que queda adherida a la fase sólida. De este modo, algunos autores han descrito que la biodegradación del TCE se ve limitada en el suelo por la baja proporción de desorción de este compuesto desde el suelo a la fase acuosa (Lee y col., 2002). Por lo tanto, la transferencia de masa de TCE desde el suelo a la fase acuosa podría jugar un papel importante al limitar su biodegradación (Robinson y col., 1990). Este fenómeno de adsorción al suelo limita asimismo la cantidad de contaminante que puede llegar a los acuíferos. La adsorción tiene una relación directa con la textura del suelo, aumentando con la cantidad de carbono orgánico presente en el mismo o en los sedimentos (Grathwohl y Reinhard, 1993). Sin embargo, otros autores han descrito que este proceso no es muy significativo dentro del suelo y, en ausencia de algún proceso de eliminación, el TCE es relativamente móvil dentro de este hábitat (Russell y col., 1992). La estructura del suelo será, por tanto, un factor importante sobre la movilidad del TCE, ya que se encuentra directamente relacionada con la



porosidad del suelo y presenta las vías preferentes por las cuales este contaminante puede infiltrarse en su interior (Huling y Weaver, 1991).

La toxicidad que presenta el TCE sobre la comunidad microbiana del suelo ha sido demostrada con anterioridad y puesto de manifiesto que afecta fundamentalmente a la estructura y función de la comunidad microbiana del mismo (Miller y Guengerich, 1983; Fuller y col., 1997). Dicha toxicidad se debe principalmente a que el TCE presenta un coeficiente de partición octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) de 2,42, valor dentro del rango considerado como extremadamente tóxico para los microorganismos (Ramos y col., 1997). Compuestos orgánicos con tales características pueden acumularse en la membrana citoplasmática, alterando la estructura e impidiendo que la célula lleve a cabo sus funciones esenciales, tales como control del pH, del potencial eléctrico y del flujo normal de iones, lípidos, proteínas y metabolitos endógenos, inhibiendo las funciones de las proteínas de membrana (Sikkema y col., 1995; Pinkart y col., 1996). Estas alteraciones conducen en último término a la lisis y a la muerte celular.

## **4. Mecanismos Bacterianos de Resistencia y Degradación de Solventes**

### **4.1. Mecanismos Bacterianos de Resistencia a Solventes**

En las últimas dos décadas la tolerancia o resistencia a la toxicidad que presentan ciertos grupos de bacterias a solventes orgánicos ha sido objeto de gran interés científico (Ramos y col., 1997; Sardesai y Bhosle, 2002; Fernandes y col., 2003). De entre los diversos mecanismos propuestos, destacan fundamentalmente dos: las modificaciones de los lípidos de la membrana celular de la bacteria y, la expulsión activa del solvente orgánico desde el interior de la célula a través de un proceso dependiente de energía mediado por transportadores.

#### **4.1.1. Modificaciones de la Membrana Celular**

El primer sitio de acción de un compuesto orgánico sobre una bacteria es su membrana celular. Esta membrana está formada por una capa bicapa fosfolipídica que contiene enzimas y proteínas transportadoras. Su función es fundamentalmente mantener el estado energético de la célula, regular el medioambiente intracelular y el transporte de solutos y de los procesos de transducción de energía. Cuando una molécula orgánica tóxica se acumula en la membrana bacteriana, alteran la bicapa lipídica comprometiendo así la viabilidad celular (Sikkema y col., 1995). En este sentido, algunos autores han demostrado que la toxicidad de un contaminante viene determinada por la concentración a la que se acumula en el interior celular más que por su estructura química (De Bont, 1998; Isken y De Bont, 1998).

Las bacterias tolerantes a solventes orgánicos pueden modificar las propiedades físicas de sus membranas citoplasmáticas para limitar la entrada de estos solventes, bien incrementando su rigidez, o bien haciéndolas menos permeables. Esto puede llevarse a cabo mediante diferentes procesos tales como: cambios en la isomerización de *cis a trans* de los ácidos grasos insaturados, modificación de los grupos de cabeza de los fosfolípidos, modificación de los lipopolisacáridos, cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular y cambios en la proporción de componentes de membrana sintetizados, incrementando la proporción basal de fosfolípidos sintetizados (Sikkema y col., 1994; Ramos y col., 1997; Cronan, 2002).

Las bacterias Gram-positivas poseen solamente una membrana, la membrana citoplasmática, la cual está rodeada por una delgada y rígida pared celular. Las bacterias Gram-negativas poseen además de la membrana citoplasmática, una membrana externa que está formada por fosfolípidos y lipopolisacáridos. La resistencia que presenta esta membrana externa hacia ciertas moléculas orgánicas ha sido relacionada con la mayor tolerancia mostrada por las bacterias Gram-negativas a solventes orgánicos en comparación con las bacterias Gram-positivas (Vermuë y col., 1993). No obstante, la modificación de la membrana citoplasmática como mecanismo de tolerancia a solventes orgánicos representa una solución temporal y, para soportar la contaminación por solventes orgánicos, los microorganismos requieren de otros mecanismos más duraderos. La expulsión de compuestos tóxicos a través de un proceso dependiente de energía es un importante mecanismo de protección celular, ya que, proporciona un transporte activo de los compuestos nocivos (Ej. solventes orgánicos), que entran por difusión al interior de la célula, desde la membrana citoplasmática al medio externo (Ramos y col., 2002). Este transporte es efectuado por unas proteínas transportadoras de membrana conocidas como "bombas de expulsión".

#### **4.1.2. Bombas de Expulsión**

Uno de los principales mecanismos de resistencia a compuestos tóxicos en bacterias lo constituye la expulsión de solventes a través de las membranas. La resistencia a solventes orgánicos está relacionada con la presencia de bombas de expulsión RND (*Resistance, Nodulation, cell Division*) en dichos microorganismos (Ramos y col., 2002).

La superfamilia RND está constituida por siete familias (Tseng y col., 1999). De ellas, la familia HAE 1 (*Hydrophobe Amphiphile Efflux-1*) es la única establecida que transporta solventes orgánicos (Saier y Paulsen, 2001). Estas bombas funcionan como transportadores secundarios, atrapando los compuestos tóxicos desde el citoplasma, la membrana plasmática o incluso el periplasma (Zgurskaya y Nikaido, 2000), expulsándolos después al medio externo mediante la energía generada por un gradiente electroquímico de protones ( $H^+$ ). De ese modo, la expulsión de un sustrato viene asociada con la entrada de un protón.

Las bombas HAE1 presentan amplia especificidad de sustrato pudiendo transportar además de solventes orgánicos, gran cantidad de moléculas como ácidos grasos, isoflavonoides, esteroides, péptidos antibacterianos, etc. (Tseng y col., 1999); sin embargo, el transporte de solventes orgánicos sólo ha sido descrito para bacterias Gram-negativas. En los últimos años se han detectado algunas proteínas homologas a esta familia en bacterias Gram-positivas (Saier y col., 2002; Lorca y col., 2007), pero su función no ha sido aún establecida.

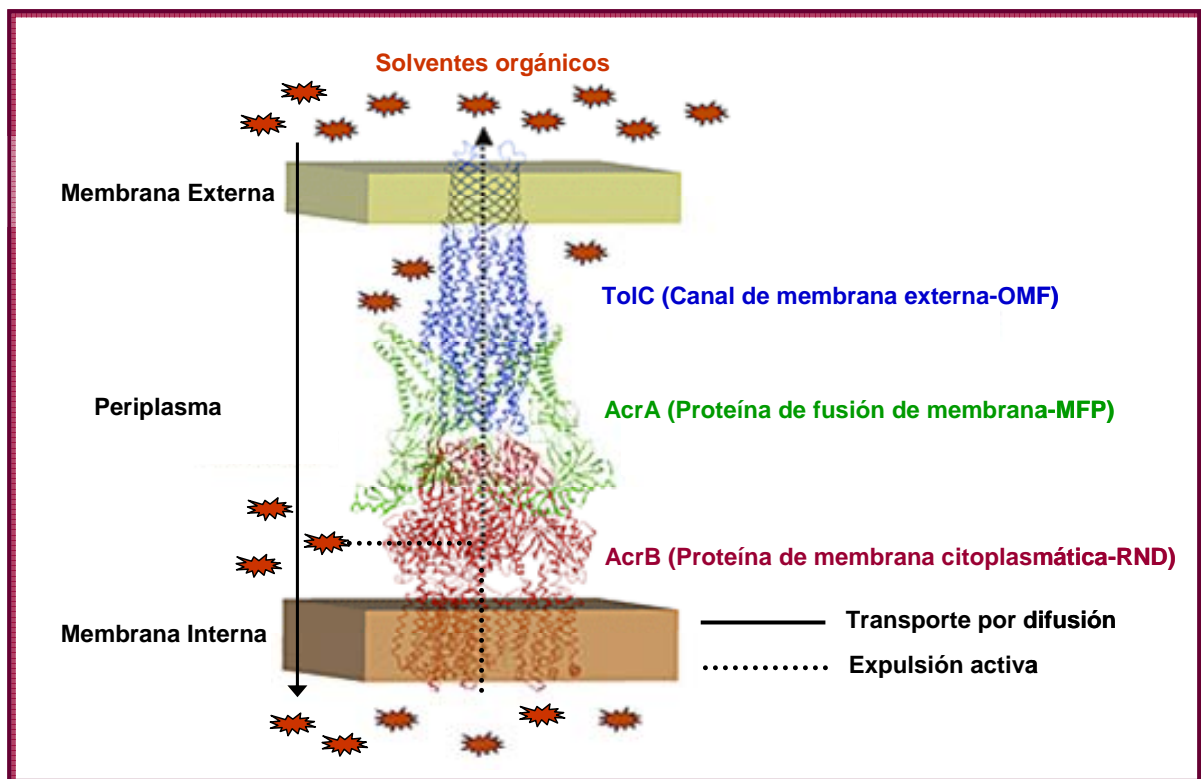
Las bombas RND-HAE1 requieren la interacción con otras proteínas accesorias para llevar a cabo el transporte. Estas proteínas accesorias pertenecen a las familias de proteínas de fusión de membrana (*Membrane Fusion Protein*, MFP; Dinh y col., 1994), y de factores de membrana externa (*Outer Membrane Factor*, OMF; Paulsen y col., 1997). Las MFP interactúan de forma específica con su correspondiente transportador RND (Thanabalu y col., 1998), mientras que los OMF se pueden intercambiar entre diferentes sistemas de expulsión (Yoneyama et al., 1998) y un mismo OMF puede funcionar con diferentes bombas (Zgurskaya y Nikaido, 2000).

La combinación del transportador RND con las proteínas accesorias MFP y OMF permite la creación de un canal a través del periplasma de forma tal que el compuesto tóxico puede ser

## Introducción

expulsado atravesando directamente las dos membranas. El transportador interno (RND) se ubica en la membrana citoplasmática y se acopla a una proteína de membrana externa (OMF), la cual se expande dentro del espacio periplásmico creando así un canal continuo entre ambas proteínas. Una proteína de fusión periplásmica (MFP) permite el acoplamiento físico y funcional entre el transportador interno y la proteína de membrana externa. Un ejemplo de la estructura que forman estas tres proteínas aparece en la figura 3 y corresponde al sistema de expulsión AcrAB-TolC de *E. coli*. En este sistema la proteína RND (AcrB) coopera con una proteína de fusión de membrana (AcrA) y un canal de membrana externa (TolC) para llevar a cabo el transporte (Nikaido y Zgurskaya, 2001; Murakami y col., 2002; Yu y col., 2003). El sistema AcrAB es una de las principales bombas de expulsión de *E. coli* y es la responsable de la resistencia de esta bacteria frente a muchos compuestos antimicrobianos incluidos los solventes orgánicos (White y col., 1997; Tsukagoshi y Aono, 2000)

**Figura 3.** Sistema de expulsión AcrAB-TolC de *E. coli*.



## 4.2. Mecanismos Bacterianos de Degradación de Solventes

Algunos microorganismos pueden llevar a cabo la biodegradación de TCE vía aerobia o anaerobia. En condiciones aerobias, el TCE no puede ser utilizado como fuente primaria de carbono y energía (Hyman y col., 1995), por lo que su mineralización sólo puede llevarse a cabo mediante co-metabolismo, utilizando otros sustratos como fuente primaria de carbono y energía. En cambio, en condiciones anaerobias la degradación del TCE se produce por un proceso de dehalogenación reductiva, donde el TCE actúa como aceptor de electrones (Lee y col., 1998).

### **4.2.1. Degradación Anaeróbica**

La dechloración reductiva anaerobia implica el reemplazamiento secuencial de un átomo de cloro por un átomo de hidrógeno, donde el TCE sería transformado secuencialmente en diferentes isómeros de dicloroetileno (cis-DCE, trans-DCE), cloruro de vinilo y, en algunos casos, se degradaría totalmente a etileno. Las bacterias pueden llevar a cabo la dechloración del TCE mediante su respiración, proceso conocido como dehalogenación reductiva o dehalorespiración, o mediante un proceso de co-metabolismo (Holliger y Schraa, 1994).

En la dehalogenación reductiva o dehalorespiración el TCE actúa como aceptor de electrones y normalmente, el hidrógeno funciona como donante. En este proceso, la bacteria obtiene una ganancia energética a medida que la molécula se va dechlorando. Durante la dehalogenación del TCE se requieren dos electrones por cada cloruro que es eliminado. Para la mayoría de las bacterias implicadas en este proceso, el hidrógeno es el principal donante de electrones, aunque otros sustratos como biomasa, benzoato, propionato, oleato, tetrabutyl ortosilicato (TBOS), metanol y clorobenceno también han sido utilizados como donantes para la dehalogenación de etilenos clorados (Kao y Prosser, 1999; Yang y McCarty, 2000).

Entre las bacterias que pueden dechlorar reductivamente el TCE se encuentran diferentes especies pertenecientes a los géneros *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium* y *Sulfurospirillum* (Holliger y col., 1998; Gerritse y col., 1999; Suyama y col., 2002). La mayoría de estas bacterias no son capaces de dechlorar completamente el TCE hasta etileno (Luijten y col., 2003) y dan lugar a la acumulación de productos intermedios más tóxicos como el cloruro de vinilo y los isómeros del dicloroetileno. Sin embargo, se han descrito bacterias pertenecientes al género *Dehalococcoides* capaces de llevar a cabo la dechloración completa desde TCE hasta etileno (Maymó-Gatell y col., 1997; He y col., 2003; Sung y col., 2006). Por ello, las comunidades microbianas desarrolladas en ambientes contaminados con etilenos clorados que contengan bacterias pertenecientes a este género, también pueden realizar una dehalogenación reductiva completa de dichos compuestos (Yang y col., 2005).

La velocidad del proceso de dechloración anaeróbica es mayor en los compuestos más halogenados. Debido a esto y a la reducción incompleta del TCE, los derivados intermedios tóxicos como los dicloroetilenos y el cloruro de vinilo pueden acumularse en el medio en grandes cantidades. Esta situación suele venir originada por una escasez de donantes de electrones adecuados y/o la ausencia de especies microbianas capaces de llevar a cabo una dechloración completa del TCE (Harkness y col., 1999; Lendvay y col., 2003).

### **4.2.2. Degradación Aeróbica**

Como ya hemos mencionado anteriormente, la degradación del TCE en condiciones aerobias está basada en procesos de co-metabolismo, esto es, "la transformación de un sustrato que no sustenta el crecimiento microbiano mediante enzimas o cofactores producidas por los microorganismos en presencia de un sustrato primario de crecimiento o de otro compuesto transformable" (Dalton y Stirling, 1982).

Wilson y Wilson (1985) fueron los primeros en demostrar que en condiciones aerobias, el TCE podía ser co-metabolizado por las comunidades microbianas del suelo mediante la adición de gas natural como sustrato primario. A partir de este momento, se han descrito muchos compuestos orgánicos que pueden actuar como sustratos primarios para el co-metabolismo del TCE, tales como tolueno (Kelly y col., 2000), fenol (Futamata y col., 2003), metano (Oldenhuis y col., 1991), amonio (Kao y Prosser, 1999), propano y glucosa (Saeki y col., 1999) e, incluso sustratos orgánicos como turba (Kao y col., 2001; 2004).

## **Introducción**

Todas las enzimas responsables de la transformación de TCE son mono y dioxigenasas no específicas, que inician la oxidación de varios sustratos como fuente de crecimiento. Las oxigenasas constituyen un subgrupo de enzimas clasificadas como oxidoreductasas, las cuales son uno de los seis grupos principales de enzimas. Las oxigenasas catalizan la reducción del O<sub>2</sub> con la incorporación de uno (monooxigenasas) o dos (dioxigenasas) átomos de oxígeno al sustrato que está siendo oxidado. Las monooxigenasas requieren un reductor para reducir el segundo átomo de oxígeno a agua, mientras que las dioxigenasas no lo necesitan ya que ambos átomos de oxígeno son reducidos mediante su incorporación al sustrato. Todas las oxigenasas tienen en común la necesidad de transformar el O<sub>2</sub> a un estado reactivo, lo cual se lleva a cabo mediante la transferencia de electrones desde el grupo prostético de la enzima a la molécula de O<sub>2</sub>.

La oxidación de TCE por enzimas monooxigenasas puede dar lugar a dos productos diferentes, TCE epóxido o tricloroactetilaldehído, dependiendo de la enzima implicada en la oxidación (Little y col., 1988; Fox y col., 1990). El TCE epóxido es una molécula inestable que se hidroliza rápidamente a productos más estables como glioxilato, dicloroacetato, formato y monóxido de carbono (Little y col., 1988; Fox y col., 1990). Además, la degradación del TCE epóxido también da lugar a intermediarios reactivos que se unen covalentemente con las enzimas, provocando su inactivación (Fox y col., 1990; Rasche y col., 1991). Con respecto a la oxidación de TCE por enzimas dioxigenasas, Li y Wackett (1992) demostraron que la oxidación mediante la tolueno-dioxigenasa no implicaba la formación de TCE epóxido. Además, de esta oxidación se obtenían como productos glioxilato y formato, pero no monóxido de carbono. Los resultados confirman que la oxidación de TCE se produce por diferentes vías según la enzima que se encuentre implicada en el proceso.

Arp y col. (2001) describieron muchas de las enzimas oxigenasas que participan en el co-metabolismo del TCE, entre las que se encuentran las siguientes: metano monooxigenasa soluble (MMOs) o particular (MMOp), tolueno 2-monooxigenasa (T2MO), tolueno 4-monooxigenasa (T4MO), tolueno dioxigenasa (TDO) y amonio monooxigenasa.

Los procesos de dechloración por co-metabolismo aeróbico suelen ser más ventajosos que los anaeróbicos, porque a diferencia de estos últimos, en los procesos aerobios el TCE puede ser totalmente mineralizado a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y Cl<sup>-</sup> sin la acumulación de metabolitos intermediarios cancerígenos como el cloruro de vinilo (Vogel y McCarty, 1985).

## **5. Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos Alifáticos Clorados**

### **5.1 Características Generales**

La biorremediación es una tecnología cuya finalidad es detoxificar los ambientes naturales contaminados con xenobióticos, utilizando para ello la capacidad metabólica de ciertos microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) y algunas plantas para degradar ciertos compuestos contaminantes, de forma parcial a formas menos tóxicas, o de forma total a dióxido de carbono (procesos aerobios) o a agua y metano (condiciones anaerobias). Así, la biorremediación ha sido definida como el proceso por el cual los residuos orgánicos son biológicamente degradados bajo condiciones controladas a un estado inocuo o a unos niveles de concentración menores a los límites impuestos por las autoridades reguladoras (Mueller y col., 1996).

De los microorganismos implicados en los procesos de biorremediación, las bacterias son el grupo más importante debido a la gran variedad de géneros y especies y a la versatilidad metabólica que presenta. Sin embargo no siempre una bacteria posee toda la capacidad enzimática necesaria para degradar un contaminante o una mezcla de contaminantes presentes en el ecosistema afectado. Así, las poblaciones mixtas o consorcios microbianos tienen mayor poder biodegradativo ya que la información genética que codifica el sistema enzimático del consorcio o la población mixta es más completa y, por tanto, es más probable que se produzca la biodegradación completa de las mezclas de xenobióticos presentes de un área dañada (Schlegel, 1997).

El uso de tecnologías de biorremediación para eliminar compuestos contaminantes del suelo presenta ciertas ventajas con respecto a los tratamientos físico-químicos tradicionales, ya que, además de ser alternativas más económicas, permiten tratar algunos contaminantes "in situ", reduciendo los riesgos de exposición humana o evitando problemas mayores asociados a vertidos accidentales durante su transporte (Vidali, 2001). De ese modo, la biorremediación permite la descontaminación de una zona afectada sin necesidad de extraer el suelo contaminado, y por lo tanto, sin alterar la matriz del suelo. Otras ventajas de los procesos de biorremediación es que suelen lograr la mineralización completa del contaminante (Heitzer y Saylor 1993), no generan residuos y no alteran el medio por lo que suelen tener buena aceptación por parte de la opinión pública.

Sin embargo, el uso de las técnicas de biorremediación presenta ciertas limitaciones ya que algunos contaminantes, tales como los hidrocarburos con alto grado de aromaticidad o los hidrocarburos clorados, pueden ser resistentes al ataque microbiano, por lo que el proceso de biodegradación necesitaría mucho tiempo para reducir las concentraciones de estos contaminantes hasta valores inocuos. Además, normalmente estos compuestos se degradan muy lentamente, dificultando la predicción del grado de descontaminación que se puede alcanzar mediante un proceso de biorremediación. Por otro lado, el proceso de biorremediación puede verse ralentizado bien sea porque se origine un enriquecimiento de los metabolitos intermediarios de la degradación, resultando éstos más recalcitrantes que el contaminante parental, o bien sea porque se produzca una disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes. Aún así, en los últimos años ha habido un creciente interés por el uso de técnicas de biorremediación sobre las físico-químicas, ya que estas últimas, aún pudiendo ser más rápidas y efectivas en la disminución de la concentración de contaminantes, conllevan una alteración o eliminación de la microbiota autóctona del ecosistema y una modificación de sus propiedades físico-químicas.

El éxito de un proceso de biorremediación depende de numerosos factores tales como la presencia de oxígeno, la temperatura, el pH, la actividad del agua, los aceptores de electrones, la presión, la disponibilidad de los contaminantes y la presencia de nutrientes (Leahy y Colwell, 1990).

## **5.2 Tipos de Procesos de Biorremediación**

Los procesos de biorremediación pueden llevarse a cabo mediante dos vías:

### **5.2.1. Biorremediación Intrínseca o Atenuación Natural**

Los procesos de biorremediación intrínseca o atenuación natural se refieren al conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos que espontáneamente ocurren en un espacio determinado, tras un episodio de contaminación en el mismo. La Agencia de Protección

## **Introducción**

Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) define este tipo de biorremediación como una combinación de los procesos de degradación, dispersión, dilución, adsorción, volatilización, y estabilización química y bioquímica de los contaminantes. 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 (USEPA, 1999).

Esta estrategia de biorremediación se suele aplicar en zonas de bajo valor ecológico o social, donde el tiempo no es un factor limitante, ya que la biorremediación puede demorarse incluso décadas, o a zonas donde no puede aplicarse otro tipo de biorremediación. En estos casos, se elimina el problema de adaptación de los microorganismos indígenas a la contaminación, ya que ésta puede tardar mucho tiempo en producirse dependiendo de la naturaleza del contaminante introducido (Leahy y Colwell, 1990). Sin embargo hay numerosos factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en un medio contaminado, entre los que se pueden destacar la carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (Ej. nitrógeno y fósforo), la ausencia de donantes y aceptores de electrones (generalmente hidrógeno como donante y oxígeno como aceptor en la degradación anaeróbica y aeróbica del TCE respectivamente), la inexistencia de condiciones ambientales adecuadas (pH, potencial redox, temperatura, humedad), la ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático necesario para llevar a cabo la degradación de los contaminantes, así como la presencia de componentes tóxicos para la microfauna del suelo en la mezcla contaminante (King y col., 1997).

### **5.2.2. Biorremediación Dirigida**

La biorremediación dirigida consiste en acelerar el proceso de biodegradación natural mediante diferentes técnicas:

#### **5.2.2.1. Bioestimulación**

La bioestimulación se basa en la adicción de nutrientes y de donadores y aceptores de electrones para estimular el crecimiento de la población microbiana endógena del suelo. En el caso de los nutrientes, las fuentes principales son nitrógeno, fósforo y otros elementos traza esenciales para el crecimiento bacteriano (Viñas y col, 2001). En el caso de los donadores y aceptores de electrones, éstos varían en función del tipo de contaminante a degradar; por ejemplo, en la degradación del TCE, el principal aceptor de electrones bajo condiciones aeróbicas es el oxígeno, mientras que bajo condiciones anaeróbicas pueden ser nitratos, manganeso (IV), hierro (III), sulfatos y dióxido de carbono; por otro lado, el principal donador de electrones en la dechloración reductiva del TCE, es el hidrógeno (Yang y McCarty, 1998).

Desde que las bacterias son los agentes principales implicados en la degradación de los contaminantes orgánicos presentes en el suelo, un aumento de la densidad microbiana puede acelerar la degradación de estos contaminantes (USEPA, 1998). Sin embargo, para que este tipo de biorremediación sea exitoso, la población microbiana endógena de la zona contaminada debe tener la capacidad de degradar la mezcla de contaminantes objeto del proceso de biodegradación.

#### **5.2.2.2. Bioaugmentación**

La bioaugmentación consiste en acelerar la velocidad de transformación del contaminante mediante la inoculación, al entorno afectado, de microorganismos exógenos específicos con

capacidad para degradar el contaminante de interés, ya sea por adaptación previa a dicho contaminante o por manipulación genética (Massa y col., 2009). Esta última se realizaría introduciendo a las cepas que van a ser inoculadas el plásmido catabólico que contiene los genes degradadores del contaminante a detoxificar (King y col., 1990; Haro y de Lorenzo, 2001).

Estas técnicas han sido eficientes en la degradación de hidrocarburos aromáticos, tanto mediante inoculación de cepas con capacidad degradante (Mishra y col., 2001), como por la introducción de microorganismos modificados genéticamente (MMGs) (Ford y col., 1999). Sin embargo, su uso sobre solventes clorados no ha sido muy estudiada a pesar de que de cepas modificadas genéticamente es una tecnología de especial interés para la biodegradación de este tipo de compuestos. Como ya hemos comentado anteriormente, bajo condiciones aerobias los etilenos clorados son compuestos recalcitrantes que no pueden ser utilizados como única fuente de carbono y energía por los microorganismos y su degradación depende de procesos de co-metabolismo. Por ello, la manipulación genética podría permitir o acelerar la degradación de los etilenos clorados, mediante la creación de microorganismos modificados con plásmidos que contengan nuevas rutas de degradación o los genes apropiados para la degradación de este tipo de compuestos.

La bioaumentación se utiliza cuando los nutrientes necesarios no están presentes en la zona dañada y no pueden ser añadidos a ésta, o cuando las poblaciones microbianas requeridas están ausentes, en poca cantidad, o no están distribuidas lo suficiente en el medio como para llevar a cabo un grado y velocidad aceptables de degradación. En principio, la bioaumentación tiene la ventaja de que no introduce nuevos compuestos al ecosistema; sin embargo el crecimiento de los microorganismos provoca un aumento del consumo de nutrientes y oxígeno, pudiendo ser necesario la utilización combinada de la bioaumentación y la bioestimulación.

### 5.2.2.3. Fitorremediación

La fitorremediación tiene como objetivo degradar, asimilar, metabolizar o desintoxicar metales pesados, compuestos orgánicos o compuestos radiactivos por medio de la acción combinada de plantas y microorganismos con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (Harvey y col., 2002). Este método de biorremediación es respetuoso con el medioambiente, visualmente aceptable, potencialmente económico y además mantiene las propiedades biológicas y la estructura física del suelo (Khan y col., 2000). Sin embargo, esta técnica también presenta ciertas limitaciones, como la profundidad del sistema radicular, el lento crecimiento de las plantas, el tiempo que dura el proceso, la sensibilidad de las plantas hacia algunos contaminantes, la probabilidad de que las plantas formen parte de la cadena alimenticia y la influencia de los cambios climáticos (Khan y col., 2000). Además, la actividad de la planta dependerá de otros factores como las propiedades del medio contaminado, la variedad de planta usada y las propiedades físicas del propio contaminante (Newman y col., 2004).

Los procesos de fitorremediación pueden llevarse a cabo mediante la acción de alguno de los siguientes mecanismos:

- **Fitoextracción o Fitoacumulación:** consiste en la capacidad de algunas plantas para absorber contaminantes o para acumularlos en raíces, tallos y hojas. Es una técnica que suele utilizarse en la fitorremediación de zonas contaminadas por metales pesados.



- **Rizofiltración:** se basa en la utilización de plantas crecidas en cultivos hidropónicos. Para ello se prefieren raíces de plantas con alta tasa de crecimiento y área superficial, para absorber, concentrar y precipitar los contaminantes.
- **Fitoestabilización:** es un mecanismo que explota la características de determinadas plantas para desarrollar un sistema denso de raíces que le permite reducir la biodisponibilidad y la movilidad de los contaminantes; los contaminantes se adsorben y enlazan a la estructura de la planta, formando una masa estable dentro de la misma y evitando su regreso al medioambiente.
- **Fitodegradación o Fitotransformación:** se refiere a la absorción de contaminantes orgánicos desde suelo, agua o sedimentos, y su posterior transformación a moléculas más estables, menos tóxicas o menos móviles. En determinadas ocasiones, los productos de la transformación le sirven a la planta para acelerar su crecimiento; en otros, simplemente se produce la degradación del contaminante orgánico. Así, varios autores han observado la absorción y posterior degradación del TCE mediante el uso de álamos (Gordon y col., 1998) y plantas hortícolas (Schnabel y col., 1997).
- **Fitovolatilización:** se produce a medida que las plantas en crecimiento absorben agua junto con los contaminantes orgánicos solubles. Algunos de los contaminantes pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse a la atmósfera.
- **Fitoestimulación o Rizorremediación o Rizodegradación:** es la degradación de contaminantes a través de la actividad microbiana que existe en la rizosfera. Se denomina rizosfera a la zona del suelo explorada por el sistema radicular de las plantas. Las raíces de las plantas exudan nutrientes, estimulando la biomasa y actividad microbiana en la rizosfera (Demnerová y col., 2005; Kirk y col., 2005; Liu y col., 2007). Los exudados radiculares, aunque varían en función de la especie de planta, contienen principalmente azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Vancura y Hovadik 1965). Además, el mucigel secretado por las células radiculares, las cápsulas radiculares mudadas durante el crecimiento de la raíz, o la descomposición de las raíces también proveen de nutrientes a la rizosfera (Lynch y Whipps, 1990). Por otro lado, las raíces de las plantas mejoran la aireación del suelo, las propiedades físico-químicas del suelo contaminado, así como el contacto entre los microorganismos asociados a estas raíces con los contaminantes presentes en el suelo, promoviendo su degradación (Leigh y col., 2002). Así, en la rizosfera, se produce una estimulación del número y de la actividad metabólica de los microorganismos indígenas con capacidad degradante (Leigh y col., 2006) que mejora o acelera la degradación de los contaminantes orgánicos presentes en esta zona (Demnerová y col., 2005; Kirk y col., 2005). La composición de la comunidad microbiana de la rizosfera está determinada por varios factores, entre los que destacan la especie de planta, el tipo de contaminante (Nichols y col., 1997; Kirk y col., 2005), el tipo de sistema radicular, la edad de la planta, así como el tipo y la historia del suelo (Anderson y col., 1993).

El éxito del proceso de rizorremediación depende de la clase de planta empleada. Las plantas leguminosas son adecuadas para su uso en estos procesos gracias a su capacidad para albergar un gran número de microorganismos en su sistema radicular

al poseer un sistema muy ramificado. Otros factores que también afectan al éxito del proceso, además del propio metabolismo primario y secundario microbiano, son el establecimiento, la supervivencia, y las interacciones ecológicas con otros organismos. Ciertas variedades de plantas leguminosas, entre las que podemos destacar la alfalfa (*Medicago sativa*, L.), han sido ensayadas con éxito en la rizodegradación de hidrocarburos aromáticos (Nichols y col., 1997; Ckekol y Vough, 2001; Muratova y col., 2003; Fan y col., 2008). La biodegradación de TCE ha sido descrita en la rizosfera de diferentes plantas (Walton y Anderson, 1990); sin embargo, los estudios sobre la degradación de este contaminante en la rizosfera de alfalfa son escasos (Narayanan y col., 1995).

### **5.3 Formas de Aplicación de los Procesos de Biorremediación**

Según el modo de aplicación de las estrategias de biorremediación comentadas en el apartado anterior, pueden clasificarse en biorremediación "in situ" o "ex situ".

#### **5.3.1. Biorremediación "In Situ"**

En este caso, la estrategia de biorremediación se lleva a cabo en el mismo sitio donde se ha producido la contaminación.

La biorremediación "in situ" no requiere la excavación y transporte del suelo contaminado, por lo que se evita la liberación del contaminante y la alteración del medio a tratar. Esta forma de aplicación suele ser menos costosa y permite descontaminar mayor volumen de suelo por tratamiento que la biorremediación "ex situ". Además, se puede hacer uso del espacio contaminado mientras dura el proceso de biorremediación. Sin embargo, requiere largos períodos de tiempo para que se produzca una descontaminación completa, resulta complicado mantener las condiciones durante el proceso de biorremediación y el éxito del mismo depende de las propiedades del suelo contaminado, que debe ser permeable para asegurar un buen rendimiento del proceso.

En la biorremediación "in situ" se persigue la adecuada oxigenación y aporte de nutrientes a los microorganismos del suelo; en algunas ocasiones también es necesaria la adición de microorganismos exógenos. Algunas de las formas de biorremediación "in situ" más conocidas se exponen a continuación.

##### **5.3.1.1. Bioventing**

El bioventing consiste en el bombeo de aire y nutrientes, nitrógeno y fósforo fundamentalmente, por encima de la capa freática, con el fin de estimular la población microbiana indígena del suelo. Este bombeo de aire se realiza a través de unos pozos perforados en la zona contaminada, en número y localización dependiente de los factores geológicos y de ingeniería del proceso. El bioventing emplea una baja cantidad de flujo de aire y proporciona únicamente la cantidad de oxígeno necesario para que se lleve a cabo la biorremediación, minimizando así la volatilización y liberación de los contaminantes a la atmósfera. Es un método efectivo para la descontaminación por hidrocarburos simples y puede ser utilizado cuando la contaminación es profunda bajo la superficie (Vidali, 2001).

Hong y col. (2006) demostraron un elevado grado de detoxificación de un suelo contaminado con TCE utilizando un proceso de bioventing co-metabólico, donde se utilizaba metano como co-sustrato para la degradación de TCE.

### **5.3.1.2. Inyección de Peróxido de Hidrógeno**

La incorporación de oxígeno al suelo también puede llevarse a cabo mediante la inyección de oxígeno en forma líquida como peróxido de hidrógeno. La inyección de peróxido de hidrógeno se puede llevar a cabo a través de tuberías y difusores, o de pozos en el caso de que la contaminación sea profunda. No obstante, hay que tener en cuenta que el peróxido de hidrógeno es un compuesto químico, el cual puede difundirse a las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos. Por lo tanto, este sistema sólo se utilizaría en el caso de suelos sobre acuíferos ya contaminados (Martín Moreno y col., 2004).

A escala de laboratorio, se ha observado que la inyección de peróxido de hidrógeno en suelos contaminados por TCE, estimula la oxidación de este solvente clorado, aumentando la degradación de TCE con el incremento de peróxido de hidrógeno inyectado (Gates y Siegrist, 1995)

En algunas ocasiones, el bioventing o la inyección de peróxido de hidrógeno 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 todo el área de tratamiento (Martín Moreno y col., 2004).

### **5.3.1.3. Aplicación de Compost o Vermicompost**

Gracias a sus propiedades biológicas y físico-químicas, los composts y vermicomposts son buenos candidatos para poder ser aplicados en estrategias de biorremediación "in situ" de suelos contaminados. Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, los composts y vermicomposts poseen alto contenido en materia orgánica humificada y en nutrientes (Garg y col., 2006; Canet y col., 2008), elevada actividad hidrolítica (total y extracelular) (Benitez y col., 2005; Plaza y col., 2008) y elevada biomasa y biodiversidad microbiana (Danon y col., 2008). Por ello, los composts y vermicomposts mejoran la estructura y fertilidad del suelo al que son aplicados, y, como se encuentran formados por partículas más grandes, facilitan la aireación y el movimiento del agua en el mismo (Semple y col., 2001). La aplicación de estas enmiendas orgánicas, también produce una estimulación de la actividad microbiana del suelo, bien por la introducción de nuevas fuentes de nutrientes en las enmiendas o bien por la introducción de nuevos microorganismos y enzimas en las mismas (García y col., 1994; Benitez y col., 2000a; Pérez-Piqueres y col., 2006).

Se ha demostrado que la aplicación de compost o vermicompost a suelos contaminados por hidrocarburos aromáticos, reduce el efecto inhibitorio que ejercen estos contaminantes sobre el ecosistema del suelo y sus ciclos de nutrientes (Tejada y col., 2008) y favorece su biodegradación (Kästner y Mahro, 1996; Contreras-Ramos y col., 2008). En los últimos años ha surgido un creciente interés por investigar la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la aplicación combinada de compost y lombrices, observándose mayor biodegradación por esta estrategia que aplicando únicamente la enmienda orgánica (Ceccanti y col., 2006; Hickman y Reid, 2008). Sin embargo, Contreras-Ramos y col., 2008, evaluaron la biodegradación de hidrocarburos aromáticos mediante la aplicación de vermicompost y lombrices, tanto de forma conjunta como separada, y concluyeron que las lombrices favorecían la degradación de hidrocarburos independientemente de la adición o el tipo de enmienda orgánica añadida. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Hickman y Reid, (2008) donde las lombrices en ausencia de compost no aceleran de forma significativa la biodegradación de los hidrocarburos del suelo contaminado, siendo el compost o la combinación de compost y lombrices los que obtienen mejores resultados.

### **5.3.2. Biorremediación "Ex Situ"**

En este caso el proceso de biorremediación se realiza en una instalación apartada del lugar donde se encuentra la contaminación.

Los procesos de biorremediación "ex situ" pueden ser más rápidos, más fáciles de controlar y aplicables a un mayor abanico de contaminantes y suelos que los procesos "in situ". Sin embargo, esta técnicas necesitan que el suelo contaminado sea extraído y acondicionado antes e incluso a veces después del tratamiento de biorremediación (Martín Moreno y col., 2004).

Algunas de las modalidades de biorremediación "ex situ" se exponen a continuación.

#### **5.3.2.1. Laboreo Agrícola o "Landfarming"**

El laboreo agrícola o "landfarming" consiste en extender el suelo contaminado en una capa delgada sobre una superficie impermeable, dotada de un sistema para recoger los lixiviados contaminados. Periódicamente se voltea la tierra esparcida para favorecer la aireación y estimular la actividad degradativa aeróbica de las poblaciones indígenas, hasta que los contaminantes son completamente degradados. En este tratamiento, la humedad y los nutrientes son controlados con el fin de optimizar el rendimiento del proceso y evitar las pérdidas de los contaminantes por volatilización.

La aplicación de esta técnica tiene algunas limitaciones, entre las que podemos citar la necesidad de grandes emplazamientos para poder llevar a cabo el proceso de biorremediación y el tiempo que dura este proceso, que puede ralentizarse debido a las inclemencias del tiempo (temperatura, lluvia etc.). No obstante, el laboreo agrícola ha sido utilizado eficazmente en la biodegradación de plaguicidas (Rubinos y col., 2007) e hidrocarburos (Marin y col., 2005).

#### **5.3.2.2. Biopilas**

La técnica de biopilas se basa en la formación de pilas no superiores a dos metros de altura de material biodegradable, formados por suelo contaminado y materia orgánica en condiciones favorables para el desarrollo de procesos de biodegradación de los contaminantes. Estas pilas pueden ser aireadas de forma activa (biopilas dinámicas), volteando la pila, o de forma pasiva (biopilas estáticas), mediante tubos perforados de aireación. La actividad microbiana es estimulada mediante la adición de nutrientes y humedad (Jorgensen y col., 2000). La materia orgánica en la biopila (compost, virutas de madera, etc.) mejora la estructura del suelo y favorece el proceso de biodegradación al actuar como co-sustrato. La biorremediación mediante biopilas requiere el control de ciertos factores tales como oxigenación y nutrientes para la biodegradabilidad óptima de los contaminantes. Este tipo de proceso puede también ser llevado a cabo en espacios cerrados, de forma que la emisión de volátiles que forman parte del flujo de aire que sale de la pila pueda ser controlada.

Este tratamiento biológico ha sido utilizado de forma eficiente en la eliminación de hidrocarburos presentes en suelos contaminados (Iturbe y col., 2007).

### **5.3.2.3. Compostaje y Vermicompostaje**

El proceso de compostaje ya ha sido explicado extensamente en apartados anteriores donde se trataba la revalorización de residuos tóxicos. Del mismo modo puede llevarse a cabo la descontaminación de suelos. Así, el suelo contaminado es mezclado con sustancias orgánicas tales como estiércol, paja fresca, astillas de madera, tucas de maíz, etc., las cuales contribuyen a incrementar la porosidad de la pila y facilitar el flujo de aire. Se añaden nutrientes, agua y se remueve mecánicamente a intervalos regulares. Durante este proceso se estimula el crecimiento microbiano en el material orgánico, y el calor producido por la actividad metabólica en la etapa termófila (entre 50 y 60 °C) favorece la máxima degradación del contaminante (Viñas y col., 2001).

En el compostaje de suelos contaminados también se han utilizado residuos orgánicos procedentes de otras industrias, favoreciendo además la eliminación de éstos últimos. La proporción de residuos añadidos al suelo contaminado debe ser cuidadosamente determinada ya que una proporción inadecuada puede retardar o inhibir la actividad microbiana (Thomas y col., 1992). Namkoong y col. (2002) evaluaron el compostaje de subproductos derivados del petróleo mediante la adicción de lodos de depuradora o compost a diferentes proporciones y obtuvieron que el grado de degradación de los hidrocarburos variaba en función del sustrato orgánico añadido y de la proporción utilizada para llevar a cabo el proceso.

Además de para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos derivados del petróleo, el compostaje puede utilizarse para la descontaminación de otros tipos de contaminantes. Semple y col., (2001) llevaron a cabo una revisión de los contaminantes en suelos que podían ser eliminados mediante esta técnica, entre los que se podían encontrar los clorofenoles, los hidrocarburos aromáticos y los pesticidas; sin embargo, no hacían referencia sobre el compostaje para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos alifáticos clorados.

Por último, indicar que el costo del tratamiento por compostaje varía con la cantidad de material a tratar, la fracción de suelo en la pila y el tipo de contaminante.

En relación a vermicompostaje, y tras una exhaustiva revisión bibliográfica no se han encontrado estudios que utilicen esta biotecnología para descontaminar suelos.

### **5.3.2.4. Biorreactores**

Los suelos o lodos contaminados se introducen en un reactor con suficiente agua para permitir la mezcla continua. El volumen de agua en la mezcla depende de la concentración del contaminante. Normalmente se optimiza la biodegradación añadiendo nutrientes (orgánicos o inorgánicos), controlando el pH, la temperatura y oxígeno disuelto. Dentro de los reactores, los microorganismos están en contacto con el suelo contaminado. Algunos biorreactores son inoculados con cultivos mixtos o especies microbianas con alta actividad degradativa. Una vez concluido el tratamiento, son separados el agua y los sólidos, sometándose estos a un posterior tratamiento si todavía contienen contaminantes.

Generalmente, el sistema de biorreactores permite un grado de descontaminación mayor que las técnicas de biorremediación "in situ", ya que la descontaminación se lleva a cabo en un entorno dirigido, más controlado y predecible (Vidali, 2001). Sin embargo, el uso de biorreactores para la descontaminación de suelos tiene limitaciones para el caso de suelos no homogéneos o arcillosos, los cuales son difíciles de manipular. Además, este sistema no lleva

implícito el reciclaje de las aguas residuales derivadas del proceso y la separación de las fases (sólida y líquida) después del tratamiento es muy costosa. Asimismo, los reactores son muy costosos por el alto grado de ingenierización del proceso.

## **5.4 Bioindicadores de los Procesos de Biorremediación**

La evaluación del estado de salud de un suelo contaminado y, en definitiva, la calidad del mismo, es un tema que ha suscitado gran interés por parte de la comunidad científica implicada en la biorremediación de suelos. El punto de unión entre todos ellos es la dificultad en establecer una serie de parámetros indicadores comunes, partiendo de la propia dificultad de consensuar una definición de calidad del suelo (Bastida y col., 2008). Así, mientras que el C de la biomasa microbiana, respiración, actividad deshidrogenasa, fitotoxicidad y lombrices han sido utilizadas por algunos autores para establecer un "Índice de Calidad Biológica del Suelo" (Dawson y col., 2007) en procesos de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, otros autores han utilizado exclusivamente actividades enzimáticas hidrolíticas para establecer un "Índice de Estabilidad Relativa del Suelo" que determine los efectos de herbicidas en la calidad del suelo (Becaert y col., 2006). Diversas actividades enzimáticas hidrolíticas, deshidrogenasa y dioxigenasa, así como cambios en la estructura de la población bacteriana o en el recuento de microorganismos heterótrofos han sido útiles para establecer relaciones entre funcionalidad y nivel de contaminación de hidrocarburos en un suelo (Vivas y col., 2008; Pérez y col., 2008).

A pesar de la heterogeneidad de los parámetros utilizados, la mayoría de los estudios tienen en común el uso de bioindicadores microbiológicos. El empleo de bioindicadores microbiológicos para determinar el estado de salud de un suelo contaminado numerosas ventajas frente al empleo de indicadores físico-químicos, entre las que destacan su mayor sensibilidad, su carácter integrador, y su alta velocidad de respuesta (Pankhurst et al. 1995; Yakovchenko et al. 1996; Elliott 1997). Así, el término "bioindicador" ha sido definido como "un parámetro microbiano que representa las características del entorno o los impactos al mismo, que se puede interpretar más allá de la información que representa la medición u observación de tal parámetro (Nielsen y col., 2002).

Se ha demostrado, sin embargo, que la medida única de una respuesta microbiológica ofrece diferentes valores en función del tipo de suelo y del contaminante vertido (Bundy y col., 2002). Para que los indicadores biológicos sean efectivos en la determinación de la calidad del suelo deben ser sensibles al mayor número posible de agentes contaminantes, responder del mismo modo a un contaminante dado y ser capaz de reflejar diferentes niveles de contaminación (Elliott, 1994). Dalal (1998) propuso algunas características que debería tener un buen indicador: medir una o más funciones del suelo, ser suficientemente sensible para reflejar las alteraciones producidas por perturbaciones, restauración o manejo, proporcionar valores de referencia y valores críticos, ser fácilmente interpretable y, que su determinación sea lo menos costosa posible. Además, estos bioindicadores necesitan tener papeles clave en el funcionamiento de los ecosistemas del suelo, integrar sus propiedades físicas, químicas y biológicas y tener respuestas estandarizadas, representativas y reproducibles, que permitan una comparación clara e inequívoca entre suelos (Broos y col., 2005; Doran y Safley, 1997; Doran y Zeiss, 2000).

Los microorganismos del suelo pueden ser eficientes bioindicadores ya que son muy sensibles a cualquier perturbación del ecosistema. Asimismo, tienen la capacidad de modificar rápidamente su grado de actividad y su rendimiento energético en respuesta a dichas perturbaciones. De este modo, la comunidad microbiana puede adaptarse a los diferentes estreses ambientales mediante la modificación de su grado de actividad, su

biomasa y su estructura (Shloter y col., 2003). Las medidas de **actividad, biomasa o estructura microbianas** nos proporcionan información muy valiosa sobre la presencia y actividad de los microorganismos vivos, así como de la intensidad, tipo y duración de los efectos que ejerce una contaminación por hidrocarburos sobre la actividad metabólica del suelo. Por ello, las medidas de estos parámetros microbiológicos han sido utilizadas con éxito como indicadores del impacto de la contaminación sobre la calidad del suelo (Brohon y col., 2001; Eibes y col., 2006), del restablecimiento de las relaciones entre la biota y la restauración en los sistemas degradados (Harris, 2003), y del efecto que, sobre la calidad del suelo, ejercen diferentes prácticas de manejo (Moreno y col., 2009).

### **5.4.1. Actividad Microbiana**

La actividad microbiana es un término utilizado para definir el amplio rango de actividades llevadas a cabo por los microorganismos del suelo y algunos de ellos pueden estimar el grado de evolución de los procesos metabólicos. Entre los indicadores de actividad microbiana, la evolución del uso del carbono y la medida de las actividades enzimáticas expresadas por la comunidad bacteriana indígena, pueden ser considerados como parámetros que proporcionan información muy valiosa para evaluar el estado del suelo (Nielsen y col., 2002).

La respiración de un suelo es un buen índice de actividad microbiana y da una idea de la cantidad de sustratos fácilmente mineralizables (Anderson, 1982) ya que refleja la degradación catabólica de estos compuestos bajo condiciones aerobias (Nannipieri, 1990) mediante la acción de los microorganismos capaces y activos (Torstensson, 1997). Sin embargo, la respuesta de la respiración del suelo varía entre diferentes suelos contaminados por hidrocarburos (Shi y col., 2002, 2005; Labud y col., 2007).

Taylor y col. (2002) mencionaron que las enzimas del suelo podrían funcionar como indicadores de biodiversidad, informando sobre el potencial bioquímico del suelo, su posible resiliencia y su aplicación potencial; y por otro lado, como indicadores de la calidad del suelo, ya que los cambios producidos en determinadas funciones clave pueden proporcionar información sobre el progreso de los procesos de biorremediación, así como sobre la sostenibilidad de diferentes tipos de manejo del suelo. Las actividades enzimáticas han sido propuestas como útiles indicadores de la calidad del suelo y del funcionamiento de ecosistemas al estar relacionados con las transformaciones y ciclos de nutrientes, responder rápidamente a alteraciones producidas por factores naturales o antropogénicos y por ser cuantificadas fácilmente (Gianfreda and Bollag, 1996; Nannipieri et al., 2002). Entre las actividades mayormente utilizadas como indicadores del estado de un suelo podemos destacar:

- La **actividad deshidrogenasa**, que representa el flujo intracelular de electrones a O<sub>2</sub> y se debe a la actividad de un conjunto de enzimas intracelulares que catalizan la transferencia de hidrógeno y electrones de un compuesto a otro (Nannipieri y col., 1990). Así, esta actividad es una medida relacionada con la presencia de microorganismos viables y puede ser indicativa del sistema redox y la capacidad oxidativa del suelo (Trevors, 1984). Diversos autores han encontrado una correlación negativa entre esta actividad y la grado de contaminación por hidrocarburos (Maliszewska-Kordybuch and Smreczek, 2003; Gianfreda y col., 2005). Sin embargo, otros autores encontraron lo contrario (Trasar y col., 2000).

- La **actividad o-difenoloxidas**a además de estar implicada en procesos de formación de sustancias húmicas, se encuentra relacionada con la capacidad de un suelo para llevar a cabo la oxidación de compuestos fenólicos (Perucci y col., 2000), incluyendo los compuestos orgánicos potencialmente recalitrantes (Gianfreda y col., 2005; Saavedra y col., 2006).
- La **actividad β-glucosidasa**, que se encuentra implicada en el ciclo del carbono y cataliza procesos hidrolíticos durante la degradación de la materia orgánica (pon cita).
- Las **actividades fosfatasa y arilsulfatasa**, están implicadas en la mineralización de fósforo y sulfato orgánico, respectivamente, liberando fosfato y sulfato a partir de ésteres orgánicos de estos compuestos. Los fosfatos y sulfatos obtenidos a partir de estas reacciones son las principales formas de fósforo y sulfuro disponibles para microorganismos y plantas (Nannipieri y col., 2002).
- Las **actividades ureasa y BAA-proteasa** están implicadas en la mineralización del nitrógeno. Catalizan la hidrólisis de enlaces no peptídicos (actividad ureasa) o peptídicos (actividad BAA-proteasa) en el ciclo de mineralización del N orgánico a dióxido de carbono y amonio (Tabatabai, 1982; Alef and Nannipieri, 1995).

Las actividades enzimáticas hidrolíticas tienen un elevado componente extracelular, ligadas y estabilizadas en la fracción arcilla y húmica. Éstas juegan un importantísimo papel en la recuperación de la actividad bioquímica del suelo tras una perturbación, ya que son independientes de los mecanismos de degradación e inhibición que regulan la actividad microbiana (Benitez y col., 2005), así como del efecto negativo de los contaminantes sobre los microorganismos (Labud et al., 2007).

Otros métodos establecidos como indicadores funcionales de la salud del suelo han sido el uso de fluoresceína diacetato hidrolasa (FDAH) que cataliza la hidrólisis de fluoresceína diacetato a fluoresceína y mide la actividad de muchas enzimas no-específicas sobre la degradación de la materia orgánica en el suelo (Adam y Duncan, 2001), o la obtención de perfiles metabólicos mediante ensayos Biolog, que proporcionan un perfil fisiológico cualitativo de las funciones potenciales que pueden ser llevados a cabo por la comunidad bacteriana del suelo (Garland and Mills, 1991).

Sin embargo, la medida de actividades microbianas presenta ciertos problemas al estimar actividades potenciales y no reales (Burns, 1982; Nannipieri y col., 1990), ya que generalmente se llevan a cabo a temperatura y pH óptimo y a una concentración saturada de sustrato (Nannipieri y col., 1990). Además, las actividades no discriminan entre actividad intracelular de los microorganismos y la que proviene de la actividad extracelular estabilizada en la materia orgánica del suelo (Nannipieri y col., 2002), se ven afectadas de forma distinta en función del contaminante aplicado (Trasar-Cepeda y col., 2000) y del tipo de suelo donde se produzca la contaminación (Labud y col., 2007). De acuerdo con estas afirmaciones, Gianfreda y col. (2005) concluyen que es muy difícil explicar un cambio de la actividad enzimática del suelo en respuesta a un cierto factor o establecer una relación causa-efecto entre una perturbación y la variación de la actividad enzimática del suelo.

Otra de las limitaciones apunta a la variabilidad espacial y temporal en y entre diferentes suelos, así como a la influencia del tipo de suelo sobre el estrés producido por un contaminante dado. Sojka y Upchurch (1999) señalaron que el uso de una o dos



propiedades bioquímicas no era suficiente para demostrar la complejidad del funcionamiento del sistema del suelo y que para utilizar las propiedades bioquímicas como indicadores de la calidad del suelo era necesaria la búsqueda de expresiones complejas capaces de describir la complejidad del suelo más agudamente. Trasar-Cepeda y col. (2000) encontraron gran variabilidad en la respuesta de diferentes actividades enzimáticas del suelo a la contaminación por diferentes contaminantes y al grado de contaminación, cuando estas actividades eran consideradas como medidas individuales; sin embargo, la combinación de estas actividades junto con otros parámetros biológicos (mineralización de nitrógeno y biomasa microbiana), daba lugar a un índice capaz de discriminar entre el grado y tipo de contaminación del suelo. Tscherko y Kandeler, (1999) también observaron que los análisis que combinaban medidas de biomasa microbiana y de varias actividades enzimáticas podían discriminar eficientemente entre suelos sometidos a diferentes perturbaciones.

El uso de expresiones complejas en las que se encuentran implicadas varias propiedades bioquímicas parece ser una prometedora línea de trabajo. La combinación de diferentes propiedades bioquímicas refleja mejor la complejidad del suelo, y estas expresiones complejas parecen ser adecuadas para evaluar su calidad, al menos en las condiciones para las que hayan sido diseñadas. Dilly y Blume (1998) indicaron que el uso de índices adecuados deben combinar al menos diez propiedades bioquímicas básicas relacionadas con la biomasa microbiana, la actividad microbiana general (actividad deshidrogenasa, respiración del suelo, etc.) y específica (actividades  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa, ureasa, etc.). La combinación de varias medidas puede llevarse a cabo mediante el diseño de "sun ray plots" o "star plots", es decir, diagramas de rayo de sol o diagramas de estrella, en los cuales, la variabilidad de la forma de la estrella refleja la diversidad o abundancia de los microorganismos implicados, y el área de la estrella está asociada con su vitalidad.

### **5.4.2. Biomasa Microbiana**

La biomasa microbiana representa el tamaño de la comunidad microbiana presente en el suelo y es la encargada de llevar a cabo funciones clave para el correcto funcionamiento del suelo, por lo que ha sido muy utilizado como indicador de la calidad del suelo. Este parámetro puede ser considerado como una medida integral de la importancia de los microorganismos para los suelos, ya que es una de las pocas fracciones de la materia orgánica que es biológicamente significativa, sensible al manejo o a la contaminación y finalmente medible (Powlson, 1994).

El tamaño de la comunidad microbiana del suelo puede ser estimado mediante la biomasa microbiana asociada al carbono, por la densidad de bacterias cultivables y a través de técnicas moleculares.

La biomasa microbiana asociada al carbono puede ser analizada mediante los siguientes métodos: la incubación-fumigación (FI), la respiración inducida por sustratos (SIR), la extracción-fumigación (FE) y el contenido en ATP (Jenkinson y Powlson, 1976; Anderson y Domsch, 1978; Jenkinson y Ladd, 1981; Vance y col., 1987). Algunos autores han observado que la contaminación por hidrocarburos tiene un efecto negativo sobre este parámetro (Lorenz y Kandeler, 2005; Megharaj y col., 2000).

La densidad de bacterias cultivables puede ser estimada por el recuento en placa de unidades formadoras de colonias (CFU) o por el análisis de la turbidez mediante el método del número más probable (MPN) (Bakken, 1997; Johnsen y col., 2001). Sin embargo, estos métodos que sólo engloban a las bacterias cultivables, únicamente pueden estimar del 1 al 10% de la biomasa microbiana total. El conteo directo mediante microscopía de

fluorescencia puede dar un rendimiento de 100 a 1000 veces mayor que el recuento en placa (Johnsen y col., 2001), aunque las tinciones utilizadas en este método en ocasiones no son capaces de discriminar entre células vivas y muertas.

Las técnicas moleculares implican la extracción de ADN, directa o indirectamente, desde el suelo y pueden detectar ambos microorganismos cultivables y no cultivables. Entre las técnicas moleculares utilizadas para la medida de la biomasa microbiana se encuentran el análisis de ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA)(Frostegård y Bååth, 1996) y la estimación mediante PCR cuantitativa (Qian y col., 2007). Sin embargo, estos métodos no dan una medida de la biomasa microbiana total, sino que diferencian entre biomasa bacteriana y biomasa fúngica. La estimación de la biomasa por PCR cuantitativa realiza una cuantificación absoluta de las bacterias u hongos presentes en el suelo mediante el uso de cebadores específicos diseñados a partir del 16S ADNr y del 18S ADNr respectivamente.

### **5.4.3. Diversidad Microbiana**

La composición o diversidad estructural de la comunidad microbiana viene determinada por la riqueza, diversidad y abundancia de especies en dicha comunidad. Las medidas de estos tres parámetros se han utilizado para controlar las alteraciones que se producen en la estructura de la comunidad microbiana debidas a cambios ambientales, prácticas de manejo y contaminación (Øvreås, 2000).

La diversidad estructural es un parámetro sensible a los cambios ambientales (Kandeler y col., 1999). Algunos autores han observado que la presencia de diferentes tipos de contaminantes induce cambios en la estructura de la comunidad bacteriana donde la densidad bacteriana permanecía inalterada (Avidano y col., 2005). Estos cambios pueden significar un aumento o una disminución de la diversidad bacteriana. Van Bruggen y Semenov, (2000) concluyeron que una perturbación del suelo conllevará un inicial descenso de la biodiversidad seguido de un aumento de la misma debido a que se logra un nuevo equilibrio dinámico.

La diversidad microbiana puede medirse mediante las tradicionales técnicas de recuento en placa o del número más probable, ya citadas en el apartado anterior, o mediante técnicas moleculares. Las técnicas tradicionales se basan en el cultivo de bacterias sobre diferentes medios de cultivo en función del grupo funcional o taxonómico que se quiere aislar y la posterior identificación de las bacterias aisladas. Entre las técnicas moleculares utilizadas para analizar la estructura de la comunidad bacteriana del suelo se encuentran la amplificación por PCR de secuencias entre elementos repetitivos, ya sea del análisis del espacio inter-ribosomal (RISA) (Borneman y Triplett, 1997), o del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Nei y Li, 1985; Harry y col., 2001), la creación de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), la aplicación de microarrays de ADN (Rondon y col., 2000; Tiedje y col., 2001), el análisis de ácidos grasos fosfolipídicos (Zelles, 1999; Pankhurst y col., 2001) y el análisis mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) o con gradiente térmico (TGGE) (Muyzer y Smalla, 1998).

El análisis de genes 16S ADNr mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) representa una poderosa herramienta para estudiar la estructura de la comunidad bacteriana en diferentes tipos de ambientes (Heuer y col., 2001). Esta técnica consiste en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles de poliacrilamida dentro de un gradiente desnaturizante lineal. Es rápida y simple y permite la diferenciación de dos fragmentos con un error de una simple base (Muyzer y Smalla, 1998). Los fragmentos que migran en la misma posición representan la misma especie o especies

## ***Introducción***

muy relacionadas, incluso pertenecientes al mismo género (Gomes y col., 2001; Kisand y Wikner, 2003; Leys y col., 2005; Bastias y col., 2006). Sin embargo, algunas cepas pueden generar más de una banda en el gel (Ma y col., 2005), por lo que la estimación de abundancia y diversidad de especies a partir de perfiles generados por DGGE debe ser realizada prudentemente. Aún así, esta técnica nos puede proporcionar una medida semicuantitativa de la diversidad bacteriana de los suelos y podría ser usada para analizar su abundancia, diversidad y dinámica bacteriana (Dilly y col., 2004; Leys y col., 2005). Además, el ADN de las bandas del DGGE puede ser extraído e identificado mediante secuenciación (Muyzer y Smalla, 1998). La técnica de DGGE ha sido utilizada por varios autores para detectar alteraciones en la estructura bacteriana del suelo ya sean producidos por cambios en el manejo del suelo (Moreno y col., 2009) o debidos a episodios de contaminación (Andreoni y col., 2004; Vivas y col., 2008).



# **INTERÉS DEL TRABAJO**



## **OBJETIVOS**

**[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]**



## **Interés del trabajo. Objetivos**

La contaminación del suelo es uno de los mayores problemas medioambientales a los que se enfrenta la sociedad actual. En la mayoría de los casos, la contaminación de suelos es consecuencia de vertidos incontrolados procedentes de actividades industriales.

Los hidrocarburos alifáticos clorados o solventes clorados son compuestos orgánicos volátiles procedentes del petróleo. Debido a su estabilidad, bajo potencial de inflamabilidad y explosión, los hidrocarburos alifáticos clorados sintéticos son sustancias utilizadas habitualmente en actividades industriales, como solventes y como desengrasantes de metales y componentes electrónicos. Este tipo de compuestos también pueden intervenir en la fabricación de semiconductores, limpieza en seco, manufactura de plásticos y formando parte de sustancias pesticidas y funguicidas (Hanson y Brusseau, 1994).

Entre los hidrocarburos alifáticos clorados, el tricloroetileno (TCE) ha despertado un gran interés en los últimos años, principalmente debido a su potencial cancerígeno hacia el ser humano y a sus efectos sobre la estructura y función de la comunidad del suelo (Miller y Guengerich, 1983; Fuller y col., 1997). Aunque es un compuesto volátil, se ha detectado en numerosos suelos (Kao y Yang, 2000) debido principalmente a prácticas industriales inadecuadas de almacenamiento y vertido. El TCE es un compuesto químicamente estable, por lo que una vez en el suelo, se convierte en un contaminante persistente (Anderson y Andersen, 1996; USEPA, 1996). Asimismo, debido a su lixiviación desde el suelo, o fundamentalmente por vertido directo, el TCE es un contaminante frecuente de las aguas subterráneas (Roberts y col., 1990), y su baja biodegradabilidad hace que pueda permanecer en ellas largos períodos de tiempo.

Los estudios relacionados con la recuperación de TCE mediante tratamientos biológicos (biorremediación) han sido enfocados principalmente al tratamiento de aguas subterráneas contaminadas (USEPA, 2000), sin embargo, son escasos los relacionados a la biorrecuperación de suelos contaminados. La biodegradación de TCE es particularmente exitosa en condiciones anaerobias, pero presenta el inconveniente de que su transformación puede ser incompleta dando lugar a metabolitos intermediarios como el dicloroetileno y el cloruro de vinilo que son más tóxicos que el compuesto parental (Parsons y col., 1983, 1984). Además, el mantenimiento de condiciones ambientales anaerobias es un factor limitante. Por lo tanto, la biodegradación en condiciones aerobias, basada en procesos de cometabolismo, es una de las alternativas más viables para la recuperación de suelos contaminados por TCE (Bielefeldt y col., 1995). En los últimos años se ha demostrado el uso eficiente de residuos o enmiendas orgánicas como sustratos de crecimiento para que se lleve a cabo el cometabolismo de TCE (Kao y col., 2004; Katsenovich y col., 2007). Estos estudios aplican un sistema "biobarrera" formado por dichos sustratos orgánicos para la descontaminación de acuíferos. Sin embargo, hasta el momento, este sistema no ha sido probado en suelos contaminados por TCE.

La producción de aceite de oliva es una de las principales industrias de la cuenca Mediterránea. Solo en Andalucía estas industrias generan anualmente 3.000.000 Tm de un residuo denominado alperujo, lo que constituye un gran problema medioambiental en esta región. Este residuo orgánico puede ser estabilizado mediante procesos de compostaje o vermicompostaje. Estudios desarrollados previamente por nuestro grupo de investigación han dejado patente que el alperujo procedente de la extracción de aceite de oliva, una vez biotransformados mediante procesos de vermicompostaje (Nogales y col., 1998; Benitez y col., 2002; Melgar y col., 2009) presenta mecanismos potenciales de degradación de compuestos orgánicos ricos en carbono, como es el caso del TCE. Concretamente, el

## **Interés del Trabajo. Objetivos**

vermicompost de alperujo presenta alto contenido en carbono orgánico, nutrientes, y actividades enzimáticas hidrolíticas, así como complejos humus-enzimáticos los cuales son estables a la degradación en condiciones ambientales adversas (Benitez y col., 2002; 2005). Así, esta enmienda orgánica muestra una alta actividad enzimática, relacionada fundamentalmente con la hidrólisis de sustancias carbonadas (actividad glucosidasa) y con la oxidación de fenoles (actividad polifenoloxidasa), las cuales han sido descritas como rutas de degradación de hidrocarburos clorados (Wiese y col., 1998; Reddy y col., 1998).

La fitorremediación es un sistema de recuperación de suelos contaminados enfocado a degradar sustancias contaminantes mediante el uso de determinadas plantas y los microorganismos asociados en su rizosfera (Pradham y col. 1998). En el suelo existe un problema de biodisponibilidad de TCE hacia las plantas, debido a la dificultad de las raíces para extraer estas sustancias de los suelos, especialmente en aquellos con cantidades significativas de materia orgánica (Cunningham y col. 1996). Por ello, la fitorremediación de TCE debe ir enfocada fundamentalmente a la degradación de este compuesto mediante la acción de los microorganismos presentes en la rizosfera de la planta. Algunos autores han demostrado que las comunidades microbianas presentes en la rizosfera de ciertas especies vegetales son capaces de degradar TCE, y los exudados radiculares desprendidos por estas especies aceleran esa degradación (Walton y Anderson, 1990, Anderson y Walton, 1995). Una de las plantas que han sido utilizadas con éxito en la degradación de TCE en suelo es la alfalfa (*Medicago sativa*, L.) (Narayanan y col. 1995). Sin embargo, los estudios sobre fitorremediación de TCE en suelos son muy escasos.

En la búsqueda de estrategias innovadoras y medioambientalmente sostenibles, esta tesis doctoral pretende evaluar el uso de vermicompost de alperujo y especies vegetales con potencial fitorremediador para la biorecuperación de suelos contaminados por TCE. El éxito de estas estrategias supondría una buena opción para solventar el problema que supone el alperujo en la región Mediterránea, ya que estos residuos, previamente vermicompostados, podrían revalorizarse como enmienda orgánica para la biorecuperación de suelos contaminados por solventes clorados.

La propuesta de esta tesis va a ser desarrollada a través de los siguientes objetivos:

- Caracterización, desde el punto de vista bioquímico y microbiológico, de compost y vermicompost de alperujo de oliva, derivados del mismo material de partida.
- Estudio del potencial del vermicompost de alperujo para acelerar la biorecuperación de un suelo contaminado con TCE, mediante la aplicación de un "sistema biobarrera".
- Evaluación de la eficiencia del uso de plantas con potencial fitorremediador, aisladamente o en combinación con vermicompost de alperujo, para recuperar suelos contaminados con TCE.



# **MATERIALES**

**[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]**





## Materiales

### 1. Residuos Orgánicos Seleccionados

- **Alperujo u orujo** procedente de la extracción del aceite de oliva mediante proceso de centrifugación por dos fases suministrado por la empresa ROMEROLIVA, Deifontes, Granada
- **Estiércol mezcla caprino-ovino**, suministrado por el Departamento de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Armilla, Granada.
- **Hojas de olivo** procedentes de la limpieza de las aceitunas antes de su procesamiento, suministrado por por la empresa ROMEROLIVA, Deifontes, Granada

El análisis químico de los residuos orgánicos seleccionados se expone en la tabla 1.

**Tabla 1.** Análisis químico de los residuos orgánicos seleccionados

	Alperujo	Estiércol ovino-caprino	Hojas de olivo
pH	5.8	8.6	5.7
CE dS m <sup>-1</sup>	7.1	7.6	1.4
COT g kg <sup>-1</sup>	510	212	495
AH g kg <sup>-1</sup>	98	16	nd
C hidrosoluble g kg <sup>-1</sup>	145	8	¿?
Polifenoles g kg <sup>-1</sup>	42	nd	25
C/N	62	15	36
NKT g kg <sup>-1</sup>	8.2	14	14
P g kg <sup>-1</sup>	0.9	4.5	1.0
K g kg <sup>-1</sup>	13	8.5	5.4
Ca g kg <sup>-1</sup>	4.5	102	27
Mg g kg <sup>-1</sup>	1.2	72	2.8
Fe mg kg <sup>-1</sup>	419	11740	350
Mn mg kg <sup>-1</sup>	12	394	47
Cu mg kg <sup>-1</sup>	9	48	79
Zn mg kg <sup>-1</sup>	10	132	14
IG %	0	68	0

### 2. Vermicompost de Alperujo

Para la obtención del vermicompost de alperujo se utilizó una mezcla de alperujo con estiércol ovino-caprino en una proporción 4:1 en peso húmedo. La adición de estiércol se realizó para mejorar la estructura y la relación C/N del alperujo. En el proceso de vermicompostaje se utilizaron lombrices cliteladas y no cliteladas de la especie *Eisenia fetida*, procedentes de un stock ubicado en el Departamento de Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín, Granada.

Se utilizó una litera de 1.5 m<sup>2</sup> construidas de Madera, manteniéndose la base inclinada (5%) para facilitar el drenaje hacia dos orificios situados en la parte inferior. Para evitar el

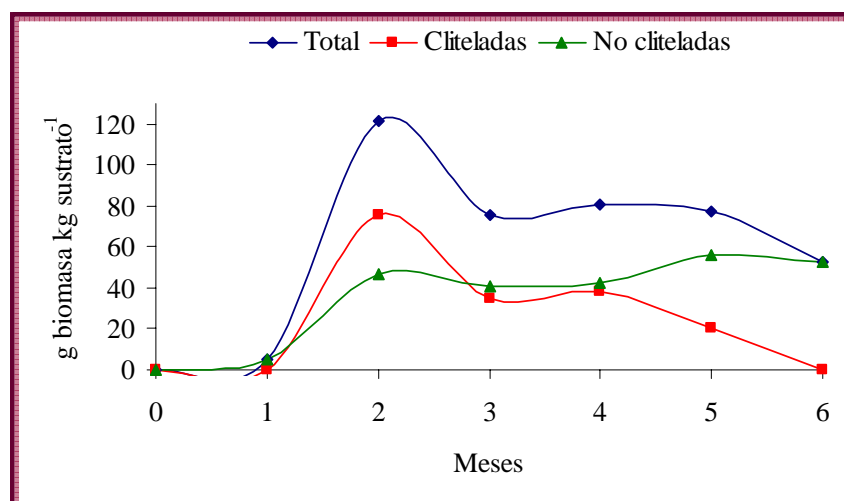
deterioro por humedad, la litera fue recubierta interiormente con una capa de polietileno. La litera fue colocada bajo cubierta, en un invernadero de temperatura no controlada.

La litera fue rellena con una capa de 30 cm de altura, conteniendo 60 kg de la mezcla alperujo-estiércol. A ambos lados de la mezcla se colocó una banda (cordón de amortiguación) de 10 cm de ancho consistente en un cordón de vermicompost de estiércol ovino-caprino donde fueron inoculadas las lombrices (foto 1). La finalidad de esta banda, fue la de promover la aclimatación gradual de las lombrices a la mezcla, además de servir como fuente de inóculo de microorganismos. La inoculación se hizo con individuos lombrices en diversos estados de desarrollo (juveniles, semicliteladas y cliteladas) hasta una biomasa total de lombrices equivalente al 5% del peso seco de la mezcla. Seguidamente se colocó una cobertura de cartón sobre la litera para proteger de la luz y evitar una evaporación excesiva del sustrato. Durante el periodo experimental no se adicionó sustrato adicional, manteniéndose la humedad entre el 80 y el 85% con riegos periódicos por aspersión.

**Foto 1.** Litera utilizada en el proceso de vermicompostaje



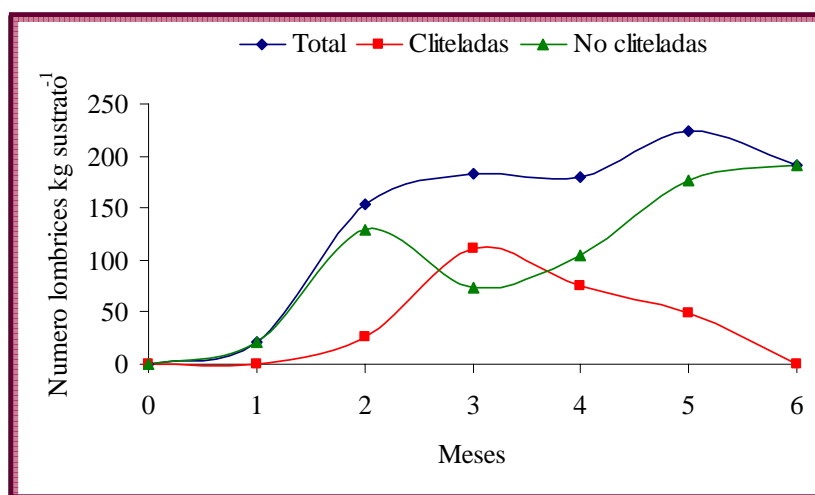
**Figura 1.** Evolución de la biomasa de las lombrices cliteladas, no cliteladas y total durante el proceso de vermicompostaje. Valores medios de tres repeticiones.



A intervalos mensuales y durante un periodo de 6 meses se tomaron tres muestras al azar de 15 x 15 cm de cada uno de los sustratos contenidos en las literas. Las lombrices contenidas en cada muestra, fueron separadas manualmente, lavadas y pesadas después de secarlas rápidamente sobre papel de filtro. Posteriormente fueron reincorporadas a la litera.

Las figuras 1 y 2 muestran la evolución de la biomasa y el número de lombrices en durante el proceso de vermicompostaje, respectivamente.

**Figura 2.** Evolución del número de lombrices cliteladas, no cliteladas y totales durante el proceso de vermicompostaje. Valores medios de tres repeticiones.



A los seis meses del inicio del proceso de vermicompostaje, todo el sustrato de la litera fue retirado, siendo las lombrices separadas manualmente, lavadas, determinado su grado de desarrollo, pesadas y devueltas al stock del que inicialmente se recogieron. El producto vermicompostado fue posteriormente dejado en reposo durante un periodo de 3 meses, con objeto de favorecer la maduración y humificación de la materia orgánica contenida en él, así como reducir su humedad. El producto final obtenido constituyó el vermicompost de alperujo cuyo análisis químico se expone en la tabla 2.

**Tabla 2.** Análisis químico del vermicompost de alperujo.

pH	CE dS m <sup>-1</sup>	COT g kg <sup>-1</sup>	AH g kg <sup>-1</sup>	C hidros. g kg <sup>-1</sup>	Polifenoles g kg <sup>-1</sup>	C/N	NKT g kg <sup>-1</sup>	P g kg <sup>-1</sup>
8.4	2.2	329	38	7.9	3.2	16	20	3.0

K g kg <sup>-1</sup>	Ca g kg <sup>-1</sup>	Mg g kg <sup>-1</sup>	Na mg kg <sup>-1</sup>	Fe Mg kg <sup>-1</sup>	Mn mg kg <sup>-1</sup>	Cu mg kg <sup>-1</sup>	Zn mg kg <sup>-1</sup>	IG %
12	28	8.5	918	4325	112	46	137	89

### 3. Compost de Alperujo

Para la obtención del compost de alperujo se utilizó, como en el caso del vermicompost, una mezcla de alperujo con estiércol ovino-caprino en una proporción 4:1 en peso húmedo. La adición de estiércol se realizó para adecuar la relación C/N del alperujo al proceso de compostaje. Además, se adicionaron hojas de olivo como material estructurante para favorecer la aireación de la mezcla, en una cantidad equivalentes a un 30% del total del sustrato orgánico a vermicompostar.

El proceso de compostaje, mediante el sistema de pila estática con volteo mecánico, se llevó a cabo en una parcela experimental localizada en las inmediaciones de Gojar, Granada.

Se formó una pila de aproximadamente 4 m<sup>3</sup> (1.5m alto, 1m ancho, 2.6m largo) que contenía aproximadamente 1200 kg de la mezcla de alperujo, estiércol y hoja de olivo (700 kg alperujo, 340 kg hojas de olivo y 160 kg estiércol). Una vez formada la pila y aplicada agua para mantener la humedad entre un 50-55%, la temperatura de la masa empezó a subir alcanzando máximos, entre 55-60°C, a partir de los 2 meses del inicio del proceso. Para mantener las condiciones óptimas de temperatura y aireación, así como favorecer la homogenización de la mezcla, hubo que voltear mensualmente la pila. A los seis meses del inicio del proceso y una vez comprobado que la temperatura de la masa no aumentó después del último volteo, la pila se mantuvo durante tres meses sin voltear y con alguna aplicación esporádica de agua, con objeto de favorecer, al igual que en el caso del vermicompostaje la humificación y maduración de la mezcla inicial. El producto final obtenido constituyó el compost de alperujo cuyo análisis químico se expone en la tabla 3.

**Tabla 3.** Análisis químico del compost de alperujo.

pH	CE dS m <sup>-1</sup>	COT g kg <sup>-1</sup>	AH g kg <sup>-1</sup>	C hidros. g kg <sup>-1</sup>	Polifenoles g kg <sup>-1</sup>	C/N	NKT g kg <sup>-1</sup>	P g kg <sup>-1</sup>
8.4	2.3	233	49	6.9	1.5	16	15	2.1

K g kg <sup>-1</sup>	Ca g kg <sup>-1</sup>	Mg g kg <sup>-1</sup>	Na mg kg <sup>-1</sup>	Fe Mg kg <sup>-1</sup>	Mn mg kg <sup>-1</sup>	Cu mg kg <sup>-1</sup>	Zn mg kg <sup>-1</sup>	IG %
21	26	24	310	10310	251	76	44	68

En la foto 2 se muestran los productos obtenidos, compost y vermicompost de alperujo, así como el material de partida.

**Foto 2.** Alperujo, compost y vermicompost de alperujo



## 4. Suelo

Para los diferentes experimentos desarrollados, se utilizó el horizonte A (40 cm) de un suelo de la parcela experimental localizada en las cercanías de Gojar, Granada (figura 3). El análisis químico y textural del horizonte A del suelo utilizado en los experimentos se expone en la tabla 4.

**Figura 3.** Localización y perfil del suelo utilizado en los experimentos**Tabla 4.** Características del horizonte A (0-40 cm) del suelo utilizado en los experimentos

Arena g kg <sup>-1</sup>	Limo g kg <sup>-1</sup>	Arcilla g kg <sup>-1</sup>	CIC cmol(+) kg <sup>-1</sup>	Na <sup>+</sup> cmol(+) kg <sup>-1</sup>	K <sup>+</sup> cmol(+) kg <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> cmol(+) kg <sup>-1</sup>	Mg <sup>2+</sup> cmol(+) kg <sup>-1</sup>
468	374	158	7.9	0.24	0.62	21.12	1.74

pH	CE	CO <sub>3</sub> Ca G kg <sup>-1</sup>	COT g kg <sup>-1</sup>	C hidros. g kg <sup>-1</sup>	NKT g kg <sup>-1</sup>	C/N	Polifenoles g kg <sup>-1</sup>
7.5	0.25	412	16	0.31	1.4	11	0

La descripción del perfil del suelo se expone a continuación:

- **Clasificación.** Regosol calcárico (FAO, 1998), Xerorthent típico (Soil Survey Staff, 1998)
- **Ubicación.** Carretera comarcal Gojar-Dilar a 1 Km al oeste del pueblo de Gojar (Granada)
- **Coordenadas.** X: 445,62 Y: 4106, 26
- **Altitud.** 812 m
- **Forma del terreno circundante.** Ondulada
- **Pendiente.** Llano

- **Vegetación o uso actual.** Barbecho
- **Material original.** Dolomias
- **Drenaje.** Bien drenado
- **Condiciones de humedad.** Seco en todo el perfil.
- **Pedregosidad.** Sin piedras
- **Afloramientos rocosos.** Escasos
- **Erosión.** Nula

**Horizonte A (0-40 cm).** Color amarillo rojizo (7.5YR6.5/6) en seco y amarillo rojizo (7.5YR6/6) en húmedo; franco; estructura moderada en bloques subangulares medianos; ligeramente plástico; muy friable en húmedo; pocos poros medianos; muy calcáreo; raíces comunes finas y muy finas, escasa medianas; límite gradual e irregular con el horizonte subyacente.

**Horizonte AC (40-80 cm).** Color pardo fuerte (7.5YR5.5/6) en seco; pardo fuerte (7.5YR5/6), en húmedo; francoarenoso; estructura moderada en bloques subangulares medianos; pocos poros finos; abundantes fragmentos rocosos; muy calcáreo; límite difuso e irregular con el horizonte subyacente.

**Horizonte 2C (>80 cm).** Constituido por un coluvio calizo-dolomítico de color blanco-grisáceo en seco.

## 5. Métodos Utilizados para el Análisis de los Residuos Orgánicos y Suelo.

### 5.1. Análisis Granulométrico (M.A.P.A., 1986)

El análisis textural del suelo se realizó, una vez destruida su materia orgánica y dispersada con hexametáfosfato sódico, por el método de la pipeta de Robinson.

### 5.2. pH (M.A.P.A., 1986)

Medido en el extracto acuoso en una relación sustrato orgánico:agua (1:25) con un pHmetro Beckman Mod. SS-2, después de ser sometido a agitación durante 30 minutos.

### 5.3. Conductividad Eléctrica (M.A.P.A., 1986)

Medida en extracto de pasta de saturación del material orgánico mediante empleo de conductímetro Crison Mod. 525.

### 5.4. Carbonato Total del Suelo (M.A.P.A., 1986)

El método se basa en la determinación del CO<sub>2</sub> que se desprende, en un dispositivo cerrado con presión y temperatura constante, cuando una muestra de suelo es tratada con CIH 1:1.

### **5.5. Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)**

Se pesan 5 g de suelo, luego este se satura en sodio mediante lavados sucesivos con acetato sódico 1 N (pH 8,2) y centrifugación durante 10 minutos a 2000 r.p.m. De la misma manera se retira el exceso de sodio con lavados del suelo con etanol 96% hasta alcanzar una conductividad eléctrica menor a 20  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en el sobrenadante. Finalmente, se retira el sodio adsorbido con tres lavados de acetato amónico 1N (pH 7) que se depositan en un matraz de 100 ml. El sodio se valora mediante fotometría de llama (M.A.P.A., 1986).

### **5.6. Bases de cambio**

Se pesan 5 g de suelo, se lava sucesivamente con etanol al 96% y posterior centrifugación hasta alcanzar una conductividad eléctrica menor a 20  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en el sobrenadante. Posteriormente, las bases de cambio se extraen con tres lavados de acetato amónico 1N (pH 7) que se depositan en un matraz de 100 ml. El sodio y potasio se valora mediante fotometría de llama y el calcio y magnesio mediante espectrofotometría de absorción atómica (M.A.P.A., 1986).

### **5.7. Carbono Orgánico Total (M.A.P.A., 1986)**

Se realizó en un analizador de carbono total modelo Primacs-SC por detección de C mediante infrarrojos. El análisis de carbono total se realiza por combustión total de la muestra y el de carbono inorgánico total por oxidación con ácido fosfórico. El carbono orgánico total (COT) se obtiene por diferencia de ambos.

### **5.8. Carbono Hidrosoluble**

La extracción del carbono hidrosoluble se realiza por agitación de la muestra orgánica con agua destilada (1:10) (p/v) a 60°C durante 1 hora (Benitez y col., 1999). El carbono se determina por oxidación con dicromato potásico en presencia de ácido sulfúrico en bloque digestor (150°C) durante 15-30 minutos y se mide en espectrofotómetro a una longitud de onda  $\lambda=590$  nm (García y col., 1994).

### **5.9. Carbono Extraíble Total y Ácidos Húmicos**

La extracción de las sustancias húmicas se realizó mediante una solución 0,1 M de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  a pH 7.1, para lo cual 10 g de los sustratos orgánicos se agitan durante 24 h a 37°C con 30 mL de la solución extractante, posterior centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos y filtración del sobrenadante con filtro tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . A continuación, el extracto fue dializado con una membrana de diálisis MWCO: 12000-14000 daltons, a 4°C, con cambio diario del agua destilada del recipiente hasta que el pH de ésta permaneció constante (Benitez y col., 2000a).

El fraccionamiento del carbono extraíble total se realizó por acidificación del extracto a pH 2.4 con ácido sulfúrico, centrifugación a 5000 rpm durante 15' y separación del precipitado (ácidos húmicos; AH) del sobrenadante (ácidos fúlvicos; AF). El carbono contenido en el extracto (carbono extraíble total, CET) así como el de las distintas fracciones obtenidas (AH, AF) se determinó mediante oxidación ácida con dicromato puro y posterior valoración en espectrofotómetro Shimadzu UV Mod. 684 a una longitud de onda  $\lambda=594$  nm.



### **5.10. Polifenoles Totales Extractables (Clifford & Ramírez-Martínez 1991b; Khazaal y col., 1994)**

Para la determinación de los polifenoles totales extractables, se pesaron alícuotas de 200 mg de los substratos iniciales y productos finales finamente molidas, añadiéndose 10 mL de una solución de acetona y agua en la proporción 1:1, acidificada mediante la adición de un 5% (V/V) de ácido fórmico. El tubo que contiene la muestra fue introducido en sonificador que contenía hielo durante 15 minutos y posteriormente, agitado en rueda mezcladora durante 24 horas a 4°C. Finalmente, se centrifugó a 1.400 g a 4°C durante 30 minutos. El contenido del tubo se filtró en cámara fría (4°C), a través de papel Whatman, y el extracto fue guardado a 4°C.

De cada extracto se tomó una alícuota (50 µL para alperujo natural y 300 µL para alperujo degradado), llevándose hasta 1 mL con agua fría. Para elaborar la curva patrón, se prepararon soluciones conteniendo de 1 a 9 mL de una solución madre de ácido caféico, 0,5 g/l de solvente, y se llevaron hasta 100 mL con agua destilada. A 1 mL de las distintas soluciones patrón, así como de las soluciones problema, se adicionaron 0,5 mL de reactivo de Folin Ciocalteau y 2,5 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% (P/V). A continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 35 minutos y se centrifugó a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. La lectura se realizó midiendo la absorbancia frente a un blanco en espectrofotómetro a 755 nm.

### **5.11. Nitrógeno Kjeldahl Total (Jackson, 1970)**

Se utilizó una variante de la técnica Kjeldahl mediante la cual las muestras orgánicas se digieren con ácido sulfúrico y catalizadores que facilitan la transformación del nitrógeno en ión amonio, el cual posteriormente es destilado en medio alcalino y valorado.

### **5.12. Análisis de otros Elementos. Mineralización Nítrico-Perclórica de las Muestras (AOAC, 1984)**

La mineralización se realizó añadiendo 10 mL de NO<sub>3</sub>H-ClO<sub>4</sub>H a 0.5 g de muestra orgánica. La digestión se lleva a cabo en un baño de arena a 200°C hasta que desaparecen los vapores nitrosos y de ClO<sub>4</sub>H. Una vez frío, se añaden 10 mL de ClH y se calienta durante 1 hora a 200°C. El mineralizado se llevó a 50 mL.

### **5.13. Fósforo Total del Mineralizado (C.I.I., 1969)**

Por medio de la formación del complejo con el reactivo nitrovanadatomoilbídico y medida con espectrofotómetro Shimadzu UV Mod. 680 a una longitud de onda de 430 nm.

### **5.14. Potasio Total del Mineralizado (C.I.I., 1969)**

Medida directa sobre el mineralizado mediante fotómetro de llama Corning Mod. 400.

### **5.15. Calcio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre y Zinc del Mineralizado**

Determinación directa de todos los elementos en el mineralizado mediante espectrofotómetro de absorción atómica GBC 932 plus.

## 5.16. Análisis de la Fitotoxicidad (Zucconi y col., 1981a)

El test de fitotoxicidad se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Zucconi y col. (1981a, b) modificada, mediante la cual se realiza un ensayo de germinación "in vitro" de semillas de *Lepidium sativum* L., comúnmente denominado "berro de agua". En primer lugar se obtuvo un extracto acuoso de los materiales orgánica, tanto de los sustratos iniciales (I) como de los productos finales (F), (1:10) (p/v) manteniendo la suspensión en agitación durante 1 hora y centrifugando a 5000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se filtró el sobrenadante en papel de filtro de 0.45 µm. En placas petri de 8 cm de diámetro se coloca un disco de papel de filtro, se añade 1 mL del extracto de manera que el papel quede bien empapado y finalmente, se distribuyen al azar 10 semillas de berro. El tratamiento control se realiza con agua destilada. Para cada tratamiento se establecen 5 repeticiones. Las semillas se incuban a 25°C en oscuridad durante 48h, una vez transcurrido el tiempo se detiene la germinación añadiendo 1 mL de etanol a la placa. Posteriormente se cuentan las semillas germinadas por placa y se determina la longitud de la radícula de las mismas. El porcentaje índice de germinación (IG) se determina de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$IG = \frac{\text{Porcentaje de germinación x longitud radicular (extracto)}}{\text{Porcentaje de germinación x longitud radicular (control)}} \times 100$$

## 6. Tricloroetileno (TCE)

En los diferentes estudios realizados se utilizó tricloroetileno (TCE) (grado analítico) suministrado por Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, España). El TCE es un compuesto orgánico halogenado, volátil, no inflamable e incoloro y se caracteriza por ser poco soluble en agua y miscible en la mayoría de los solventes orgánicos. Sus propiedades físico-químicas se exponen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Propiedades físico-químicas del tricloroetileno (TCE). (ATSDR, 2007; PRTR-España, 2008)

<b>Fórmula química</b>	C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub>
<b>Color</b>	Incoloro
<b>Olor</b>	Etéreo; similar al cloroformo; dulce;
<b>Masa molecular</b>	131,4 g/mol
<b>Estado físico a 20-25°C</b>	Líquido
<b>Punto de ebullición</b>	86,7°C
<b>Punto de fusión</b>	-87,1°C
<b>Densidad relativa del líquido</b>	1,465 g/ml
<b>Solubilidad en agua a 20°C</b>	1,070 g/L
<b>a 25°C</b>	1,366 g/L
<b>Solubilidad en solventes orgánicos</b>	Miscible en solventes orgánicos
<b>Presión de vapor a 20°C</b>	7.8 KPa
<b>Densidad relativa del vapor</b>	4.5 g/ml
<b>Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C</b>	1.3 g/ml
<b>Temperatura de autoignición</b>	410°C
<b>Límites de explosividad (% en volumen en el aire)</b>	8-10.5
<b>Coefficiente de reparto octanol/agua (log K<sub>ow</sub>)</b>	2.42
<b>Constante de la Ley de Henry a 20°C</b>	0.020 atm·m <sub>3</sub> /mol
<b>A 25°C</b>	0.011 atm·m <sub>3</sub> /mol



# **RESULTADOS**

**[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]**





# Capítulo 1

---

**Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste**



## **Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste**

### **Resumen**

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el impacto de dos tecnologías (compostaje y vermicompostaje) para reciclar un residuo orgánico tóxico a través del uso asociado de técnicas bioquímicas y moleculares. Para ello, se llevaron a cabo estimaciones de seis actividades enzimáticas implicadas en rutas metabólicas clave de la degradación de la materia orgánica, ensayos de PCR en tiempo real dirigidos sobre genes del 16S bacteriano y perfiles de DGGE (electroforesis de gel con gradiente desnaturante) elaborados para analizar los fragmentos de 16S amplificados por PCR, con el fin de determinar la diversidad funcional, el número de bacterias, y la estructura de la comunidad bacteriana, respectivamente, en una mezcla de alperujo de oliva y estiércol de oveja así como en el compost y el vermicompost derivados de este residuo. Ambas tecnologías de reciclaje activaron de forma efectiva los parámetros microbianos del residuo tóxico, siendo el vermicompostaje el mejor proceso para promover mayor biomasa y diversidad bacterianas así como mayor diversidad funcional en dicho residuo. Aunque se encontraron varias poblaciones idénticas entre los materiales procesados y no procesados, cada tecnología de reciclaje modificaba de manera diversa las comunidades bacterianas presentes inicialmente en el residuo tóxico, indicando que estos procesos jugaban un papel diferente en la selección bacteriana del residuo procesado.

*Este artículo ha sido publicado en la revista **Bioresource Technology** (2009) 100 (3), 1319-1326*





# Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste

A. Vivas, B. Moreno, S. García-Rodríguez, E. Benitez\*

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, c/Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 20 June 2008

Received in revised form 5 August 2008

Accepted: 7 August 2008

Available on line XXXX

### Keywords:

Bacterial diversity

DGGE

Enzyme activities

Olive-mill waste

Recycling technology

## ABSTRACT

The aim of the present study was to couple biochemical and molecular methodologies for evaluating the impact of two recycling technologies (composting and vermicomposting) on a toxic organic waste. To do this, six enzyme activities controlling the key metabolic pathways of the breakdown of organic matter, real-time PCR assays targeting 16S rRNA genes, and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiling-sequence analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragments, have been used to determine the functional diversity, bacterial number, and bacterial community structure, respectively, in a mixture of olive waste and sheep manure and in the derived compost and vermicompost. Both recycling technologies were effective in activating the microbial activity and diversity of the toxic waste, being the vermicomposting the best process to produce greater bacterial diversity, greater bacterial numbers and functional diversity. Although several identical populations were detected in the processed and non-processed material, each technology modified the original microbial communities of the waste in a diverse way, indicating the different role of each one in the bacterial selection.

## 1. Introduction

One of the most problematic solid biowastes, for which disposal has become an enormous dilemma in the Mediterranean area, is olive-mill solid waste. The two-phase centrifugation process for olive-oil extraction annually generates huge amounts (about 3100000 tonnes in Andalusia (Spain) in the 2006/2007 season) of a waste called olive-mill solid waste (Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, 2006). Olive wastes are highly toxic to microorganisms, related to its content of different types of polyphenols (Benitez et al., 2004). In addition, the wastes exhibit a strong bactericide and bacteriostatic activity (Ramos-Cormenzana et al., 1996).

Composting and vermicomposting are two of the best-known processes for the biological stabilization of solid organic wastes. While composting involves the accelerated degradation of organic matter by microorganisms under controlled conditions; the joint action of earthworms and microorganisms characterize the bio-oxidation of organic material in the vermicomposting. Besides the earthworms, the main difference between them can be found in the first of the two phases that characterize the advancements of both processes. A thermophilic stage, where decomposition takes place intensively, constitutes the active phase of

composting. In vermicomposting, the stimulation of the metabolic activity of the microorganisms, either living free and/or associated with the earthworm gut, and a concomitant exponential increase of the total biomass of earthworms, characterize the mesophilic hydrolytic stage (Benitez et al., 1999). Therefore, microorganisms are the main responsible of the biochemically degradation of the organic matter during composting and vermicomposting processes but, in this last, earthworms affect microflora activity and diversity (Fracchia et al., 2006; Lazcano et al., 2008). After these initial phases, the selected microbes throughout both processes take over in the decomposition of the waste during a mesophilic maturation phase.

Knowledge of the microbial structure and functions (involved in the main nutrient cycles) in mature composts and vermicomposts, is important to predict its potential impact on soil fertility (Ryckeboer et al., 2003). To date, the structural and functional diversity of microbial communities in these organic by-products have been determined by using molecular techniques (Fracchia et al., 2006; Yang et al., 2007) and selected parameters as enzymes activities (García et al., 1993; Benitez et al., 1999, 2005). However, there are very few studies comparing the microbial community and activity in compost and vermicompost from the same feedstock. In these, the wider fungal diversity of vermicompost can be clearly perceived (Anastasi et al., 2005; Lazcano et al., 2008), but the results concerning bacterial population are not very illuminating. For instance, some authors

\* Corresponding author. Tel.: +34 958181600; fax: +34958129600  
E-mail address: [emilio.benitez@eez.csic.es](mailto:emilio.benitez@eez.csic.es) (E. Benitez).  
doi: 10.1016/j.biortech.2008.08.014

found that compost exhibited higher cultivable bacteria biomass and diversity than vermicompost (Vaz-Moreira et al., 2008); others as Hiraishi (1999) found the opposite when focusing on ubiquinone-containing bacteria.

The aim of the present study was to assess the impact of composting and vermicomposting on the bacterial population size and community structure of an olive-mill waste, as well as on the main enzymes involved in the breakdown of the organic substances. To do this, real-time PCR assays targeting 16S rRNA genes and denaturing gradient gel electrophoresis profiling-sequence analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragments (PCR-DGGE) were used, and the activity of six enzymes (dehydrogenase, *o*-diphenoloxidase,  $\beta$ -glucosidase, phosphatase, BAA-protease and urease) were determined.

## 2. Methods

### 2.1. Recycling techniques, by-products and sampling

The fresh olive waste was obtained from a commercial olive-oil manufacturer (Romeroliva, Deifontes, Granada, Spain). Both composting and vermicomposting were done in triplicate and in indoor conditions, controlling the temperature and moisture levels of the organic materials during the processes. The vermicompost (VOW) was prepared according to Benitez et al. (2002) from a mixture of fresh olive waste and sheep manure (8:1 dry weight) inoculated with *Eisenia fetida* (initial density: 5g worms per 100g dry waste) in 1.5 m<sup>2</sup> vermicomposting beds. The beds were composed of a wooden frame set on a 5% slope and lined with a net (2 mm mesh) plus a layer of plastic with an outlet for possible leachate drainage underneath. During the vermicomposting period (9 months) the moisture content of the substrate in each bed was kept at 80–85% by irrigation. The compost (COW) was prepared from the same organic mixture, and olive leaves were added to provide enough aeration during the composting following the local common practice, i.e. about 30% of the total wet weight. The compost pile (40 m<sup>3</sup>) was mechanically turned once a month for 6 months. The material was then left undisturbed for a further 3-month maturation period.

After 9 months of composting and vermicomposting, the finished by-products were air dried, mechanically homogenized, ground up and passed through a 2 mm mesh. Then, they were placed, following the local common practice, in a storage room under darkness and dryness conditions. The same was done for the initial substrate consisting of a mixture of fresh olive waste and sheep manure at a ratio of 8:1 (dry weight) (OW). To perform the enzyme activities and DNA analyses, three cores of each by-product were taken six months after sampling. The justification for waiting this long was to characterize the products as they generally are used in restoration or agriculture. Air-drying samples is a good

storage procedure before measuring enzyme activities and DNA if samples are stored for enough time (Bonmati et al., 2003; Fracchia et al., 2006).

### 2.2. Enzyme activities

Dehydrogenase activity was determined using 0.2 g of the organic samples and the reduction of 2-p-iodo-3-nitrophenyl 5-phenyl tetrazolium chloride to iodonitrophenylformazan (INTF) by the method of Von Mersi and Schinner (1991) modified by Garcia et al. (1997). Hydrolytic activities (BAA-protease, urease, phosphatase and  $\beta$ -glucosidase) were determined using 0.2 g of the organic samples according to Tabatabai and Bremmer (1969), Nannipieri, et al. (1980), and Bonmati et al. (1998). Analysis of the *o*-diphenol oxidase was performed according to Perucci et al. (2000) using 0.2 g of the organic samples.

### 2.3. DNA extraction

The total DNA was extracted from 250 mg of each subsample (3 extractions per each by-product) by the bead-beating method, following the manufacturer's instructions MoBio UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA) with a few modifications, including the repetition of the second step (Inhibitor Removal Solution) to remove trace concentrations of PCR inhibitors. The DNA samples were checked for concentration and quality using the NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware; USA).

### 2.4. PCR-DGGE analysis

PCR was performed with the 16S rRNA universal bacterial denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) primers (TIB<sup>®</sup>MOLBIOL, Berlin, Germany) F341, R907, and GC-F341 (P3) to amplify the V3 to V5 hypervariable regions of 16S rRNA genes. Primer P3 contains the same sequence as F341 but with an additional 40-nucleotide GC-rich sequence (GC clamp) at its 5' end (Yu and Morrison, 2004). The PCR program was initiated by a hot start of 5 min at 94°C; after 9 min of initial denaturation at 95°C, a touchdown thermal profile protocol was used, and the annealing temperature was decreased by 1°C per cycle from 65°C to 55°C; then 20 additional cycles at 55°C were performed. Amplification was carried out with 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of primer annealing, and 1.5 min of primer extension at 72°C, followed by 10 min of final primer extension. The total reaction mixture of the first PCR consisted of 25  $\mu$ l with the following ingredients: 1  $\mu$ l volume (approx.10 ng) of extracted DNA, 1.5 M primer F341, 1.5  $\mu$ M primer R907, 10  $\mu$ l Eppendorf<sup>®</sup> Master Mix (2.5X) and sterile Milli-Q water to a final volume. The second amplification was performed by using 1  $\mu$ l of the products of the first reaction as template. In this, primers P3 and R907 were used under the same

conditions described above. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

DGGE analyses were conducted using 20  $\mu$ l of this latter PCR product loaded into a 50 to 65% urea-formamide-polyacrylamide gel. An INGENYphorU System (Ingeny International BV, The Netherlands) was run at 100 V for 16 h at 58°C to separate the fragments. Gels were silver stained with the Bio-Rad Silver Stain according to the standard DNA-staining protocol and photographed under UV light ( $\lambda = 254$  nm) using an UVitec Gel Documentation system (UVitec Limited, Cambridge, UK).

Representatives of bands that were clear and had high intensity were excised from DGGE gels and sequenced. DNA fragments from DGGE were isolated as described by Schweiger and Tebbe (1998) with the noted modifications. Bands detected were cut out with a scalpel and extracted with 200  $\mu$ l of elution buffer (0.5 M ammonium acetate, 10 mM  $Mg^{2+}$ -acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) at 37°C, 1000 rpm; in a heating block (Mixing Block MB-102 BIOER) for six hours. Samples were then centrifuged for 10 minutes at 12,000 $\times$ g at room temperature. A total of 40  $\mu$ l from the supernatant was transferred into a micro-test tube and three volumes of ethanol during three days at -20°C. Then samples were centrifuged for 20 minutes at 12,000 $\times$ g at 4°C. The DNA was dried for 30 minutes at 30°C and resuspended in 20  $\mu$ l Tris-HCl (10 mM, pH 8.0). The DNA isolated from bands were checked for concentration and quality using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. PCR was conducted as described above used primers P3 and 907R with 1 to 2  $\mu$ l of this solution (5 to 10 ng for reaction). Thereafter, PCR fragments were purified by MBL-Agarosa Quickclean (Dominion-MBL SL, Spain), cloned and subsequently sequenced in both directions by using an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). Sequence identifications were performed using the "Sequence Match" facility of the Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>). An  $S_{ab}$  score match higher than 0.7 allows associating the best match found to a genus name (Maidak et al., 2001). Possible chimeric sequences were checked using the CHECK\_CHIMERA program of the RDP database (Cole et al., 2007), and suspected sequences were removed from analyses. Sequences were filed under GenBank accession numbers EU275379-5403.

### 2.5. Real-time PCR assay

Real-time PCR was performed to quantify the number of 16S rRNA copy in triplicate olive waste, compost and vermicompost DNA extracts. Universal primers specific for V3 hypervariable region of 16S rRNA of eubacteria P1 and P2 (Muyzer et al., 1993) were used. Each 21  $\mu$ l PCR reaction contained from two to five ng of the DNA, 10.5  $\mu$ l 2 $\times$  iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany), and 400 nM each primer. Three

replicates for each extracted DNA were included. The real-time PCR program consisted of 1.5 min at 50 °C for carryover prevention, 15 min at 95 °C for enzyme activation, followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C, when the fluorescence signal was measured. PCR amplification procedure was checked with a heat dissociation protocol (from 70 °C to 100 °C) after the final cycle of the PCR. Quantification of the DNA copy number was performed on a iQ5 thermocycler using iQ5-Cycler software (Bio-Rad, Munich, Germany).

The standard curve was generated by using a plasmid recombinant containing one copy of 16S rRNA fragment. The curve was obtained by plotting the Ct value as a function of log of the copy number of 10-fold dilution serial of plasmid DNA. As Ct values may vary slightly between experiments, parallel sets of the three dilution series of pure standard DNA were run in all experiments. The relationship between Ct and the target gene copy number, and the copy numbers of the real-time standard were calculated as described Quian et al. (2007).

### 2.6. Data analyses

Results of enzyme activities and real-time PCR are the means of three and nine replicates, respectively. Data were subjected to analysis of variance using the program STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) followed by Tukey's HSD test as a post hoc test to separate the means with an overall significance level of 0.05. Sun ray plots (Dilly and Blume, 1998) were constructed to show graphically the enzyme activities of the processed and non-processed materials. The star shape for each one allows a comparison of visual and numeric presentations of multivariate data and it has been proposed as an integrated fingerprinting for assessing microbial functional diversity (Nannipieri et al., 2002).

Band patterns in different DGGE lanes were compared with the UVImap Analysis software (UVitec Limited, Cambridge, UK). The lanes were normalized to contain the same amount of total signal after background subtraction and the gel images were straightened and aligned to give a densitometric curve. Bands were assigned and matched automatically and then checked manually. Band positions were converted to Rf values between 0 and 1 and profile similarity was calculated by determining Nei and Li's similarity coefficients (Nei and Li, 1979) for the total number of lane patterns from the DGGE gel. The similarity coefficients calculated were then used to construct a dendrogram using the unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA).

DGGE banding data were used to estimate three diversity indices by treating each band as an individual operational taxonomic unit (OTU). For these analyses, each band was presumed to represent the ability of that bacterial species to be amplified (Ibekwe and Grieve, 2004). The Shannon index of general diversity  $H'$

(Shannon and Weaver, 1963) and Simpson index of dominance  $D$  (Simpson, 1949) were calculated from the number of bands present and the relative intensities of the bands in each lane. The intensity of the bands was reflected as peak heights in the densitometric curve. The Shannon  $H'$  and Simpson  $D$  indexes were calculated from the following equations:

$$H' = -\sum(P_i \times \log P_i); D = \sum P_i^2$$

where  $P_i = n_i/N$ ;  $n_i$  =height of peak,  $N$  =sum of all peak heights in the curve.

To test if similarities observed within and between samples were greater or less than would be expected by chance, band matching data was stored as a binary matrix and analysed using Raup and Crick's probability-based index of similarity  $S_{RC}$  (Raup and Crick, 1979). The  $S_{RC}$  is the probability that the randomized similarity would be greater than or equal to the observed similarity and  $S_{RC}$  values above 0.95 or below 0.05 signify differences, which are not random assortments of the same species (bands or OTUs) (Rowan et al., 2003).  $S_{RC}$  and cluster analyses were calculated using the PAST (Palaeontological statistics, version 1.82b) program (Hammer et al., 2001).

### 3. Results

Figure 1 shows the sun ray diagrams plotting the assayed enzyme activities along different radial axes. Treatment of the olive waste by composting or vermicomposting boosted the dehydrogenase,  $\beta$ -glucosidase and urease activities, prompting the highest enzyme activities when the OW was degraded by the earthworms ( $P<0.05$ ). In contrast, both recycling technologies significantly decreased the OW *o*-diphenol oxidase activity ( $P<0.05$ ). The phosphatase activity displayed by OW declined when composting ( $P<0.05$ ) and remained the same after the vermicomposting. The opposite trend was found for the BAA protease activity (Fig. 1).

A real-time PCR standard curve was generated for bacterial 16S rRNA quantification. Serially diluted DNA originating from recombinant plasmid including 16S rRNA fragment showed the single expected amplicon of 193 bp. The equation describing the relationship between Ct and the log number of 16S rRNA copies was  $Ct = -3,329 \times \log(16S \text{ rRNA}) + 48,059$ ,  $R^2 = 0,997$ . Target molecules were linear from  $10^4$  to  $10^9$  copies. The OW showed a median density of  $1.08 \times 10^9 \pm 2.05 \times 10^7$  copies per gram. Comparison of the COW and VOW revealed a significant increase ( $P<0.05$ ) of the number of 16S rRNA copies ( $1.58 \times 10^9 \pm 8.25 \times 10^7$  and  $2.12 \times 10^9 \pm 1.29 \times 10^7$ , respectively).

Comparison of the bacterial communities from OW, COW and VOW showed distinctly different profiles across the DGGE gel. To compare DGGE profiles, Nei and Li's indices were determined and UPGMA was used to create a dendrogram describing pattern similarities.

The dendrogram generated showed that OW and COW clustered together with a homology coefficient of about 70%, and these two with the VOW (Fig. 2a).

For a better understanding of the above trend, the structural diversity of the microbial community was also examined by the Shannon ( $H'$ ) and Simpson ( $D$ ) diversity indexes. The vermicomposting increased  $H'$  and decreased  $D$  index from the DGGE banding patterns. Values closest to OW were found for COW (Table 1).

The  $S_{RC}$  values obtained from the comparison of unprocessed and processed material are summarized in Table 2. Similarities within replicas were significant in all by-products ( $S_{RC}=1$ ). VOW was significant dissimilar to OW and COW ( $S_{RC}<0.05$ ). For OW and COW, a similarity no greater than expected by chance ( $0.95A>S_{RC}>0.05$ ) was observed. The figure 2b shows the dendrogram generated by the Raup and Crick cluster analyses.

The sequences of a total of 38 DNA fragments were successfully determined (560-587 bases) revealing an S\_ab score match higher than 0.7, which allows to associate the best match found to a genus name. The sequences consisted of 13, 12, and 13 dominant bands excised from DGGE analyses of the OW, COW and VOW, respectively. The retrieved sequences could be attributed to a total of five different bacterial phyla: *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* (Table 3).

**Table 1**

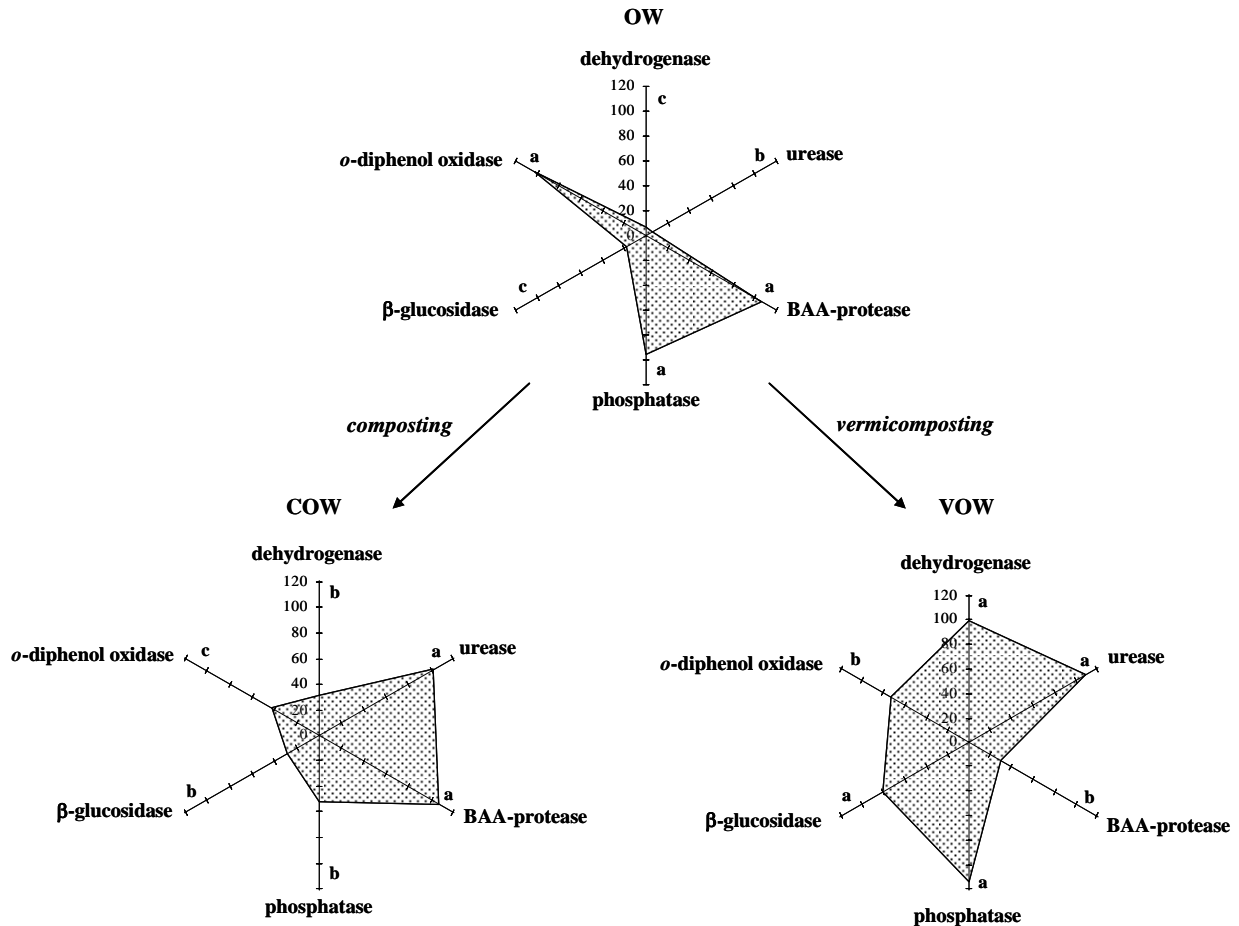
Shannon index of general diversity ( $H'$ ) and Simpson index of dominance ( $D$ ) for DGGE profiles from the initial mixture of olive waste and sheep manure (8:1) (OW), compost (COW), and vermicompost (VOW).

	$H'$	$D$
OW	-2.8246	0.0643
COW	-2.8648	0.0628
VOW	-3.1172	0.0494

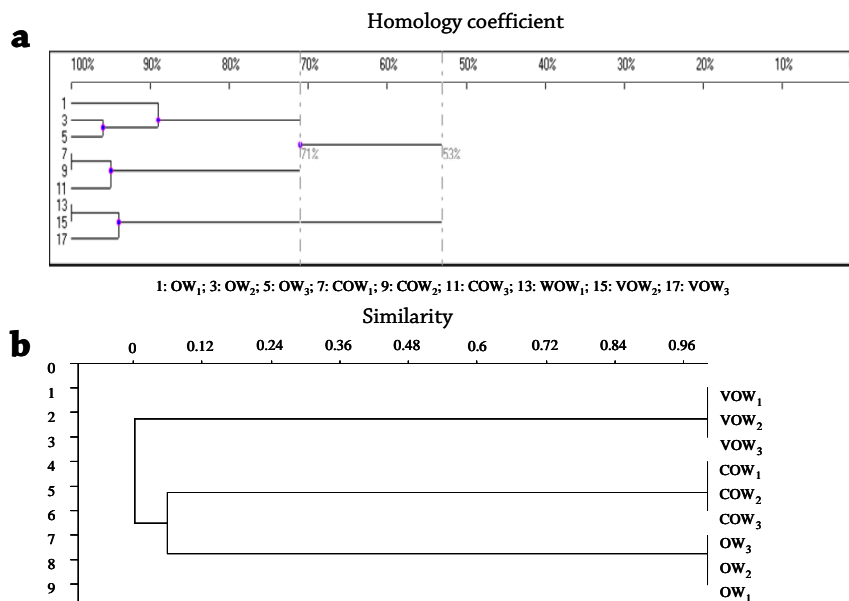
**Table 2**

Similarities values ( $S_{RC}$ ) within and between samples for DGGE profiles from the initial mixture of olive waste and sheep manure (8:1) (OW), compost (COW), and vermicompost (VOW).

	OW <sub>1</sub>	OW <sub>2</sub>	OW <sub>3</sub>	COW <sub>1</sub>	COW <sub>2</sub>	COW <sub>3</sub>	VOW <sub>1</sub>	VOW <sub>2</sub>
OW <sub>2</sub>	1							
OW <sub>3</sub>	1	1						
COW <sub>1</sub>	0.060	0.075	0.063					
COW <sub>2</sub>	0.048	0.055	0.060	1				
COW <sub>3</sub>	0.055	0.063	0.055	1	1			
VOW <sub>1</sub>	0.003	0	0.007	0	0	0		
VOW <sub>2</sub>	0.008	0.003	0	0	0	0	1	
VOW <sub>3</sub>	0.005	0.013	0.007	0	0	0	1	1



**Fig. 1.** Enzyme activities in the initial mixture of olive waste and sheep manure (8:1) (OW), compost (COW), and vermicompost (VOW). Mean of triplicate samples are presented for dehydrogenase ( $\text{g INTF g}^{-1}\text{h}^{-1}\times 2$ ), urease ( $\text{g NH}_4 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}\times 2$ ), BAA-protease ( $\text{g NH}_4 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}\times 10$ ), *o*-diphenol oxidase ( $\text{mol catechol } 10\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}\times 2$ ), phosphatase ( $\text{g PNP g}^{-1}\text{h}^{-1}\times 1.5$ ), and  $\beta$ -glucosidase ( $\text{g PNP g}^{-1}\text{h}^{-1}\times 2$ ). For each enzyme activity, significant differences are indicated by different letters ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** (a) UPGMA dendrogram with homology coefficient % 1.0 and (b) Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses for DGGE profiles from the initial mixture of olive waste and sheep manure (8:1) (OW), compost (COW), and vermicompost (VOW).

The initial mixture of olive wastes and manure was dominated by members of the phylum *Proteobacteria* (10 sequences of 13). The rest of sequences included a single member of each *Actinobacteria* (*Streptomyces* sp.), *Firmicutes* (uncultured bacterium genus *Staphylococcus*) and *Acidobacteria* (uncultured bacterium). Within *Proteobacteria*, the *Beta* subclass clones were more abundant in the recovered bands; all of them (5 sequences) closely related to the genus *Comamonas*. *Gammaproteobacteria* contained four sequences from OW, closely related to the genus *Hydrocarboniphaga* (1 sequence), *Pseudoxanthomonas* (2 sequences) and *Stenotrophomonas* (1 sequence). The phylogenetic group related to *Alphaproteobacteria* was placed in the spectrum of *Brevundimonas* sp.

Composting reduced the number of DGGE bands affiliated to the *Betaproteobacteria*, and the two retrieved clones could be ascribed to the genus *Bortedella*. Three bands of *Gammaproteobacteria*, corresponding to the genus *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas* and *Stenotrophomonas*, were also recovered from the compost. *Alphaproteobacteria* class was represented in composts by four bands related to the genus

*Porphyrobacter*, *Rhizobium*, *Acidisphaera* and one unclassified bacterium. Compost sequences also included one single member of each phylum *Actinobacteria* (*Streptomyces* sp.), *Firmicutes* (uncultured bacterium genus *Staphylococcus*), and *Bacteroidetes* (*Pseudospingobacterium domesticus*).

Like the composting, the vermicomposting reduced the numbers of bands affiliated to *Betaproteobacteria* and, as in the initial mixture; the two recovered bands were closely related to the genus *Comamonas*. The rest of the clones ascribed to *Proteobacteria* were four *Gammaproteobacteria* (uncultured bacterium genus *Hydrocarboniphaga*, uncultured bacterium genus *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Xanthomonas campestris*), and three *Alphaproteobacteria* (uncultured bacterium genus *Porphyrobacter*, *Brevundimonas* sp., and uncultured bacterium genus *Bosea*). Two members of *Actinobacteria* (*Arthrobacter* sp., and *Rhodococcus* sp.), one of *Firmicutes* (uncultured bacterium genus *Staphylococcus*), and one uncultured bacterium belonged to *Acidobacteria* were also represented in the vermicompost.

**Table 3**

Nearest match identification of bacterial 16S rRNA gene sequences isolated from the initial mixture of olive waste and sheep manure (8:1) (OW), compost (COW) and vermicompost (VOW).

GenBank entry	Band number			Taxon/genus	Closest phylogenetic relative; GenBank entry;	CHIMERA-CHECK	
	OW	COW	VOW			S_ab	Olis
EU275379	2		1	Acidobacteria/genus Gp6	uncultured Acidobacteria bacterium; EF664439	0.779	818
EU275380	4			Proteobacteria/Comamonas	Comamonas denitrificans; AF233876	0.962	1360
EU275381		4	7	Proteobacteria/Xanthomonas	Xanthomonas campestris; AF123092	0.937	2008
EU275382	8	5	9	Firmicutes/Staphylococcus	uncultured bacterium; DQ532338	0.941	1437
EU275383		7		Proteobacteria/Rhizobium	Rhizobium sp. ORS 1465; AY500261	0.927	1376
EU275384	10		11	Proteobacteria/Hydrocarboniphaga	uncultured Panacagrionas sp.; EF667410	0.837	1008
EU275385		8	12	Proteobacteria/Porphyrobacter	uncultured alpha proteobacterium; AY921774	0.920	1273
EU275386		9		Proteobacteria/Bortedella	uncultured bacterium; AY945899	0.732	1408
EU275387			13	Proteobacteria/Stenotrophomonas	Stenotrophomonas maltophilia; AJ131117	0.869	1405
EU275388	12		14	Proteobacteria/Comamonas	uncultured Comamonas sp.; EF490653	0.967	359
EU275389	13	10	15	Proteobacteria/Pseudoxanthomonas	Pseudoxanthomonas sp.; DQ337597	0.876	1411
EU275390		11		Bacteroidetes/Sphingobacterium	Pseudospingobacterium domesticus; AM407725	0.745	1386
EU275391	14			Proteobacteria/Comamonas	Comamonas sp.; AM084020	0.951	1398
EU275392	15			Proteobacteria/Pseudoxanthomonas	uncultured bacterium; AJ306770	0.775	1427
EU275393		12		Proteobacteria/Bortedella	Bortedella sp.; DQ453688;	0.910	1418
EU275394			17	Actinobacteria/Arthrobacter	Arthrobacter sp.; AY177360	0.944	1324
EU275395	16		19	Proteobacteria/Brevundimonas	Brevundimonas sp.; DQ406733	0.826	1373
EU275396	17	15		Proteobacteria/Stenotrophomonas	Stenotrophomonas maltophilia; AF100732	1.000	1332
EU275397			20	Proteobacteria/Bosea	alpha proteobacterium; AY162045	0.922	1282
EU275398	19		23	Proteobacteria/Comamonas	Comamonas sp.; AM084020	0.704	1398
EU275399		18		Proteobacteria/Acidisphaera	uncultured bacterium; DQ458041	0.837	1240
EU275400		19		Proteobacteria/unclassified - proteobacteria	filamentous alpha proteobacterium; AY590697	0.717	984
EU275401	20	20		Actinobacteria/Streptomyces	Streptomyces sp.; AY299619	0.824	1385
EU275402			29	Actinobacteria/Rhodococcus	Rhodococcus sp.; AJ007003	0.950	1324
EU275403	7			Proteobacteria/Comamonas	Comamonas sp.; AB277849	0.988	1404

#### 4. Discussion

This study reveals that composting and especially vermicomposting were effective in activating the microbial activity and bacterial diversity of a toxic waste. The results confirm that the two different processes selected for specific bacterial communities in the finished products.

The total activity of microorganisms can be estimated by measuring the activity of a living cell-associated enzyme such as dehydrogenase (Nannipieri et al., 2002). As is typical of products derived from the olive-oil extraction, the OW displayed a very low initial dehydrogenase activity, mainly related to the high content of polyphenols which inhibit the activity of this enzyme (Benitez et al., 2004; Saavedra et al., 2006). The low activity of OW reflects the recalcitrance of the olive-waste organic matter and its resistance to biodegradation. Composting and vermicomposting removed, respectively, the 12 and 95% of the total soluble phenolic compounds (data not shown), activating microbial activity, thereby augmenting the dehydrogenase activity (Saavedra et al., 2006).

The activity of  $\beta$ -glucosidase was very low in the OW. It is an inducible enzyme, and the action of the microorganisms (composting) or the combined action of microorganisms and *E. fetida* (vermicomposting) could release low-molecular-weight C molecules which boosted this activity, prompting the highest enzyme activity also when vermicomposting (Benitez et al., 1999). Regarding the N-cycle, both OW and COW displayed similar BAA-protease activity. Proteins constitute a major component of olive wastes (nearly 8%). Martin Garcia and colleagues found that, even when composted, proteins in these wastes are scarcely available for being associated with the lignocellulosic fraction (Martin Garcia et al., 2004). Similar results have been found in our work, where it appears the peptide C-N bond molecules did not hydrolyze during composting. By contrast, earthworms and microorganisms together could be able first to depolymerize and afterwards to degrade available peptides from the olive waste through BAA-protease enzymes during vermicomposting. Despite that urea may account for approximately 50% of the total N in manure, the urease activity detected in OW was quite low. It has been reported that soluble polyphenols inhibit the activity of this enzyme (Saavedra et al., 2006) and the partial/total degradation of these could allow an increase of the activity after the composting/vermicomposting processes, respectively. The high initial phosphatase activity could be related to the amount of organic phosphate compounds present in the olive wastes and sheep manure, which may act as enzyme-synthesis-inducing substrates (Burns, 1982). Taking into account the low microbial activity detected in OW, a pool of extracellular phosphatase enzymes, immobilized in humus-like compounds and previously described in olive wastes by Benitez et al. (2005), could be the primary responsibility for this activity. The

phosphatase activity slightly decreased only when composting presumably for the consumption of the organic phosphate compounds by the microorganisms. Activity of earthworms could release P-cycle metabolizable substrates during vermicomposting and similar values (about 70 mg PNP g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) at initial and final stages of the process were detected. The *o*-diphenol oxidase activity decreased when OW biostabilized. Phenol oxidases are described as water-soluble extracellular enzymes (Schimel and Weintraub, 2003) but, in view of the low microbial activity and the higher *o*-diphenol oxidase activity detected in OW, the existence of a pool of phenol oxidase exoenzymes linked and protected by the organic matter of the olive wastes should be considered.

Sun ray plots show graphically the enzyme activities set of processed and non-processed materials. The shape of each one was quite different, indicating a distinct pattern of enzyme activity (Nannipieri et al., 2002). The shapes also indicate that functional diversity in OW was clearly low, increasing with composting and especially with vermicomposting.

The bacterial DNA profiles produced by DGGE have been proposed as a semi-quantitative measure of bacterial diversity (Dilly et al., 2004). The UPGMA dendrogram revealed that the structure of the bacterial community from the compost is more similar to that from the original waste than to that from the vermicompost. The difference found between COW and VOW could support the above-mentioned hypothesis concerning inadequate or non finished composting process, as well as the fact that earthworms help breakdown the olive waste during the vermicomposting.

The vermicomposting increased *H'* and decreased *D* index from the DGGE banding patterns, suggesting an increase in bacterial diversity (Dilly et al., 2004). Composting did not affect the bacterial genetic diversity of the olive waste to a similar degree, and values closest to OW were found again for COW. However, we must consider these assumptions carefully because most diversity indices do not reflect differences in species richness, species evenness, or simply sampling differences (Gotelli and Colwell, 2001). To test if similarities observed within and between samples were greater or less than would be expected by chance, band matching data was analysed using Raup and Crick's probability-based index of similarity *S*<sub>RC</sub>. The results confirm the above conclusions and values less than 0.05, which denotes differences among microbial communities and not random assortments of the same OTUs or bands (Rowan et al., 2003; van der Gast et al., 2005), were found between OW and VOW and between COW and VOW. The Raup and Crick cluster analyses strengthened the results of the dendrogram generated from the UPGMA cluster analyses; that is, there were more differences between the compost and the vermicompost than between the compost and the original waste.



When the structure and diversity of bacterial communities were examined, the number of bacterial DNA bands increased, particularly with the vermicomposting. The fundamental role of the earthworms in the growth of the microbial biomass and the activation of several enzyme activities during vermicomposting has been previously discussed. Aira et al. (2007); Fracchia et al. (2006) also found the same trend when comparing finished compost and vermicompost from different organic wastes, concluding that the higher diversity detected in vermicompost correlates well with a higher functional diversity. Our study revealed a clear relation between greater bacterial numbers, greater bacterial diversity and greater microbial activity for the vermicomposting process. In composting, the effect on the OW dehydrogenase activity and the number of bacteria was also substantial but, in this case, the diversity of bacteria was only slightly enhanced. These results could be attributed to PCR-DGGE methodology, since the method reveals only the dominant populations (Heuer et al., 2001) and, in our work, only bacterial populations, but the possibility of a more bacteriostatic than bactericidal effect of the olive waste polyphenols should be considered.

Until now, very few studies have been conducted on the bacterial diversity of wastes derived from olive-oil industry. In 2006, Ntougias and colleagues spearheaded the first effort to investigate the olive-waste bacterial diversity by 16S rRNA gene-sequence analyses (Ntougias et al., 2006). Despite that they focused their study on alkaline olive waste (after addition of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), the bacterial populations identified are similar to those found in our study; that is, non-treated acidic olive waste mixed with sheep manure (8:1). In both studies, members of the phylum *Proteobacteria* are the predominant bacterial group detected. Nevertheless, the *Betaproteobacteria* class is not represented in the alkaline olive wastes, while in the initial mixture of our study this is the most abundant class of bacteria found.

In this study, several identical populations were detected in the OW and in the compost, while others were similar in the OW and in the vermicompost, suggesting that these populations were derived from the initial organic mixture. *Proteobacteria* were the most abundant phylum in all cases. Similar findings have been reported by others authors when the impact of composting on the microbial community structure of cattle manure or sewage sludge was assessed (Tang et al., 2004; Danon et al., 2008). However, composting and vermicomposting modified the original microbial communities of the waste in a diverse way. Representative bacteria of mature compost (*Actinobacteria* and *Gammaproteobacteria*) were more abundant in vermicompost, and bacterial phylogenetic groups typical of non-cured compost; that is, *Alphaproteobacteria* and *Bacteroidetes*, were more abundant in compost. Nevertheless, both technologies reduced the number of clones affiliated to *Betaproteobacteria*, and some grade of maturation in the

two processed materials could be suspected (Danon et al., 2008). Taking into consideration that after nine months both processes should be in the phase of maturation, these results could support the widespread assertion concerning the faster mineralization rate of the wastes due to earthworms' action with respect to composting.

## 5. Conclusions

The results of the present study confirm that coupled biochemical and molecular methodologies are helpful approaches for evaluating the impact of composting and vermicomposting on a toxic organic waste, as well as for characterizing the derived finished products.

In our study, the low microbial functional diversity retrieved in the olive waste was enhanced by both recycling technologies, particularly when *E. fetida* was present. Similarly, greater bacterial population size and diversity were detected in the finished vermicompost. Composting and vermicomposting modified the original microbial communities of the waste in a diverse way, indicating the different role of each one in the bacterial selection.

## Acknowledgements

This work has been financed by the Education and Science Ministry through projects REN2003-05359, Intramural 2006 4 OI 113 and B. Moreno's grant. We would also like to thank David Nesbitt for assisting in the translation of the original manuscript into English.

## References

- Aira, M., Monroy, F., Domínguez, J., 2007. Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. *Sci. Total Environ.* 385, 252-261.
- Anastasi, A., Varese, G.C., Filippello Marchisio, V., 2005. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia* 97, 33-44
- Benitez, E., Nogales, R., Elvira, C., Masciandaro, G., Ceccanti, B., 1999. Enzymes activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting by *Eisenia foetida*. *Bioresource Technol.* 67, 297-303.
- Benitez, E., Sainz, H., Melgar, R., Nogales, R., 2002. Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: a pilot scale study. *Waste Manage. Res.* 20, 134-142.
- Benitez, E., Melgar, R., Nogales, R., 2004. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1615-1623.
- Benitez, E., Sainz, H., Nogales, R., 2005. Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Bioresource Technol.* 96, 785-790.
- Bonmati, M., Ceccanti, B., Nannipieri, P., 1998. Protease extraction from soil by sodium pyrophosphate and chemical characterization of the extracts. *Soil Biol. Biochem.* 30, 2113-2125.

- Bonmati, M., Jiménez, P., Julia, M., 2003. Soil enzymology: some aspects of its interest and limitations. In: Lobo, M.C., Ibañez, J.J. (Eds.). Preserving soil quality and soil biodiversity. IMIA, CSIC, Madrid, pp. 63-75
- Burns, R.G., 1982. Enzyme activity in soils: location and a possible role in microbial activity. *Soil Biol. Biochem.* 14, 423-427.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 35 (Database issue): D169-D172; doi: 10.1093/nar/gkl889.
- Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 2006. Primer Aforo de Aceite de Oliva en Andalucía. [http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/www/portal/com/bin/portal/DGPAgraria/Estudios\\_Prospectiva/Estudios\\_Informes/Sectoriales/olivar/aforo2006.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/www/portal/com/bin/portal/DGPAgraria/Estudios_Prospectiva/Estudios_Informes/Sectoriales/olivar/aforo2006.pdf).
- Danon, M., Franke-Whittle, I.H., Insam, H., Chen, Y., Hadar, Y., 2008. Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 133-144
- Dilly, O., Blume, H.P., 1998. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. *Adv. GeoEcol.* 31, 121-128.
- Dilly, O., Bloem, J., Vos, A., Munch, J.C., 2004. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl. Environ. Microb.* 70, 468-474.
- Fracchia, L., Dohrmann, A.B., Martinotti, M.G., Tebbe, C.C., 2006. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 942-952.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Ciardi, C., 1993. A study of biochemical parameters of composted and fresh municipal wastes. *Bioresource Technol.* 44, 17-23
- García, C., Hernández, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plan.* 28, 123-134.
- Gotelli, N., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* 4, 379-391.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Heuer, H., Wieland, G., Schonfeld, J., Schnwalder, A., Gomes, N.C.M., Smalla, K., 2001. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: Rochelle, P.A. (Ed.). *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, pp. 177-190.
- Hiraishi, A., 1999. A simple composting system using flowerpots and garden soil for disposal of household organic waste, *Seibutsu-kogaku* 77, 493-500.
- Ibekwe, A.M., Grieve, C.M., 2004. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 239-248.
- Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., Domínguez, J., 2008. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere* 72, 1013-1019.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker Jr, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 29, 173-174.
- Martín García, A.I., Yañez Ruiz, D.R., Moumen, A., Molina Alcaide, E., 2004. Effect of polyethylene-glycol on the chemical composition and nutrient availability of olive (*Olea europaea* var *europaea*) by-products. *Anim. Feed Sci. Tech.* 114, 159-177.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Matarese, E., 1980. Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 1011-1016.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.). *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Application*. Dekker Marcel, New York, pp. 1-33.
- Nei, M., Li, W., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *P. Natl. Acad. Sci. Usa* 76, 5269-5273.
- Ntougias, S., Zervakis, G.I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N., Papadopoulou, K.K., 2006. Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Res. Microbiol.* 157, 376-385.
- Perucci, P., Casucci, C., Dumonet, D., 2000. An improved method to evaluate *o*-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1927-1933.
- Quian, H., Hu, B., Cao, D., Chen, W., Xu, X., Lu, Y., 2007. Biosafety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78, 239-244.
- Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jiménez, B., García-Pareja, M.P., 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biometer. Biodegr.* 38, 283-290.
- Raup, D., Crick, R.E., 1979. Measurement of faunal similarity in paleontology. *J. Paleontol.* 53, 1213-1227.
- Rowan, A.K., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M., 2003. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 195-206.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J., 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol.* 53, 349-410.
- Saavedra, M., Benitez, E., Cifuentes, C., Nogales, R., 2006. Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* 17, 93-102.
- Schimel, J.P., Weintraub, M.N., 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biol. Biochem.* 35, 549-563.
- Schweiger, F., Tebbe, C.C., 1998. A new approach to utilise PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microb.* 64, 4870-4876.

## Resultados. Capítulo 1

Vivas et al./ *Bioresource Technology* 100 (2009) 1319-1326

- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The Mathematical Theory of Communication* The University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Tabatabai, M.A., Bremmer, J.M., 1969. Use of *p*-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301-307.
- Tang, J.C., Kanamori, T., Inoue, Y., Yasuta, T., Yoshida, S., Katayama, A., 2004. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Process Biochemistry* 39, 1999-2006
- van der Gast, C.J., Lilley, A.K., Ager, D., Thompson, I.P., 2005. Island size and bacterial diversity in an archipelago of engineering machines. *Environ. Microbiol.* 7, 1220-1226
- Vaz-Moreira, I., Silva, M.E., Manaia, C.M., Nunes, O.C., 2008. Diversity of Bacterial Isolates from Commercial and Homemade Composts. *Microb. Ecol.* 55, 714-722
- Von Mersi, W., Schinner, F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodonitrotetrazolium chloride. *Biol Fert. Soil* 11, 216-220.
- Yang, Z.H., Xiao, Y., Zeng, G.M., Xu, Z.Y., Liu, Y.S., 2007. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 918-925.
- Yu, Z., Morrison, M., 2004. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4800-480.



## **Capítulo 2**

---

**Solvent tolerance acquired by *Brevibacillus brevis*  
during an olive-waste vermicomposting process**



## **Solvent tolerance acquired by *Brevibacillus brevis* during an olive-waste vermicomposting process**

### **Resumen**

En este estudio, una bacteria cultivable Gram-positiva, resistente a solventes, fue aislada de residuos de olivar vermicompostados. La secuencia de su 16 S ADN encontró la similaridad más elevada (99%) con *Brevibacillus brevis*. El genoma del aislado, seleccionado por su tolerancia a TCE, contenía una secuencia nucleotídica que codificaba para un dominio conservado (Acr\_tran) de una proteína perteneciente a la familia RND-HAE1. Los miembros de esta familia son bombas de expulsión hidrofóbicas/anfifílicas fundamentalmente descritas en bacterias Gram-negativas. No se detectaron secuencias de ADN que codificasen para transportadores HAE1 en el genoma de un *Brevibacillus brevis* aislado de un suelo natural. En el alperujo de oliva sin vermicompostar no se aislaron bacterias tolerantes a solventes, por lo que la presencia de transportadores HAE1 en el *B. brevis* aislado del vermicompost podría ser explicada por una transferencia de genes de resistencia a solventes desde bacterias Gram-negativas durante el proceso de vermicompostaje. Bajo condiciones de estrés por TCE, la secuencia nucleotídica adquirida podría expresarse produciendo la proteína y confiriendo tolerancia a la bacteria aislada. Dicha bacteria fue designada como cepa BEA1 (número de acceso GenBank EF079071).

*Este artículo ha sido enviado a la revista **Ecotoxicology and Environmental Safety***



# Solvent tolerance acquired by *Brevibacillus brevis* during an olive-waste vermicomposting process

B. Moreno, A. Vivas, R. Nogales, E. Benitez\*

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, c/Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

## Abstract

In this work, a cultivable, Gram-positive, solvent-resistant bacterium was isolated from vermicomposted olive wastes. The highest 16S rDNA sequence similarity (99%) was found with *Brevibacillus brevis*. The genome of the isolate, selected for TCE-tolerance, contained a nucleotide sequence encoding a conserved protein domain (ACR\_tran) ascribable to the HAE1-RND family. Members of this family are hydrophobic/amphiphilic efflux pumps largely restricted to Gram-negative bacteria. No DNA sequences of HAE1 transporters were detected in the genome of a reference *B. brevis* strain isolated from natural soil. Since no cultivable solvent-tolerant bacterium was detected in the unvermicomposted olive waste, a transfer of solvent-resistance genes from Gram-negative bacteria during the vermicomposting process could explain the presence of HAE1 transporters in *B. brevis* isolated from the vermicompost. Under TCE stress conditions, the acquired nucleotide sequence could be translated into proteins, and tolerance to solvents is conferred to the bacterium. The isolate was designated as strain BEA1 (GenBank accession number EF079071).

**Keywords:** *Brevibacillus brevis*; HAE1 transporters; Olive waste; RND-like protein; Solvent tolerance; Vermicomposting.

## 1. Introduction

Trichloroethylene (TCE) is one of the most common organic pollutants found at hazardous-waste sites (Cunningham et al., 1996). TCE is a synthetic chemical that does not occur naturally in the environment; it is a suspected human carcinogen and it has been known to influence the structure and function of the soil community (Miller and Guengerich, 1983; Fuller et al., 1997).

Enhanced bioremediation is the general term used to describe the addition of microorganisms or nutrients to the subsurface environment to accelerate the natural biodegradation process. The potential of microorganisms for bioremediation of TCE has been extensively investigated over the last decades, and it has been found that methanogens, methanotrophs, and certain species of bacteria able to degrade aromatic compounds are microbes capable of removing TCE (Nelson et al., 1988). Nevertheless, there are no described organisms capable of using TCE as a sole energy source under aerobic conditions; rather they co-metabolically degrade the compound using an individual enzyme. The oxygenase enzymes involved in the breakdown of TCE, as well as substrates for co-metabolism, have been widely described (Ensign, 1991; Ensign et al., 1992).

In recent years, organic-releasing materials as biosolids from wastewater-treatment plants have been shown to be suitable cosubstrates to support co-metabolism of TCE (Kao et al., 2001; 2004). To have

sufficient carbon bioavailability, to be readily accessible and to be relatively inexpensive have been described as three main characteristics that an organic material should display for its use as substrate for remediation. The presence in such organic materials of microorganisms capable of degrading or resisting high levels of solvents could actually improve bioremediation efficacy, especially when certain environmental conditions in the contaminated soils (excessive toxic levels of contaminant, low levels of nutrients, etc.) are unfavourable for the growth and activity of the indigenous soil microflora. To be effective in transformation or degradation of chemicals, the indigenous microorganisms should be capable of resisting to chemical pollutants, above all (Filip and Demnerova, 2006).

The molecular mechanisms for the resistance of bacteria to organic solvents have been previously studied and then related to the presence in the microorganisms of resistance-nodulation-division (RND) efflux pumps (Rojas et al., 2001; Ramos et al., 2002). The extrusion of toxic compounds by efflux transporters is the major pathway for bacterial detoxification and such efflux is due to the activity of membrane transporter proteins, the drug-efflux pumps. Phylogenetic analysis of RND transporters has shown that they could be separated into seven distinct families, including three hydrophobic/amphiphilic efflux families: the largely Gram-negative bacterial efflux family (HAE1), the Gram-positive bacterial putative efflux family (HAE2) and largely archaeal putative efflux family (HAE3) (Tseng et al., 1999). The HAE1 transporters comprise all known efflux pumps identified for organic solvents.

\* Corresponding author. Tel.: +34 958181600; fax: +34958129600  
E-mail address: [emilio.benitez@eez.csic.es](mailto:emilio.benitez@eez.csic.es) (E. Benitez).



Recently, molecular characterization of RND transporters from solvent-resistant bacteria by a polymerase chain reaction (PCR) strategy has been successfully developed in petroleum-contaminated soils by Meguro et al. (2005). Comparing the amino acid sequences of all known RND transporters, the authors found two regions that were conserved among the HAE1 transporter sequences. These conserved sequences were detected only in Gram-negative bacteria.

In the search for new bioremediation strategies, the potential for using olive-mill solid waste, previously stabilized through vermicomposting processes, as an organic amendment for environmental remediation has been explored. It has been concluded that vermicompost from olive-mill wastes may be a suitable and economical method for reclaiming polluted tailings from Pb/Zn mines in the Mediterranean region as well as degraded soils (Benitez et al., 2004; Romero et al., 2005). Since vermicompost from olive-mill waste contains high levels of available carbon and nutrients, as well as high hydrolytic enzyme activities involved in the biodegradation of TCE (Benitez et al., 2002; Saavedra et al., 2006), it could also be a promising agent for bioremediation of solvent-contaminated soils.

The main objective of this study was to isolate from vermicomposted olive wastes, and then to characterize bacterial strains able to grow in high levels of TCE. The molecular genetic detection of solvent tolerance mechanism (RND efflux pumps) was also investigated in the isolated bacteria.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Treatment of olive wastes with Eisenia fetida*

The olive waste was obtained from a commercial olive-oil manufacturer (ROMEROLIVA, Deifontes, Granada, Spain). The vermicomposting process was performed on a pilot-scale experiment. For this, 60 kg (fresh weight) of olive waste were deposited on a 1.5 m<sup>2</sup> vermicomposting bed, composed of a wooden frame set on a 5% slope. The bed was 30 cm deep, with a layer of plastic sheeting and an outlet for leachate drainage underneath. The bed was prepared in a greenhouse without temperature control. For improved structure and C:N ratio, olive waste was mixed with manure at a ratio of 4:1 (wet weight). A belt of vermicomposted cattle manure was placed around the layer of olive waste to provide an initial habitat for *Eisenia fetida* earthworms and also to act as a source of microbial inoculum (Benitez et al., 2002). During the vermicomposting process (9 months), the moisture content of the substrate was kept at 80–85% by irrigation. One portion of vermicomposted olive waste was air dried prior to chemical and phytotoxicity analysis. The second portion was stored at 4 °C until biological assays were performed.

Chemical analyses and phytotoxicity test were determined using validated methods (Sims and Haby, 1971; M.A.P.A., 1986) in the olive waste (OW) and in the vermicomposted olive waste (VOW). The phytotoxicity bioassay was a slight modification of the method described by Zucchini et al. (1981). Water extracts (1:5) from OW and VOW were incubated (25 °C) in darkness for 24 h with cress seeds (*Lepidium sativum* L.). Distilled water was used as a control. Ten seeds were placed, by

quintuplicate, in Petri dishes (7 cm diameter) lined with filter paper containing 1 ml of each extract or distilled water. Germinated seeds (G) were counted and radicle growth (L) measured. The germination index (GI) was calculated according to the formula  $GI = (G/Go) \times (L/Lo) \times 100$ , where G and L are, respectively, the germination percentage and radicle growth of organic substrates while Go and Lo are, respectively, the germination percentage and radicle growth of the control. Analytical results are shown in Table 1.

### *2.2. Trichloroethylene Biodegradation/Tolerance*

The biodegradability was determined by measuring the ability of microorganisms from both OW and VOW to grow aerobically on TCE. Two suspensions of microorganisms were prepared, according to Berselli et al. (2004), by shaking 10 g of each organic material in 100 ml of saline for 24 h at 120 rpm in a sterile 250-ml flask; after filtration on a filter paper (porosity, 25 μm), the water phases were used to inoculate (3% v/v) all cultures. The suspensions of microorganisms were then inoculated on Mineral Minimal Medium plates which were thereupon arranged in closed 5-l glass boxes in an atmosphere with TCE as the sole carbon energy source. The plates were incubated at 28°C and no growth was observed after 21 days.

The concentration of aerobic bacteria capable of growing on high concentrations of TCE occurring in OW and VOW was counted by inoculating the above-described suspensions of microorganisms on Tryptic Soy Agar plates. Then, 200 to 1000 μl of pure TCE were added on a paper filter disk in the cover of the Petri dishes, which were then placed in closed 5-l glass boxes. The plates were incubated at 28°C. Colonies on plates inoculated with a suspension of vermicompost's microorganisms and with TCE concentration ≤ 800 l/plate appeared after 19 days. No growth was observed in plates inoculated with microorganisms from unvermicomposted olive waste.

### *2.3. Molecular identification of the TCE-resistant bacterial strain*

DNA was extracted from the vermicompost's bacterial isolate from plates with 800 μl TCE with the genomic DNA isolation kit (MBL-dominion) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined on a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Inc., DE, USA). The DNA was characterized by sequence analysis of the small ribosomal subunit (16s ribosomal DNA). PCR was carried out to amplify nearly the entire gene with the eubacterial primers 27f and 1495r (Lane, 1991). The amplified DNA was analysed on 1.2% (w/v) agarose gel and the DNA of the resulting fragment was recovered from the gel matrix using the QiaEx II Extraction kit (Qiagen; Hilden, Germany), cloned and subsequently sequenced in both directions by using an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). Sequence comparison was performed using the BLAST program and the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### *2.4. Resistance-Nodulation-Division Transporters*

The DNA extracted was amplified using the PCR primers A24f2 and A577r2 according to Meguro et al. (2005).

Assays were performed at the same time with a reference strain of *Brevibacillus brevis*, isolated from soil and not exposed to TCE stress, with a Gram-positive bacteria *Bacillus thuringiensis*, and with a *Pseudomonas putida* DOT-T1E, resistant to high soil-toluene levels (Rojas et al., 2001).

Bacteria were obtained from the Microbiology Dept., University of Valencia, Spain (*B. brevis*, *B. thuringiensis*) and from Estacion Experimental del Zaidin culture collection, CSIC, Granada, Spain (*P. putida*).

No bands were observed when the amplified product of reference *B. brevis* and *B. thuringiensis* was run on a 2 % agarose gel.

The PCR products were purified by MBL-PCR QuickClean kit (Dominion-MBL SL, Spain), cloned and analysed by direct sequencing using an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc., CA, USA). Sequence comparison was performed using the BLAST program and the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Neighbour-Joining (NJ) tree was calculated using 100 bootstrap replicates with the CONSENSE program of the PHYLIP package (Felsenstein, 1992).

### 3. Results

#### 3.1. Treatment of olive wastes with *Eisenia fetida*

Vermicomposting reduced the total organic matter, humic acids and water-soluble carbon content of 32, 67 and 89 %, respectively, because of mineralization of the organic matter. The inoculation of olive waste with *E. fetida* proved highly effective in degrading phenolic compounds, given that the initial phenolic concentration was reduced by some 93%. The sharp reduction in phenolic compounds, together with the larger amounts of nitrogen, phosphorus and other minerals of the end substrates, increased significantly the germination index of *Lepidium sativum* seeds (Table 1), indicating the loss of toxicity in the final vermicompost (Zucconi et al., 1981).

#### 3.2. Molecular identification of the TCE-resistant bacterial strain

The 16s rDNA sequence obtained from the bacteria isolated from vermicompost, able to grow on high levels of trichloroethylene (800 l/plate), was deposited in the NCBI/GenBank database under the accession number EF079071. The database search for 16s rDNA sequence using BLAST algorithm (NCBI WWW site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) unambiguously placed the bacterial isolate as a member of the genus *Brevibacillus*. The 16S rDNA sequence from this strain showed the highest similarity (more than 99%) with that of *Brevibacillus brevis*. The isolate was designated as strain BEA1.

#### 3.3. Resistance-Nodulation-Division Transporters

DNA fragments of the expected sizes (ca. 553 bp) were successfully amplified from *B. brevis* selected for TCE-tolerance (BEA1) and *P. putida* whereas no amplification was detected from *B. thuringiensis* or reference *B. brevis*.

The nucleotide sequence amplified from *B. brevis* BEA1 was deposited in the NCBI/GenBank database under the accession number EF079072. The sequence was translated to a protein sequence using The ExPASy (Expert Protein Analysis System) World Wide Web server (<http://www.expasy.org>) (Gasteiger et al., 2003) and thereafter compared using the BLAST P algorithm. A conserved protein domain ACR\_tran, ascribable to the AcrB/AcrD/AcrF family (HAE1-RND superfamily), was detected.

Although *B. brevis* is a Gram-positive bacterium, all alignments of amino acid sequences performed with the CLUSTAL W program (European Bioinformatics Institute World Wide Web server (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson et al., 1994) showed the highest homologies of the amplified fragment with those membrane proteins that contained a domain ACR\_tran involved in solvent resistance and present in Gram-negative bacteria (Table 2).

Analysis using the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank Web Site (<http://www.rcsb.org/pdb/>) allowed the division of the amino-acid sequence of the *B. brevis* BEA1 into two parts, showing a high level of similarity with two domains of a *E. coli* multidrug efflux transporter AcrB (Murakami et al., 2002): an AcrB transmembrane domain (d1iwga7) from amino acid 7 to 37 and an AcrB pore domain (d1iwga1) from amino acid 38 to 134 (Fig. 1).

A phylogenetic tree of the ACR\_tran domain was then downloaded from the Pfam collection Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) (Finn et al., 2006). The protein translated from the DNA fragment retrieved from the *B. brevis* BEA1 was included in a multiple alignment of protein sequences with the downloaded representative ACR\_tran proteins using CLUSTAL W program, and thereafter clustered in a Neighbour-Joining tree. The phylogenetic position of the amino-acid sequence from the *B. brevis* BEA1 was closely related to multidrug-resistance proteins of *E. coli* and to solvent-resistant mechanisms of *Pseudomonas* sp. (Fig. 2).

Table 1

Analytical characteristics of olive waste (OW) and vermicomposted olive waste (VOW)

	TOC	HA	WSC	C/N	N	P	K	Ca	Fe	Mn	Cu	Zn	pH	Polyphenols	Germination
	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>	index (%)
OW	483	118	74.0	38	12.8	1.47	21.0	15.3	1962	54.0	26.7	20.0	6.6	19.0	0
VOW	329	38.0	7.91	16	19.9	2.98	11.6	28.5	4325	112	45.7	136	8.4	3.20	89

TOC: Total Organic Carbon; HA: Humic acids; WSC: Water soluble carbon.

Table 2  
Most relevant BLAST hit results (scored by percentage of amino acid identity) of putative efflux pump of *Brevibacillus brevis* BEA1.

Protein	Accession number	aa	Identities (%)
Multidrug resistance protein mdtF [mdtF] [Escherichia coli]	P37637	1037	82
Multidrug resistance protein mdtF [mdtF] [Escherichia coli O6]	Q8FC18	1037	82
Multidrug resistance protein mdtF [mdtF] [Escherichia coli O157:H7]	Q8X3J5	1037	82
Hypothetical protein yhiV [yhiV] [Escherichia coli UTI89]	Q1R589	1037	82
Multidrug transporter, RpoS-dependent [mdtF] [Escherichia coli W3110]	Q2M7H6	1037	82
Putative transport system permease protein [yhiV] [Shigella dysenteriae serotype 1 (strain Sd197)]	Q32AZ2	1039	82
Putative transport system permease protein [yhiV] [Shigella sonnei (strain Ss046)]	Q3YW18	1037	82
Putative transport system permease protein [yhiV] [Shigella boydii serotype 4 (strain Sb227)]	Q31VB1	1037	82
Acriflavine resistance protein [SF3598] [Shigella flexneri]	Q83J39	694	81
RND family, multidrug transport protein [acrF] [Salmonella typhimurium]	Q8ZLN4	1037	72
RND family, multidrug transport protein, acriflavin resistance protein F [acrF] [Salmonella choleraesuis]	Q57J78	1037	72
RND family, multidrug transport protein, acriflavin resistance protein F [acrF] [Salmonella paratyphi-a]	Q5PJW8	1037	72

#### 4. Discussion

The isolated *B. brevis* BEA1 displayed genetic mechanisms of tolerance to organic solvents. Although *B. brevis* is a Gram-positive bacterium, a 489-bp nucleotide sequence was amplified with the specific primers designed by Meguro et al. (2005) to characterize HAE1 transporters in Gram-negative solvent-resistant bacteria. Nevertheless, no solvent-resistant gene was found in a reference *B. brevis* strain. The sequence obtained from the PCR amplification of the DNA extracted from the *B. brevis* BEA1, which was selected for TCE-tolerance, was more than 2-fold lower than typical HAE1 transporters of *Pseudomonas* sp. (Kieboom et al., 1998), but it means the existence of a conserved DNA fragment in the isolate which presents high homology with those of Gram-negative bacteria.

The codified protein sequence included a domain ACR\_tran, ascribable to the HAE1-RND superfamily. The ACR\_tran domain of *B. brevis* BEA1 showed the highest similarity with inner membrane proteins of *E. coli*, particularly with two conserved domains of a multidrug efflux transporter AcrB: AcrB transmembrane and AcrB pore domains. Closely related with this, for phylogeny inferred from comparison of protein sequences, the ACR\_tran domain of *B. brevis* BEA1 clustered in the multidrug and acriflavine resistance group of *E. coli* and *Pseudomonas* sp.

Most of the HAE1-RND transporters are described for Gram-negative bacteria (Ma et al., 1993). Some authors have retrieved a few genes family homologous to HAE1 transporters (or family homologous to Gram negative efflux pumps) from Gram-positive bacteria as *Bacillus subtilis* (Saier et al. 2002) or *Brevibacterium linens* (Lorca et al., 2007), although their function is still unknown. Nevertheless, the primer set designed by Meguro et al. (2005) are not able to amplify HAE1 gene

fragments from any Gram-positive bacteria, including *B. subtilis* (Meguro et al., 2005). In disagreement with this scenario, a gen encoding a HAE1 protein was successfully retrieved from the *B. brevis* BEA1.

Since no mechanisms of resistance to organic solvents have been described to date for Gram-positive bacteria, the presence in the genome of *B. brevis* BEA1 of HAE1 gene fragments could therefore be related to processes of horizontal gene transfer (HGT) during the vermicomposting process. HGT is usually associated to specific environmental conditions, - altered growth conditions, population density and nutrient status (limiting or excessive)-, which could provoke a “competence state” able to induce a transfer of genes (Lorenz and Wackernagel, 1994; Thomas and Nielsen, 2005), even between Gram-positive and Gram-negative bacteria (Courvalin, 1994; Pál et al., 2005). The influence of earthworm activity on gene transfer has been studied and then concluded that earthworm activities may influence the transfer rate of conjugative plasmids from

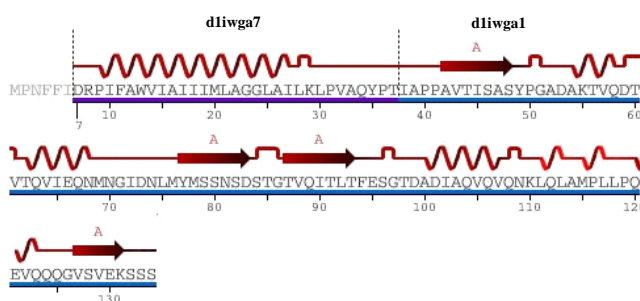


Fig. 1. Alignment domains of the multidrug efflux transporter AcrB. (From RCSB Protein Data Bank). Key: = extended strand, = turn, = alpha helix, = 310 helix. dliwga7: AcrB transmembrane domain; dliwga1: AcrB pore domain. From the RCSB Protein Data Bank Web Site (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

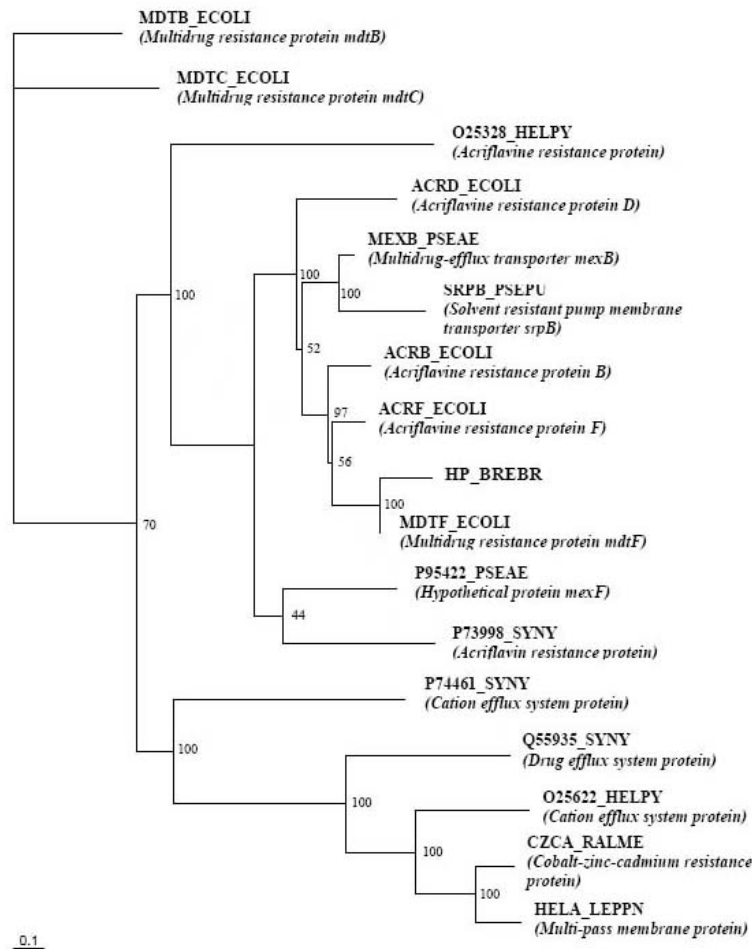


Fig. 2. Neighbor-joining tree showing phylogenetic positions of ACR\_tran domain including putative efflux pump (EP) of *Brevibacillus brevis* (BREBR) BEA1. Numbers at the branch nodes indicate bootstrap values (100 replicates). ECOLI: *Escherichia coli*; HELPY: *Helicobacter pylori*; LEPPN: *Legionella pneumophila*; PSEAE: *Pseudomonas aeruginosa*; PSEPU: *Pseudomonas putida*; RALME: *Ralstonia metallidurans*; SYNY: *Synechocystis* sp.

*E. coli* or *Pseudomonas fluorescens* to autochthonous soil microorganisms (Daane et al., 1996; Thimm et al., 2001). These authors defined the earthworm gut as a hot spot for HGT, since the mixing of cells and mobile genetic elements is enhanced, cells are activated, and cell-to-cell contacts are stimulated. Intense aerobic/anaerobic environments inside the earthworm (Karsten and Drake, 1995) and evidence of changes in microbial metabolic activities, plus the capacity for survival during gut transit in worms (Aira et al., 2006) constitute additional evidence that could support the hypothesis of a possible HGT process inside the worm *Eisenia fetida* during the vermicomposting of olive wastes, even when the population density of earthworms is much higher than in soil.

However, although we might presume that HGT processes have taken place on the earthworm gut during vermicomposting, we cannot disregard that *Brevibacillus* is a genus of Gram-positive bacteria, so suffers from the structure for a three components system. Therefore, how the acquired nucleotide sequence provides TCE-tolerance to the bacterium remains uncharted.

As it is well known, Gram-negative bacteria as *E. coli*

transport noxious compounds from the cell into the external medium by means of a three components system, where AcrB proteins located in the cytoplasmic membrane cooperates with a AcrA membrane-fusion protein and an outer membrane factor (TolC) (Nikaido, 2000; Nikaido and Zgurskaya, 2001). This last is the responsible to throw the drugs out from the periplasm to the external medium (Saier and Paulsen, 2001), and the assigned function of the AcrA protein is to connect the other ones components. Gram-positive bacteria lack outer membrane and therefore the outer membrane factor. Nevertheless, membrane-fusion proteins associated to multidrug transporters (ABC and RND transporters) has been described in Gram-positive bacteria, and an essential role in a two component efflux system has been assigned to this proteins (Harley et al. 2000; Zgurskaya et al. 2008).

In this work, only a single component has been detected. The protein isolated from *B. brevis* BEA1 could carry out the TCE extrusion alone or cooperating with a membrane-fusion protein. If the putative efflux-pump protein is part of a two-component system or not is a question that must be resolved in futures studies.

**5. Conclusions**

It was known that vermicompost contains billions of diverse microorganisms, but no bacteria able to grow in high levels of trichloroethylene had been described until now. In this work, a cultivable, Gram-positive, solvent-resistant bacterium was isolated from vermicomposted olive wastes and identified by 16S rDNA sequencing as *Brevibacillus brevis*.

The genome of the isolate contained a nucleotide sequence encoding a protein conserved domain with high homology with hydrophobic/amphiphilic efflux pumps largely restricted to Gram-negative bacteria (HAE1 family). Nevertheless, no mechanisms of resistance to organic solvents were found in a reference strain of *B. brevis*. The isolate was designated as strain BEA1.

Since no cultivable solvent-tolerant bacteria were detected in the unvermicomposted olive waste, a transfer of solvent-resistance genes from Gram-negative bacteria during the vermicomposting process could explain the presence of HAE1 transporters in *B. brevis* BEA1. Under TCE stress conditions, the acquired nucleotide sequence could be translated into proteins, and tolerance to solvents is conferred to the bacterium.

**Acknowledgements**

This work has been financed by the Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia (CICYT) through project REN2003-05359. B. Moreno thanks to Education and Science Ministry for funding his research. We would also like to thank David Nesbitt for the valuable English editing on the latest version of the manuscript.

**References**

Aira M, Monroy F, Domínguez J. 2006. Changes in microbial biomass and microbial activity of pig slurry after the transit through the gut of the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867). *Biol Fertil Soils* 42: 371–376.

Benitez E, Melgar R, Nogales R. 2004. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biol Biochem* 36: 1615–1623.

Benitez E, Sainz H, Melgar R, Nogales R. 2002. Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: a pilot scale study. *Waste Managem Res* 20: 134–142.

Berselli S, Milone G, Canepa P, Di Gioia D, Fava F. 2004. Effects of cyclodextrins, humic substances and rhamnolipids on the washing of a historically contaminated soil and on the aerobic bioremediation of the resulting effluents. *Biotechnol Bioeng* 88: 111–120.

Courvalin P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38: 1447–1451.

Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP, Hsu FC. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron* 56: 55–114.

Daane LL, Molina JAE, Berry EC, Sadowsky MJ. 1996. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 515–521.

Ensign SA, Hyman MR, Arp DJ. 1992. Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylene-grown *Xanthobacter* strain. *Appl Environ Microbiol* 58: 3038–3046.

Ensley BD. 1991. Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism. *Annu Rev Microbiol* 45: 283–299.

Felsenstein J. 1992. PHYLIP (phylogenetic inference package), version 3.5c ed. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Filip Z, Demmerova K. 2006. Microbial resistance to chemical contaminants - an essential precondition of natural attenuation in groundwater aquifer. In: *Management of Intentional and Accidental Water Pollution*, Springer Netherlands, pp 113–127.

Finn RD, Mistry J, Schuster-Böckler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer E, Bateman A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34: 247–251.

Fuller ME, Scow KM, Lau S, Ferris H. 1997. Trichloroethylene (TCE) and toluene effects on the structure and function of the soil community. *Soil Biol Biochem* 29: 75–89.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31: 3784–3788.

Harley KT, Djordjevic GM, Tseng TT, Saier MH. 2000. Membrane-fusion protein homologues in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 36: 516–517.

Kao CM, Chen SC, Su MC. 2001. Laboratory column studies for evaluating a barrier system for providing oxygen and substrate for TCE biodegradation. *Chemosphere* 44: 925–34.

Kao CM, Chen KF, Chen YL, Chen TY, Huang WY. 2004. Biobarrier system for remediation of TCE-contaminated aquifers. *Bull Environ Contam Toxicol* 72: 87–93.

Karsten GR, Drake HL. 1995. Comparative Assessment of the Aerobic and Anaerobic Microfloras of Earthworm Guts and Forest Soils. *Appl Environ Microbiol* 61: 1039–1044.

Kieboom J, Dennis JJ, de Bont JAM, Zylstra GJ. 1998. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J Biol Chem* 273: 85–91.

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackenbrant E, Goodfellow M (Eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* pp 115–147. John Wiley & Sons, New York, NY.

Lorenz MG, Wackernagel W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* 58: 563–602.

M.A.P.A. 1986. *Metodos oficiales de analisis*. Tomo III. Plantas, productos organicos, fertilizantes, suelos, agua, fertilizantes organicos Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion. Madrid.

Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 6299–6313.

Meguro N, Kodama Y, Gallegos MT, Watanabe K. 2005. Molecular characterization of resistance-nodulation-division transporters from solvent- and drug-resistant bacteria in petroleum-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 71: 580–586.

- Miller RE, Guengerich FP. 1983. Metabolism of trichloroethylene in isolated hepatocytes, microsomes, and reconstituted enzyme systems containing cytochrome P-450. *Cancer Res* 43: 1145-1152.
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419: 587-593.
- Nelson MJK, Montgomery SO, Pritchard PH. 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol* 54: 604-606.
- Nikaido H. 2000. How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells? *Trends Microbiol* 8: 481-483.
- Nikaido H, Zgurskaya I. 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 215-218.
- Pál C, Papp B, Lercher MJ. 2005. Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nature Genetics* 37: 1372-1375.
- Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, Teran W, Segura A. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56: 743-768.
- Rojas A, Duque E, Mosqueda G, Goleen G, Hurtado A, Ramos JL, Segura A. 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 183: 3967-3973.
- Romero E, Benitez E, Nogales R. 2005. Suitability of wastes from olive-oil industry for initial reclamation of a Pb/Zn mine tailing. *Water Air Soil Poll* 165: 153-165.
- Saavedra M, Benitez E, Cifuentes C, Nogales R. 2006. Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* 17: 93-102.
- Saier MH Jr, Goldman SR, Maile RR, Moreno MS, Weyler W, Yang N, Paulsen IT. 2002. Transport capabilities encoded within the *Bacillus subtilis* genome. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 37-67.
- Saier MH Jr, Paulsen IT. 2001. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 12: 205-213.
- Sims JR, Haby VA. 1971. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Sci* 112: 137-141.
- Thimm T, Hoffmann A, Fritz I, Tebbe CC. 2001. Contribution of the Earthworm *Lumbricus rubellus* (Annelida, Oligochaeta) to the Establishment of Plasmids in Soil Bacterial Communities. *Microb Ecol* 41: 341-351.
- Thomas CM, Nielsen KM. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3: 711-721.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 11: 4673-4680.
- Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:107-125.
- Zgurskaya HI, Yamada Y, Tikhonova EB, Ge Q, Krishnamoorthy G. 2008. Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochim Biophys Acta* DOI : 10.1016/j.bbapap.2008.10.010
- Zucconi F, Peta A, Forte M, De Bertoldi M. 1981. Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle* 22: 54-57.





## **Capítulo 3**

---

**Restoring biochemical activity and bacterial diversity  
in a trichloroethylene-contaminated soil: the  
reclamation effect of vermicomposted olive wastes**





## Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes

### Resumen

**Introducción y objetivos.** En este estudio, el potencial para usar el alperujo de oliva previamente vermicompostado como enmienda orgánica para la recuperación bioquímica y biológica de un suelo contaminado con TCE.

**Material y métodos.** Se bombeó agua contaminada con TCE sobre las columnas de suelo con una capa de vermicompost a 10 cm de profundidad (sistema biobarrera). Los impactos del TCE sobre la comunidad microbiana fueron evaluados a través de la determinación de: (1) la actividad microbiana total (estimada como actividad deshidrogenasa) y actividades enzimáticas relacionadas con los principales ciclos de nutrientes (actividades  $\beta$ -glucosidasa, o-difenoloxidasa, fosfatasa, ureasa y arilsulfatasa). Además, se llevó a cabo el isoelectroenfoque de los complejos húmico- $\beta$ -glucosidasa para estudiar la materia húmica enzimáticamente activa del suelo. (2) la diversidad bacteriana del suelo (estudiada por DGGE) y los mecanismos moleculares para la resistencia a solventes orgánicos (detectados por SSCP) presentes en los suelos contaminados

**Resultados.** El vermicompost reducía, con respecto al suelo sin enmendar, sobre el 30% del TCE lixiviado durante el primer mes del experimento. El TCE tenía un marcado efecto negativo sobre las actividades deshidrogenasa,  $\beta$ -glucosidasa, ureasa, fosfatasa y arilsulfatasa y el vermicompost tendía a amortiguar este efecto tóxico. El vermicompost también presentaba complejos húmico- $\beta$ -glucosidasa estables que incrementaban la actividad extracelular relacionada con el ciclo del C en los suelos contaminados. La técnica del isoelectroenfoque mostraba una mayor materia húmica bioquímicamente activa en la capa de suelo situada bajo el vermicompost. El comportamiento de los tres principales grupos de bacterias aislados del DGGE fue muy diferente. Así, las bandas que correspondían a Actinobacteria desaparecían, mientras que las afiliadas a Proteobacteria permanecían presentes después de la contaminación. Las bandas pertenecientes a Bacteroidetes aparecían sólo en las columnas con suelo contaminado. Por otro lado, el TCE tendía a reducir o eliminar todos los clones de proteínas RND detectados en el suelo no contaminado, mientras que nuevas bombas de expulsión aparecían en las columnas biobarrera.

**Discusión.** Aunque las enzimas incorporadas en las sustancias húmicas del vermicompost de alperujo son muy estables, el TCE inhibía los niveles originales de actividad  $\beta$ -glucosidasa extracelular en los suelos enmendados. Esta inhibición fue menos severa en el sistema biobarrera, pero en cualquier caso, no se encontró relación alguna entre los niveles de TCE en el suelo y la actividad  $\beta$ -glucosidasa extracelular, o entre esta última y la cantidad de carbono húmico en suelos. El isoelectroenfoque mostró que los suelos contaminados presentaban menor actividad enzimática mientras que los suelos contaminados y enmendados presentaban mayor cantidad de carbono húmico estable y un espectro heterogéneo: bandas muy diferentes con elevada actividad enzimática. El TCE mantenía o incrementaba el número de clones de proteínas RND, excepto para el suelo contaminado situado bajo la capa de vermicompost. No obstante, considerando el tipo de bombas de expulsión detectadas en los suelos, el principal efecto del TCE fue modificar la estructura de la comunidad bacteriana en el suelo contaminado. El efecto del vermicompost de alperujo fue inducir estos mecanismos de resistencia en la comunidad bacteriana autóctona de los suelos o introducir nuevas especies capaces de crecer en un ambiente contaminado con TCE

*Este artículo ha sido publicado en la revista **Environmental Science and Pollution Research** (2008) doi. 10.1007/s11356-008-0035-y*



## Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes

Beatriz Moreno • Astrid Vivas • Rogelio Nogales •  
Cristina Macci • Grazia Masciandaro • Emilio Benitez

Received: 30 March 2008 / Accepted: 7 August 2008

### Abstract

**Background, aim, and scope** In this work, the potential for using olive-mill solid waste as an organic amendment for biochemical and biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil, which has previously been stabilized through vermicomposting processes, has been explored.

**Materials and methods** Trichloroethylene-contaminated water was pumped into soil columns with a layer of vermicompost at 10-cm depth (biobarrier system). The impacts of the trichloroethylene on the microbial community were evaluated by determining: (1) the overall microbial activity (estimated as dehydrogenase activity) and enzyme activities related to the main nutrient cycles ( $\beta$ -glucosidase, o-diphenoloxidase, phosphatase, urease, and arylsulphatase activities). In addition, isoelectric focusing of the soil extracellular humic- $\beta$ -glucosidase complexes was performed to study the enzymatically active humic matter related to the soil carbon cycle. (2) The soil bacterial diversity and the molecular mechanisms for the bacterial resistance to organic solvents were also determined. For this, polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to detect changes in bacterial community structure and PCR-single-strand conformational polymorphism (SSCP) was developed and optimised for detection and discrimination of the resistance-nodulation/division (RND) genes amplified from the contaminated soils.

**Results** Vermicompost reduced, with respect to the unamended soil, about 30% of the trichloroethylene leaching during the first month of the experiment. Trichloroethylene had a marked negative effect on soil dehydrogenase,  $\beta$ -glucosidase, urease, phosphatase, and arylsulphatase activities. Nevertheless, the vermicompost tended to avoid this toxic effect. Vermicompost also displays stable humic- $\beta$ -glucosidase complexes that increased the extracellular activity related to C-cycle in the contaminated soils. The isoelectric focusing technique showed a more biochemically active humic matter in the soil sampled under the vermicompost. The behaviour of the three main phyla of bacteria isolated from the DGGE bands was quite different. Bands corresponding to Actinobacteria disappeared, whereas those affiliated with Proteobacteria remained after the trichloroethylene contamination. The disappeared Actinobacteria became visible in the soil amended with the vermicompost. Bands corresponding to Bacteroidetes appeared only in columns of contaminated soils. In this study, six types of RND proteins were detected by PCR-SSCP in the natural soil, three in the trichloroethylene-contaminated soil and 7/5 in trichloroethylene-contaminated soil above/below the vermicompost in the biobarrier columns. Trichloroethylene tended to reduce or eliminate all the clones detected in the uncontaminated soil, whereas new efflux pumps appeared in the biobarrier columns.

**Discussion** Although enzymes incorporated into the humic substances of vermicomposted olive wastes are quite stable, trichloroethylene also inhibited the background levels of the soil extracellular  $\beta$ -glucosidase activity in the amended soils. The decrease was less severe in the biobarrier system, but in any case, no relation was found between the levels of trichloroethylene in soil and extracellular  $\beta$ -glucosidase activity, or between the latter and the quantity of humic carbon in soils.

---

Responsible editor: Henner Hollert

---

B. Moreno : A. Vivas : R. Nogales : E. Benitez (\*)  
Department of Environmental Protection,  
Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC,  
Profesor Albareda 1,  
18008 Granada, Spain  
e-mail: [emilio.benitez@eez.csic.es](mailto:emilio.benitez@eez.csic.es)

C. Macci : G. Masciandaro  
Institute of Ecosystem Study (ISE), CNR,  
Via Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italy

The isoelectric focusing technique was carried out in the humic fraction to determine whether the loss of activity occurred in overall extracellular  $\beta$ -glucosidase or in that linked to stable humic substances (humic-enzyme complexes). The contaminated soils showed the lower enzyme activities whereas contaminated and amended soils presented greater quantity of focalised (and therefore stable) humic carbon and spectra heterogeneity: very different bands with higher enzyme activities. No clear relationship between trichloroethylene concentration in soil and diversity of the bacterial population was noted. Similar patterns could be found when the community structures of bacteria and microbial activity were considered. Since the use of the dehydrogenase assay has been recognized as a useful indicator of the overall measure of the intensity of microbial metabolism, these results could be attributed to PCR-DGGE methodology, since the method reveals the presence of dominant populations regardless of their metabolic state. Trichloroethylene maintained or even increased the number of clones with the DNA encoding for RND proteins, except for the contaminated soil located above the vermicompost. However, the main effect of trichloroethylene was to modify the structure of the community in contaminated soils, considering the type of efflux pumps encoded by the DNA extracted from soil bacteria.

**Conclusions.** Trichloroethylene inhibited specific functions in soil and had clear influence on the structure of the autochthonous bacterial community. The organic matter released by the vermicomposted olive waste tended to avoid the toxic effect of the contaminant.

Trichloroethylene also inhibited the background levels of the soil extracellular  $\beta$ -glucosidase activity, even when vermicompost was present. In this case, the effect of the vermicompost was to provide and/or to stimulate the humic- $\beta$ -glucosidase complexes located in the soil humic fraction  $>10^4$ , increasing the resistance of the enzyme to the inhibition. The bacterial community from the soil presented significantly different mechanisms to resistance to solvents (RND proteins) under trichloroethylene conditions. The effect of the vermicompost was to induce these mechanisms in the autochthonous bacterial community and/or incorporated new bacterial species, able to grow in a trichloroethylene-contaminated ambient. Coupled biochemical and molecular methodologies are therefore helpful approaches for assessing the effect of an organic amendment on the biochemical and biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil.

**Recommendations and Perspectives.** Since the main biochemical and biological effects of the organic amendment on the contaminated soil seem to be the incorporation of biochemically active humic matter, as well as new bacterial species able to grow in a trichloroethylene-contaminated ambient, isoelectric focusing and PCR-SSCP methodologies should be considered as parts of an integrate approach to determine the success of a restoration scheme.

**Keywords:** Bacterial diversity • Bioremediation • RND transporters • Soil enzymes • Trichloroethylene • Vermicomposting

### **1 Background, aim and scope**

Trichloroethylene (TCE) and its metabolic intermediates belong to the most widespread of soil pollutants. This class of compounds is resistant to biodegradation in aerobic subsurface environments, which contributes to their persistence in polluted groundwaters. TCE-biodegradation under aerobic conditions can only be based on cometabolism, i.e. in the presence of another organic compound representing a primary carbon and energy source for the soil microorganisms. The oxygenase enzymes involved in the breakdown of TCE, as well as substrates for co-metabolism, are widely described (Ensley, 1991, Ensing et al. 1992, Takami et al. 1999).

Enhanced bioremediation is the general term used to describe the addition of microorganisms or nutrients to the subsurface environment to accelerate the natural biodegradation process. To be effective in transformation or degradation of chemicals, the indigenous microorganisms should be capable of resisting to chemical pollutants, above all (Filip and Demnerova, 2006). The mechanisms for the resistance of bacteria to organic solvents have been widely studied and then related to the presence in the microorganisms of resistance-nodulation-division (RND) efflux pumps (Ramos et al. 2002).

In the search of new strategies for soil reclamation, the potential for using olive-mill solid waste, previously stabilized through vermicomposting processes, as an organic amendment for enhanced bioremediation has been explored. It has been concluded that vermicompost from olive-mill wastes may be a suitable and economical method for reclaiming polluted tailings from Pb/Zn mines in the Mediterranean region as well as degraded soils (Benitez et al. 2004, Romero et al. 2005). Vermicompost from olive-mill waste contains high levels of available carbon and nutrients for enhancing co-metabolism, as well as enzymes that catalyse the hydrolysis of C-molecules and the degradation of phenols (Benitez et al. 2005, Saavedra et al. 2006). Since these enzymes can potentially act in TCE degradation (Nelson et al. 1986), this by-product could also be promising for the bioremediation of solvent-contaminated soils. In addition, a certain proportion of these enzymes are stabilized through incorporation into the humic material (Benitez et al. 2005) thereby enabling enzyme activity to be independent of the extreme environmental conditions that often inhibit microbial activity in contaminated soils (Burns, 1986). It is well known that extracellular enzymes as humic-bound enzymes have a crucial role in the detoxification of xenobiotics in soil (Kandeler and Dick, 2006).

Different approaches have been considered to determine the success of a restoration scheme (Ruiz-Jaen and Aide, 2005). Enzymes activities have potential as an integrative index of the soil biological status (Kandeler and Dick, 2006) and enzymes involved in the C-cycle as  $\beta$ -glucosidase has been recommended as a soil quality indicator (Ndiaye et al. 2000). Measurement of the microbial community has been also proposed as “an indicator of the re-establishment of connections between the biota and restoration of function in degraded systems” (Harris, 2003). In this study, the impacts of the TCE on the microbial community, as well as the remediation effect that the vermicompost could exert were evaluated in a laboratory-scale column experiment by determining:

1. The overall microbial activity (estimated as dehydrogenase activity) and enzyme activities related to the main nutrient cycles ( $\beta$ -glucosidase, *o*-diphenoloxidase, phosphatase, urease, and arylsulphatase activities). In addition, isoelectric focusing of the soil extracellular humic- $\beta$ -glucosidase complexes was performed to study the enzymatically active humic matter related to the soil carbon cycle.
2. The soil bacterial diversity and the molecular mechanisms for the bacteria resistance to organic solvents. For this, PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) was used to detect changes in bacterial community structure and PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) was developed and optimised for detection and discrimination of the RND genes amplified from the contaminated soils.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Soil and vermicomposted olive waste

The soil used in this study was a calcareous loam soil (Typic Xerorthent, Soil Survey Staff, 1999) located at Granada, Spain. The mature vermicompost was prepared from a mixture of olive-mill wastes (Romeroliva, Deifontes, Granada, Spain) with manure (4:1 wet weight) inoculated with earthworms of the species *Eisenia fetida* (total vermicomposting time being nine months) according to methodology of Benitez et al. (2002). Total and water soluble organic carbon, N, P, K, humic acids, and pH were determined according to M.A.P.A. (1986). The extractable phenolic compounds were determined as described by Saavedra et al. (2006). Relevant characteristics of the soil and vermicompost from olive-mill waste are given in Table 1.

### 2.2 Column experiment

Undisturbed soil samples were taken with a stainless steel tube and then packed in glass columns. The

**Table 1** Characteristics of soil (S) and vermicomposted olive-mill waste (VOW)

	S	VOW
TOC (g kg <sup>-1</sup> )	16	329
HA (g kg <sup>-1</sup> )	---	38
WSC (g kg <sup>-1</sup> )	0.31	7.9
C/N	11	16
N (g kg <sup>-1</sup> )	1.4	20
P (g kg <sup>-1</sup> )	---	2.9
K (g kg <sup>-1</sup> )	---	12
pH	7.5	8.4
Polyphenols (g kg <sup>-1</sup> )	0	3.2
Dehydrogenase (g INTF g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	5.1	248
$\beta$ -glucosidase (g PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	490	113000
Phosphatase (g PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	439	95000
Urease (g NH <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	4.0	393

TOC Total Organic Carbon; HA Humic acids; WSC Water soluble carbon; (---) not determined

columns, 60 cm long with an inside diameter of 10 cm, were each filled from bottom to top with 400 g of coarse washed sand, undisturbed soil (20 cm), a layer of vermicomposted olive wastes (two cm), undisturbed soil (10 cm), and 400 g of coarse washed sand (T+V treatment). The columns were placed in a support frame, and vertically aligned using a levelling device. Teflon® collection funnels were attached to the base of each column and sealed in place. At the beginning of the experiment, all columns were pre-irrigated with deionized water to reach 60% field capacity. Thereafter, 500 ml of TCE-contaminated water (0.3 mg TCE ml<sup>-1</sup>) was pumped at a flow rate of 0.13 ml s<sup>-1</sup> into the soil columns. Effluents from each single column were collected in glass bottles 1, 30, and 90 days after irrigation.

Two control columns system were used in the experimental design: columns without vermicompost irrigated with the simulated TCE-contaminated water (T), and columns without vermicompost irrigated with deionized water (C). Three columns per treatment were set up in a randomized block design in a controlled greenhouse at 25°C.

After three months, from depths of 0-10, and 12-32 cm, two samples were collected from each single column and TCE concentration determined. The samples were stored in glass vials at 4°C until biochemical and biological analyses were performed and noted as T+V<sup>up</sup> (above the vermicompost) and T+V<sub>down</sub> (below the vermicompost) for T+V columns. After the analyses of biochemical and biological parameters, no significant differences between the two depths collected from each single column were detected for T columns, and thus were considered to be single samples throughout this study. The same was done for C columns.

### 2.3 TCE determination

The TCE in the effluents resulting from the leaching was extracted through two successive batch extractions performed with a hexane:acetone mixture (9:1) following Fava and Di Gioia (2001).

To determine losses of TCE due to evaporation, 50 g of vermicompost and 70 g of soil were sterilized by tyndallization (100°C, 1 hour, 3 days), irrigated with deionized water to reach 60% field capacity, contaminated with 7 g of TCE and incubated during one month in sterile and hermetic glasses opened twice a week under sterile conditions.

TCE were removed from soil samples by means of a microwave-assisted extraction with a MarsX (CEM, Matthews, NC, USA) system, operating at 200 psi and 115 °C by using a mixture of hexane:acetone (1:1) for 10 minutes. Afterwards, closed vials were kept on ice for 30 minutes and then opened. The extracts were then filtered through Whatman 0.45 µm PTFE Membrane Polypropylene Housing. The elute was added to anhydrous sodium sulphate, vortexed for 60 s and analysed by gas chromatography/electron capture detector under the following conditions: capillary column: HP-5 (30 m by 0.25 mm); initial temperature 35°C; isothermal for four minutes; temperature rate 5°C/minute; final temperature 40°C; isothermal for seven minutes; injector (splitless mode) 240°C; ECD 320°C; carrier gas-flow rate (nitrogen) 1 ml/s; sample volume 1 µl.

#### 2.4 Enzymes activities

Dehydrogenase activity was determined using 1g of soil by the method of von Mersi and Schinner (1991) modified by Garcia et al. (1997). The *o*-diphenoloxidase activity was determined according to Perucci et al. (2000)

The overall hydrolytic enzymes activities (urease, phosphatase, β-glucosidase and arylsulphatase) were determined using 1g of soil according to Nannipieri et al. (1980) and Tabatabai and Bremner (1969, 1970).

For the analysis of humic bound β-glucosidase activities, humic carbon was extracted with Na<sub>2</sub>P<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (0.1M, pH 7.1) in a 1:10 solid-liquid ratio by mechanical shaking at 37°C for 24h. The suspension was then centrifuged at 8000g and filtered through a 0.22 µm Millipore membrane. The extract was dialysed against distilled water and then concentrated 10 times at 35°C using a Savant Speed Vac concentrator. (GMI. Inc., Minnesota, USA). The β-glucosidase activity was determined using 0.5ml of dialysed concentrated pyrophosphate extract according to Nannipieri et al. (1980). The C contents of humic carbon were determined by acid digestion with 1N potassium dichromate and sulphuric acid cc. at 160°C for 30 minutes. A spectrophotometric method was used to quantify the Cr<sup>3+</sup> produced by the reduction of Cr<sup>6+</sup> (λ = 590nm) (Sims and Haby, 1971).

#### 2.5 Isoelectrofocusing

Dialysed humic carbon was concentrated 20 times by a molecular sieving Amicon PM-10 diafmembrane (molecular cut-off 10,000) under a N atmosphere (Ceccanti et al.1989). The higher fraction (> 10.000 daltons) was used for testing humic-carbon and Isoelectrofocusing (IEF).

IEF was carried in cylindrical tubes (0.5 x 8 cm) containing polyacrylamide gel (5% w/v), carrier ampholines at pH 3.5-5 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, U.S.A.) at a final concentration of 2% (Ceccanti et al. 1986, 1989), TEMED (0.066%) (N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane) and ammoniumperoxy-disulfat (0.06%).

To 100 µl of concentrated humic carbon has been added a quantity of glycerine to reach the 4.4% vol/vol in the sample and it was applied at the top of gel (cathode). A prerun of one hour and a run of two hours were carried out at the current intensity of 1.5 mA for each tube and voltage of 100-800 V.

The electrophoretic bands were scanned by a Bio-Rad GS 800 densitometer with an optical density of 650nm. The pH of the gel was measured at 0.5 cm intervals by a Titroprocessor 672 Methron (Switzerland), with a combined glass electrode Methron AG CH-9100 Herisau.

To analyse β-glucosidase activity of the humic bands obtained by IEF, the gel was gently removed from the inside of the glass tubes and the bands were cut. The humic bands were washing for 1 hour with two ml 0.1 M phosphate buffer, pH 6.4, at 37°C in order to remove the carrier ampholytes, salts and other impurities. After the wash, the buffer was decanted and replaced by two ml of fresh buffer; 0.5 ml 0.05 M 4-nitro-phenyl-β-D-glucanopyranoside were added and the activity determined according to Nannipieri et al. (1980).

#### 2.6 Soil-DNA extraction and PCR-DGGE analysis

The total DNA was extracted from subsamples of 250 mg of soil by the bead-beating method, following the manufacturer's o instructions MoBio UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA) with a few modifications, including the repetition of the second step (Inhibitor Removal Solution) to remove trace concentrations of PCR inhibitors. The DNA samples were checked for concentration and quality using the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware; USA).

PCR was performed with the 16S rDNA universal bacterial denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) primers (TIB®MOLBIOL, Berlin, Germany) P1, P2, and P3 to amplify the V3 hypervariable region of 16S rDNA genes (Muyzer et al. 1993).

Two successive amplifications were carried out following Muyzer et al. (1993) with the following modifications: a hot start of five minutes at 94°C; 19 cycles consisting of 94°C for 15 s, 65-55°C for 15 s, decreasing the temperature by 0.5°C every cycle, 72°C for 30 s; 14 cycles consisting of 94°C for 15 s, 55°C for

15 s, 72°C for 30 s; a final step of 10 minutes at 72°C. The total reaction mixture of the first PCR consisted of 25 µl with the following ingredients: 1 µ volume (approx 10ng) of extracted DNA, 1 µM primer P1, 1 µM primer P2, 10 µl Eppendorf® Master Mix (2.5X) and sterile Milli-Q water to a final volume. The second amplification was performed by using 1 µl of the products of the first reaction as template. In this, primers P2 and P3 were used under the same conditions described above.

DGGE analyses were conducted using 20 µl of this latter PCR product loaded into a 40 to 65% urea-formamide-polyacrylamide gel. An INGENYphorU System (Ingeny International BV, The Netherlands) was run at 75 V for 17 hours at 58°C to separate the fragments. Gels were silver stained with the Bio-Rad Silver Stain according to the standard DNA-staining protocol and photographed under UV light (λ = 254 nm) using an UVitec Gel Documentation system (UVitec Limited, Cambridge, UK).

### 2.7 Isolation, PCR amplification, and sequencing of DNA fragment from DGGE

DNA fragments from DGGE were isolated as described by Schwieger and Tebbe (1998). PCR was conducted as described above using primers P2 and P3. PCR fragments were purified by MBL-Agarosa Quickclean (Dominion-MBL SL, Spain), cloned and subsequently sequenced in both directions by using an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). Sequence identifications were performed using the "Sequence Match" facility of the Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Possible chimeric sequences were checked using the CHECK\_CHIMERA program of the RDP database (Cole et al. 2003), and suspect sequences were removed from analyses. Sequences were filed under GenBank accession numbers EU275372-78.

### 2.8 RND transporters

For analysing resistance-nodulation-division transporters from solvent-resistant bacteria in soil, the soil DNA was amplified using the primers A24f2 and A577r2 and the PCR conditions described by Meguro et al. (2005). The PCR products were purified by 1.5 % (w/v) agarose gel electrophoresis. The targeted bands were excised and extracted using a MBL-Agarosa Quickclean (Dominion-MBL SL, Spain) and eluted with 20 µl 1x Tris-EDTA. The cloning experiments were carried out according to Schwieger and Tebbe (1998). Clones containing appropriate sizes (ca. 766 bp) were selected by electrophoretic analysis and the corresponding DNA subjected to nested PCR, using primers A24f2 and A577r2 (Meguro et al. 2005). The PCR products were then purified by MBL-PCR QuickClean kit (Dominion-MBL SL, Spain) and 4 µl of the purified PCR product were mixed with 6 µl denaturing loading buffer, denatured at 95°C for 120 s

and immediately chilled on wet ice for 5 minutes (Schwieger and Tebbe, 1998). SSCP screening of the PCR products was then conducted at a constant power of three W for 18 hours at 22°C in an INGENYphorU System (Ingeny International BV, The Netherlands). The gel, 21 cm in length and 0.2 mm thick, were cast horizontally and polymerised by 0.04% ammonium persulphate and 0.08% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine. The gel was silver stained as in Bassam et al. (1991) and thereafter dried directly on filter paper at room temperature. Clones with different banding profiles were selected by eye and the corresponding purified DNA analysed by direct sequencing using an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). These sequences data have submitted to the GenBank database under the accession numbers EU053435-45. The sequences were translated to a protein sequence using The ExpASy (Expert Protein Analysis System) World Wide Web server (<http://www.expasy.org>) (Gasteiger et al. 2003) and thereafter compared using the BLAST P algorithm GeneBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 2.9 Data analysis

All chemical and biochemical results are the means of three replicates (one per column). Data were subjected to analysis of variance using the program STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) and Duncan's Multiple Range Test was used to separate the means with an overall significance level of 0.05.

Comparison of DGGE band patterns in different lanes was done with the UVImap Analysis software (UVitec Limited, Cambridge, UK). The lanes were normalized to contain the same amount of total signal after background subtraction and the gel images were straightened and aligned to give a densitometric curve. Band positions were converted to Rf values between 0 and 1 and profile similarity was calculated by determining Nei and Li's similarity coefficients (Nei and Li, 1979) for the total number of lane patterns from the DGGE gel. The similarity coefficients calculated were then used to construct a dendrogram using the unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA).

The structural diversity of the microbial community was examined by the Shannon index of general diversity  $H'$  (Shannon and Weaver, 1963). For this analysis, each band was presumed to represent the ability of that bacterial species to be amplified (Ibekwe and Grieve, 2004). The intensity of the bands was reflected as peak heights in the densitometric curve. The Shannon index was calculated from the following equation

$$H' = - \sum (P_i \log P_i)$$

Where,  $P_i$  is  $n_i/N$ ;  $n_i$  is the height of peak and  $N$  is the sum of all peak heights in the curve.



### 3 Results

TCE evaporation in soil was about 2-times greater than in vermicompost (40 and 20%, respectively). The column experiment was operated for three months and effluents were collected at 1, 30, and 90 days after the irrigation with the simulated TCE-contaminated water. The TCE contained in the earlier effluent samples was about 80 g m<sup>-1</sup> in the control system (T) and 65 g m<sup>-1</sup> in the biobarrier system (T+V). The TCE determined in the effluent samples collected after 30 days was 4.19 and 0.08 g ml<sup>-1</sup> in T and T+V columns, respectively. No TCE was detected after 90 days (Table 2). After 90 days, each single column was divided for analyses into two soil samples of 10 and 20 cm in length (approx. 1000g/10cm of soil) and the vermicompost was also taken out of the biobarrier system. The TCE concentration of the soil samples in the two systems of columns is reflected also in Table 2. No TCE was detected in the layer of vermicompost.

TCE had a marked negative effect on both soil dehydrogenase and hydrolytic enzyme activities (Fig. 1). The vermicompost released organic materials which tended to avoid the toxic effect on microbial activity and on soil functions due to trichloroethylene, particularly in the soil below it (T+V<sub>down</sub>). The organic amendment recuperated the phosphatase and arylsulphatase activities in this soil layer, which exhibited even higher dehydrogenase activity than in the natural soil. By contrast, the applied contaminant had no statistical effect ( $P < 0.05$ ) on the *o*-diphenoloxidase activity.

In this study, TCE also reduced ( $P < 0.05$ ) both total (measured in the carbon extracted with pyrophosphate) and specific (enzyme activity with reference to the humic-C fraction) extracellular  $\beta$ -glucosidase, especially in T-columns (Fig. 2).

For isoelectric focusing (IEF), the focalised carbon extracted, represented by the densitometric scanning of native humic bands carried out at 650nm, and the  $\beta$ -glucosidase activities determined on the different areas of the focalised carbon are shown in Figure 3. T soils showed a spectrum with the lower enzyme activities whereas T+V soils presented both greater quantity of focalised humic carbon and spectra heterogeneity. The  $\beta$ -glucosidase activity linked to the humus fraction  $>10^4$ , and estimated as the sum of the activities of each single band retrieved after IEF, is also shown in Fig. 3.

**Table 2** TCE levels in effluents and in TCE-contaminated soils

	EFFLUENTS (g ml <sup>-1</sup> )			SOILS (g g <sup>-1</sup> )	
	0 days	30 days	90 days	0-10 cm	12-32 cm
T	80±2.9	4.2±0.12	0	4.8±0.54	0.13±0.01
T+V	65±3.1	0.08±0.01	0	1.0±0.33	0.17±0.01
	S	S	NS	S	NS

Values are means of three replicates ± standard error. The letter indicates a significant (S) or non-significant (NS) difference between TCE-contaminated soil (T) and TCE-contaminated and amended soil (T+V) ( $P < 0.05$ )

The number of DGGE bands increased from 15 to 30 when the soil was artificially contaminated with TCE. When the organic barrier was present, 18 and 33 bands were detected in the contaminated soils, in the soil layers located above and below the vermicompost, respectively (Fig. 4). To compare DGGE patterns for the three column systems, Nei and Li's indices were determined, and UPGMA was used to create a dendrogram describing pattern similarities (Fig. 5).

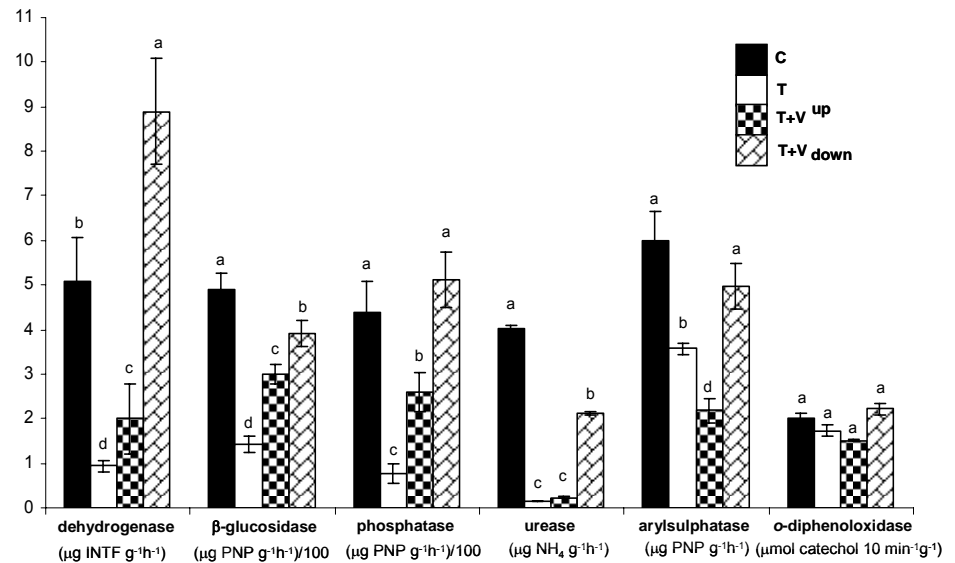
Representatives of bands that were clear and had high intensity were excised from DGGE gels and subjected to sequencing. The sequences of a total of 21 DNA fragments were successfully determined but only 7 sequences revealed a S<sub>ab</sub> score match  $>7$  (Table 3). The S<sub>ab</sub> score reports the degree of sequence similarity to other known organisms, which indicates the number of unique 7-base oligomers common to the sequence of interest and a given RDP sequence (Ribosomal Database Project II sequence database). A genus name is indicated when the best match (S<sub>ab</sub> score) is higher than 0.7 (Maidak et al. 2001). The behaviour of the three main phyla of bacteria isolated from the DGGE bands was quite different. Bands corresponding to Actinobacteria (bands 6 and 7, Fig. 4) disappeared, whereas those affiliated with Proteobacteria (bands 2 and 5, Fig 4) remained after the TCE contamination. The disappeared Actinobacteria became visible in the soil below the vermicompost. Bands 4 and 1 (Fig. 4), corresponding to phylum Bacteroidetes, appeared only in columns of contaminated soils, the last only in the soil layer above the vermicompost.

A total of 78 clones were obtained from PCR-cloning experiments and screened by SSCP. SSCP screening of the PCR products showed some differences in band position between natural (C) and contaminated soils, and in these latter, between soils without (T) or with vermicompost (T+V) (image not shown). The subsequent sequence analysis revealed that 78% of the clones obtained were affiliated with RND proteins with more than 68% similarity in amino-acid sequences (Table 4). In this study, 6 types of RND proteins were detected in the natural soil, 3 in the TCE-contaminated soil, and 7/5 in TCE-contaminated soil above/below the vermicompost in the biobarrier columns. TCE tended to eliminate the clones detected in the uncontaminated soil while new efflux pumps appeared (*Acidovorax* sp., *E.coli*). Clones ascribed to *Acinetobacter* or *Pseudomonas* spp. came out only in the biobarrier columns.

### 4 Discussion

Taking into account that about 250 ml of effluent were collected for each time, and that the extraction recovery was about 80%, we could presume that about 56% in T and 43% in T+V of the TCE added was leached during the first month of the experiment. The difference between the two systems should be attributed also to evaporation and adsorption of TCE on the soil and on

**Fig. 1** Enzyme activities in uncontaminated (C) and in TCE-contaminated soils, amended (T+V) or not (T) with vermicompost. T+V<sup>up</sup>: soil layer above the vermicompost; T+V<sub>down</sub>: soil layer below the vermicompost. Error bars represent the standard error of the mean of triplicate samples. Significant differences among the soils are indicated by different letters ( $P < 0.05$ ).



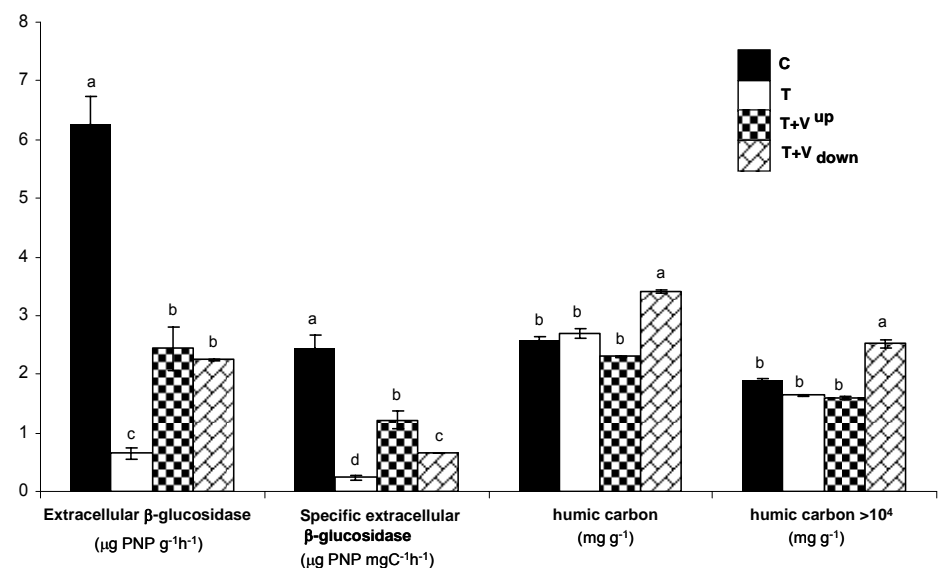
the organic amendment (Pignatello, 1990, Katsenovich et al. 2007). In our conditions, TCE evaporated less easily from the vermicompost than from the soil, but no TCE was detected in the layer of vermicompost after 90 days of incubation. In the biobarrier system, the vermicompost tended to first adsorb and thereafter degrades some of the added TCE, consequently reducing the leaching. The main different between T and T+V soils could be detected in the top layer, where the effect of the vermicompost was evident ( $P < 0.05$ ). In the other soil layer, the T and T+V columns did not significantly differ.

The activities of six soil enzymes were used in this study

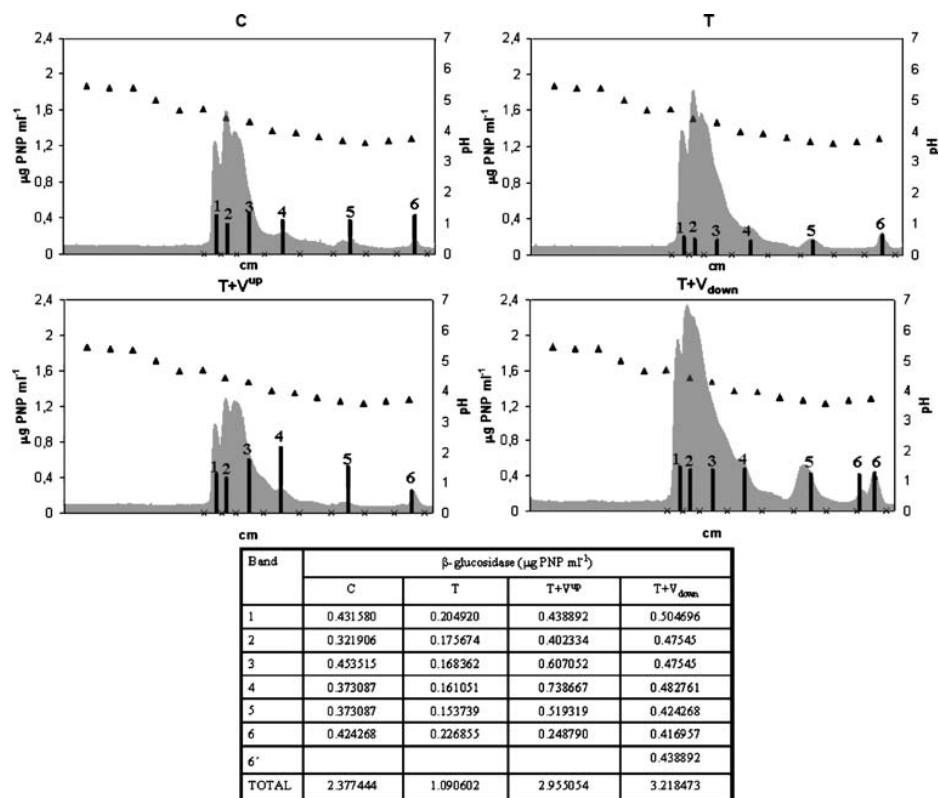
as feasible indicators of soil quality. Oxidoreductases as dehydrogenase and *o*-diphenoloxidase may give indications of the oxidative potential of the soil (Gianfreda et al. 2005). Hydrolases such as β-glucosidase, phosphatase, urease, and arylsulphatase are involved in the biochemical cycles of carbon, phosphorus, nitrogen and sulphur, respectively. The TCE decreased the enzymes production and/or inhibited the activity. Anyway, the inhibiting effect was weaker in T+V columns ( $P < 0.05$ ).

As reported by other authors for aromatic hydrocarbons, urease in our study was the most sensitive enzyme to an aliphatic hydrocarbon-contamination, showing a 27-fold

**Fig. 2** Extracellular β-glucosidase activity and humic carbon fractions in uncontaminated (C) and in TCE-contaminated soils, amended (T+V) or not (T) with vermicompost. T+V<sup>up</sup>: soil layer above the vermicompost; T+V<sub>down</sub>: soil layer below the vermicompost. Error bars represent the standard error of the mean of triplicate samples. Significant differences among the soils are indicated by different letters ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3** Isoelectric focusing profile and  $\beta$ -glucosidase activity of the humic fraction >10,000 daltons in uncontaminated (C) and in TCE-contaminated soils, amended (T+V) or not (T) with vermicompost. T+V<sup>up</sup>: soil layer above the vermicompost; T+V<sub>down</sub>: soil layer below the vermicompost.



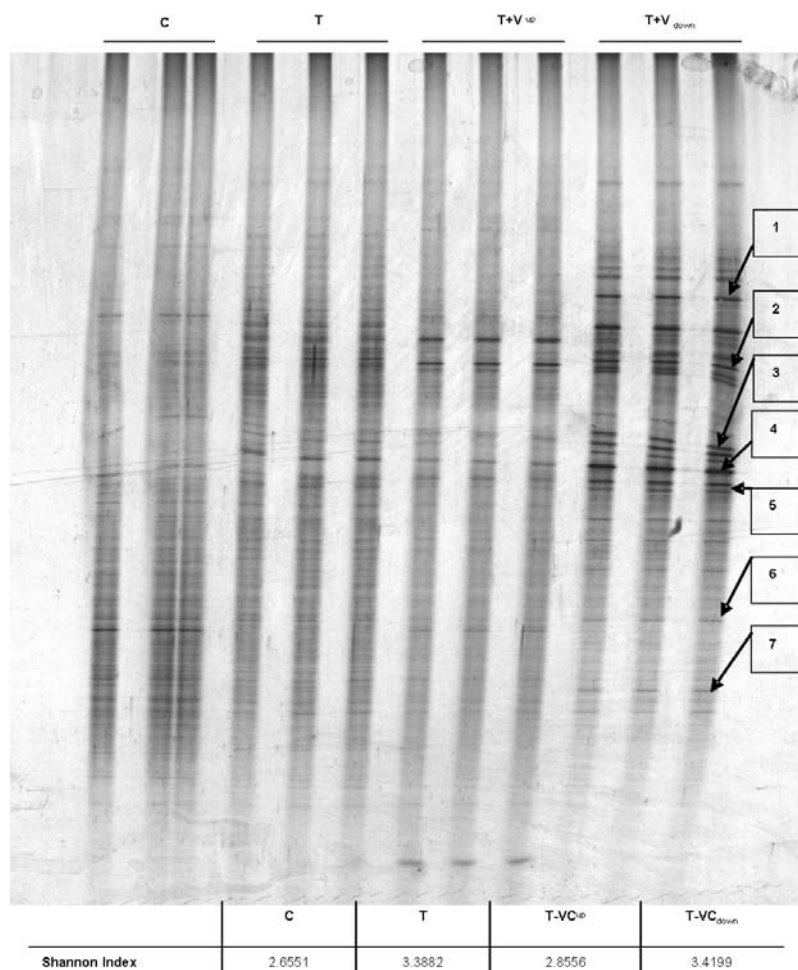
decrease in response to TCE in T columns. Nevertheless, organic matter released from vermicompost palliated the inhibition of the urease activity, and 17- and 2-fold decreases were observed in T+V<sup>up</sup> and T+V<sub>down</sub>, respectively. It has been verified that aromatic hydrocarbons inhibit enzymes, particularly dehydrogenase and urease activities, in several soils (Maliszewska-Kordybuch and Smreczek, 2003, Gianfreda et al. 2005), but to date, little was known about the influence of aliphatic hydrocarbons on the soil enzymatic activity (Li et al. 2005). Aliphatic solvents can be toxic to microorganisms, depending on the inherent toxicity of the pollutant and the intrinsic tolerance of the bacterial species and strains. The toxicity of a given solvent correlates with the logarithm of its partition coefficient in *n*-octanol and water ( $\log P_{ow}$ ), and organic solvents with a  $\log P_{ow}$  between 1.5 and 4.0 are extremely toxic for microorganisms, because these substances accumulate in the cytoplasmic membrane of bacteria and disrupt the cell-membrane structure (Ramos et al. 2002). Since the  $\log P_{ow}$  of the TCE is 2.42, the decline of the dehydrogenase activity could represent the bioavailability of the pollutant to cross the cell membrane of several microorganisms from the TCE-contaminated soil.

During the vermicomposting of olive wastes the synthesis of enzymes is induced, and the extracellular  $\beta$ -glucosidases may form complexes with the humic substances (Benitez et al. 2005). These extracellular enzymes may remain active in soil environments representing the initial, rate-limiting step in the decomposition of complex organic compounds

(Sinsabaugh, 1994). Although enzymes incorporated into the humic substances of vermicomposted olive wastes are quite stable (Benitez et al. 2005), TCE (or its degraded products) inhibited the background levels of the soil extracellular  $\beta$ -glucosidase activity also in T+V columns. The decrease (10-fold in T) was less severe in the biobarrier system (two-fold in the upper soil layer T+V<sup>up</sup>) but, in any case, no relation was found between the levels of TCE in soil (see Table 2) and extracellular  $\beta$ -glucosidase activity (Fig. 2), or between the latter and the quantity of humic carbon in soils. Since no significant loss of humic carbon could be found between control and contaminated soils, extracellular  $\beta$ -glucosidase seemed to be more closely related to the type of humic compound than to the quantity of C in the extract (Benitez et al. 2000).

To determine whether the loss of activity occurred in overall extracellular  $\beta$ -glucosidase or in that linked to stable humic substances (humic-enzyme complexes), the isoelectric focusing (IEF) technique was carried out in the humic fraction with a nominal molecular weight of >104 daltons, obtained after membrane ultrafiltration (Ceccanti et al. 1989, Masciandaro et al. 1997). IEF allows the study of humic-enzyme complexes and the separation of enzymatically active from non-active humic matter in vermicompost (Benitez et al. 2000). The results seemed to confirm the above presumptions. T soils showed the lower enzyme activities whereas T+V soils presented both greater quantity of focalised (and therefore stable) humic carbon and spectral heterogeneity: very different bands with higher enzyme activities. The results demonstrate that no inhibition of

**Fig. 4** DGGE profiles and Shannon diversity index values from uncontaminated (C) and from TCE-contaminated soils, amended (T+V) or not (T) with vermicompost. T+V<sup>up</sup>: soil layer above the vermicompost; T+V<sub>down</sub>: soil layer below the vermicompost.



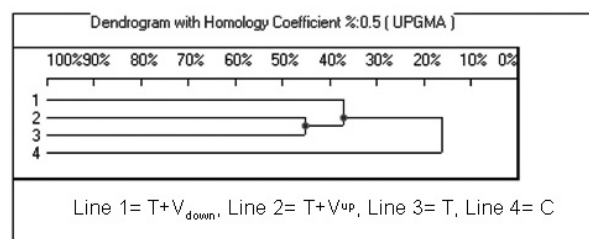
humic-bound  $\beta$ -glucosidase occurred in the soil layer below or above the vermicompost, but only in T soil. The  $\beta$ -glucosidase activity linked to the humus fraction  $>10^4$  was 1.2 and 1.3-fold greater in T+V<sup>up</sup> and T+V<sub>down</sub> than in natural soil, whereas a decrease of about 50% was detected in the unamended and contaminated soil (T). From this trend, we could assume the presence in the soil humic fraction  $>10^4$  of stable humic- $\beta$ -glucosidase complexes, which could be provided and/or be stimulated by the vermicompost, increasing in this last case the resistance of the enzyme to the inhibition.

It is generally accepted that bacterial DNA profiles obtained by DGGE can be used as a semi-quantitative measure of bacterial diversity (Dilly et al. 2004). Even though the real number of genotypes could be greatly underestimated, the patterns discerned in our study indicate that the structure and diversity of bacterial communities changed significantly after 90 days of TCE application.

The UPGMA dendrogram showed that T and T+V<sup>up</sup> soils clustered together, representing one clear group of samples. The T+V<sub>down</sub> soils grouped with the above cluster, and all together with the natural soil. Only tentative conclusions can be drawn with the low levels of homology detected, but two important considerations could be taken into account: TCE seems to have a clear

influence on the structure of the autochthonous bacterial community and, the organic matter released by the vermicompost tended to avoid the toxic effect of the contaminant.

For a better understanding of the above trend, the structural diversity of the microbial community was also examined by the Shannon index of general diversity  $H'$  (Shannon and Weaver, 1963). The index increases with the number of species and is higher when the mass is distributed more evenly over the species. For  $H'$  calculation, it is generally considered that the intensities of the DNA bands reflect the relative levels of the bacterial strains (Dilly et al. 2004). TCE



**Fig. 5** Cluster analysis of bacterial DGGE profiles from uncontaminated (C) and from TCE-contaminated soils, amended (T+V) or not (T) with vermicompost. T+V<sup>up</sup>: soil layer above the vermicompost; T+V<sub>down</sub>: soil layer below the vermicompost.

**Table 3** Nearest match identification of bacterial 16S rDNA gene sequences isolated from uncontaminated (C) and from TCE-contaminated soils, amended (T+V) or not (T) with vermicompost.

Band	GenBank entry	Soil				Taxon	Closest phylogenetic relative; GenBank entry	CHIMERA-CHECK	
		C	T	T+V <sup>up</sup>	T+V <sub>down</sub>			S <sub>ab</sub>	Olis
1	EU275372				x	Bacteroidetes	Flavobacterium sp.; AB299700	0.638	861
2	EU275373	x	x	x	x	Proteobacteria	Azospirillum sp.; AY061963	0.946	451
3	EU275374	x	x	x	x	Genera_incerta e_sedis_TM7	uncultured bacterium; AF269008	0.705	1083
4	EU275375		x	x	x	Bacteroidetes	uncultured bacterium; DQ906138	0.903	566
5	EU275376	x	x	x	x	Proteobacteria	uncultured Bradyrhizobium sp.; AY644692	0.822	535
6	EU275377	x			x	Actinobacteria	Uncultured actinobacterium; AJ535739	0.953	626
7	EU275378	x			x	Actinobacteria	uncultured actinobacterium; AJ535739	1	626

T+V<sup>up</sup>: soil layer above the vermicompost; T+V<sub>down</sub>: soil layer below the vermicompost. Check S<sub>ab</sub>: seqmatch score; Chimera Olis: number of uniquely occurring oligomers within a given sequence.

increased *H'* from the DGGE banding patterns (Fig. 4) suggesting an increase of the soil-structural diversity in the contaminated soils. Nevertheless, no clear relationship between TCE concentration in soil and diversity of the bacterial population was noted. Similar patterns could be found when the community structures of bacteria and microbial activity were considered. The taxonomic diversity of bacteria was enhanced by effect of TCE whereas soil microbial activity decreased, except for the soil below the organic biobarrier (T+V<sub>down</sub>). Since the use of the dehydrogenase assay has been recognized as a useful indicator of the overall measure of the intensity of microbial metabolism (von Mersi and Schinner 1991), even in soils contaminated with both organic and inorganic contaminants (Rossel et al. 1997, Lee et al. 2000), these results could be attributed to PCR-DGGE methodology, since the method reveals the presence of dominant populations (Heuer et al. 2001) regardless of their metabolic state. In our work, specific

functions in soil were inhibited by TCE but an increase in the bacterial diversity was detected by PCR-DGGE technique in the contaminated soils.

Since the Actinobacteria are a group of Gram-positive bacteria and Proteobacteria and Flavobacterium are Gram-negative, DGGE bands corresponding to Gram-positive bacteria disappeared after application of TCE, whereas those of Gram-negative bacteria remained or appeared (or became visible). To date, no mechanisms of resistance to organic solvents have been described for Gram-positive bacteria (Meguro et al. 2005). Bacteria of this group were probably incorporated with the vermicompost and therefore became visible in the soil layer below it.

The molecular mechanisms for the resistance of Gram-negative bacteria to organic solvents have been related to the presence in the microorganisms of RND efflux pumps (Ramos et al. 2002). Recently, molecular characterization of RND transporters from solvent-

**Table 4** RND proteins obtained from uncontaminated (C) and from TCE-contaminated soils, amended (T+V) or not (T) with vermicompost.

GenBank entry	N° of clones				Highest match in the database (% identity amino acids)
	C	T	T+V <sup>up</sup>	T+V <sub>down</sub>	
EU053435	0	12	6	5	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933 NP_290094.1 (99)
EU053436	4	0	0	1	<i>Pseudomonas putida</i> F1 ZP_00901351.1 (99)
EU053437	0	3	2	0	<i>Escherichia coli</i> AAA58070.1 (98)
EU053438	0	0	7	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1 YP_347011.1 (98)
EU053439	0	1	0	1	<i>Acidovorax</i> sp. JS42 YP_987054.1 (97)
EU053440	1	0	1	0	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AF232237_4 (91)
EU053441	0	0	3	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 4365 ABB30249.1 (91)
EU053442	4	0	1	0	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 ZP_01645643.1 (77)
EU053443	3	0	0	0	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256 YP_616495.1 (73)
EU053444	1	0	0	0	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 YP_752526.1 (73)
EU053445	2	0	1	0	<i>Serratia proteamaculans</i> 568 ZP_01534719.1 (68)

T+V<sup>up</sup> soil layer above the vermicompost; T+V<sub>down</sub>: soil layer below the vermicompost.

resistant bacteria by a PCR strategy has been successfully developed in petroleum-contaminated soils by Meguro et al. (2005). In our study, this approach has been used to study RND transporters in the TCE-contaminated soils. The results indicated that the bacterial community from the soil presented significantly different RND-transporters under TCE conditions. TCE maintained or even increased the number of clones with the DNA encoding for RND proteins, except for the contaminated soil located above the vermicompost. However, the main effect of TCE was to modify the structure of the soil community, considering the type of efflux pumps encoded by the DNA extracted from soil bacteria. With vermicompost (T+V), new efflux pumps ascribed to *Acinetobacter* or *Pseudomonas* spp. came out, indicating that the induction of resistance to solvents in the autochthonous bacterial community and/or the incorporation of new bacterial species able to grow in a TCE-contaminated ambient, could occur.

As previously reported for hydrocarbon-contaminated soils (Crapez et al. 2000), the length of the experiments was sufficient for the adaptation, acclimation, and specialization of the soil bacterial community to TCE contamination.

## 5 Conclusions and perspectives

Trichloroethylene inhibited soil enzyme activities involved in the biochemical cycles of carbon, phosphorus, nitrogen and sulphur. The organic matter released by the vermicomposted olive waste tended to avoid the toxic effect of the contaminant.

Trichloroethylene also inhibited the background levels of the soil extracellular  $\beta$ -glucosidase activity, even when vermicompost was present. The isoelectric focusing technique showed that the loss of activity occurred in the overall extracellular  $\beta$ -glucosidase, and not in that linked to stable humic substances (humic-enzyme complexes). In this case, the effect of the vermicompost was to provide and/or to stimulate the humic- $\beta$ -glucosidase complexes located in the soil humic fraction  $>10^4$ , increasing the resistance of the enzyme to the inhibition.

Trichloroethylene had clear influence on the structure of the autochthonous bacterial community, and an increase in the bacterial diversity was detected by PCR-DGGE technique in all the contaminated soils.

The bacterial community from the soil presented significantly different RND-transporters, detected by PCR-SSCP technique, under trichloroethylene conditions. The vermicompost induced the resistance to solvents (RND proteins) in the autochthonous bacterial community and/or incorporated new bacterial species, able to grow in a trichloroethylene-contaminated ambient.

Coupled biochemical and molecular methodologies

are therefore helpful approaches for assessing the effect of an organic amendment on the biochemical and biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil.

**Acknowledgments** This work has been financed by the Education and Science Ministry through projects REN2003-05359, CSIC-CNR Project 2004IT0003 and B. Moreno's grant. We would also like to thank C. Cifuentes for the technical assistance and David Nesbitt for assisting in the translation of the original manuscript into English.

## References

- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196, 80–3
- Benitez E, Melgar R, Nogales R (2004): Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biol Biochem* 36, 1615–1623
- Benitez E, Nogales R, Masciandaro G, Ceccanti B (2000): Isolation by isoelectric focusing of humic-urease complexes from earthworm (*Eisenia foetida*)-processed sewage sludges. *Biol Fert Soils* 31, 489–493
- Benitez E, Sainz H, Nogales R (2005): Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Bioresource Technol* 96, 785–790
- Benitez E, Sainz H, Melgar R, Nogales R (2002): Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: a pilot scale study. *Waste Manage Res* 20, 134–142
- Burns RG (1986): Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. In: *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. Special Publication No. 1. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp 429–451
- Ceccanti B, Alcañiz-Baldellou JM, Gispert-Negrell M, Gassiot-Matas M (1986): Characterization of organic matter from two different soils by pyrolysis-gas chromatography and isoelectric focusing. *Soil Sci* 142, 83–90
- Ceccanti B, Bonmati-Pont M, Nannipieri P (1989): Microdetermination of protease activity in humic bands of different sizes after analytical isoelectric focusing. *Biol Fert Soils* 7, 202–206
- Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM (2003): The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 31, 442–443
- Crapez M, Tosta Z, Bispo M, Pereira D (2000): Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco Beaches, Guanabara Bay, Brazil. *Environ Pollut* 108, 291–295
- Dilly O, Bloem J, Vos A, Munch JC (2004): Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl Environ Microb* 70, 468–474
- Ensign SA, Hyman MR, Arp DJ (1992): Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylene-grown *Xanthobacter* strain. *Appl Environ Microb* 5, 3038–3046
- Ensley BD (1991): Biochemical diversity of trichloroethylene

- metabolism. *Annu Rev Microbiol* 45, 283-299
- Fava F, Di Gioia D (2001): Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in an artificially contaminated soil. *Biotechnol Bioeng* 72, 177-184
- Filip Z, Demmerova K (2006): Microbial resistance to chemical contaminants - an essential precondition of natural attenuation in groundwater aquifer. In: *Management of Intentional and Accidental Water Pollution*, Springer Netherlands, pp 113-127
- García C, Hernández MT, Costa F (1997): Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun Soil Sci Plan* 28, 123-134
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003): ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788
- Gianfreda L, Rao MA, Piotrowska A, Palumbo G, Colombo C (2005): Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Sci Total Environ* 34, 265-279
- Harris JA (2003): Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *Eur J Soil Sci* 54: 801-808
- Heuer H, Wieland G, Schonfeld J, Schnwalder A, Gomes NCM, Smalla K (2001): Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp 177-190
- Ibekwe AM, Grieve CM (2004): Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiol Ecol* 48, 239-248
- Kandeler E, Dick RP (2006): Soil Enzymes: Spatial Distribution and Function in Agroecosystems. In: *Biodiversity in Agricultural Production Systems*, CRC/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA and London. pp 263-285
- Katsenovich Y, Öztürk Z, Allen M, Wein G (2007): Evaluation of soil solid amendments for TCE biodegradation in a biobarrier system. *Remediation Journal* 17, 67-80
- Lee SM, Jung JY, Chung YC (2000): Measurement of ammonia inhibition of microbial activity in biological wastewater treatment process using dehydrogenase assay. *Biotechnol Lett* 22, 991-994
- Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT Jr, Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, Tiedje, JM (2001): The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29, 173-174
- Maliszewska-Kordybuch B, Smreczek B (2003): Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment Int* 28, 719-728
- M.A.P.A. (1986): *Metodos oficiales de analisis*. Tomo III. Plantas, productos organicos, fertilizantes, suelos, agua, fertilizantes organicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, Madrid
- Masciandaro G, Ceccanti B, Garcia C (1997): Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Bioresource Technol* 59, 199-206
- Meguro N, Kodama Y, Gallegos MT, Watanabe K (2005): Molecular characterization of resistance-nodulation-division transporters from solvent- and drug-resistant bacteria in petroleum-contaminated soil. *Appl Environ Microb* 7, 580-586
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb* 59, 695-700
- Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli S, Matarese E (1980): Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Sci Soc Am J* 44, 1011-1016
- Ndiaye EL, Sandeno JM, McGrath D, Dick RP (2000): Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *Am J Alter Agri* 15, 26-36
- Nei M, Li W (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *P Natl Acad Sci Usa* 76, 5269-5273
- Nelson MJK, Montgomery SO, O'Neill EJ, Pritchard PH (1986): Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 383-384
- Perucci P, Casucci C, Dumonet D (2000): An improved method to evaluate o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biol Biochem* 32, 1927-1933
- Pignatello JJ (1990): Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soils. I. Formation of residual fractions. *Environ Toxicol Chem* 9, 1107-1115
- Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, Teran W, Segura, A (2002): Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56, 743-768
- Romero E, Benitez E, Nogales R (2005): Suitability of wastes from olive-oil industry for initial reclamation of a Pb/Zn mine tailing. *Water Air Soil Poll* 165, 153-165
- Rossel D, Tarradellas J, Bitton G, Morel JL (1997): Use of enzymes in ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. In: *Soil Ecotoxicology*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, pp 179-192
- Ruiz-Jaen MC, Aide TM (2005): Restoration Success: How Is It Being Measured? *Restor Ecol* 13, 569-577
- Saavedra M, Benitez E, Cifuentes C, Nogales R (2006): Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* 17, 93-102
- Schwieger F, Tebbe CC (1998): A new approach to utilise PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microb* 64, 4870-4876
- Shannon CE, Weaver W (1963): *The Mathematical Theory of Communication*. The University of Illinois Press, Urbana
- Sims JR, Haby VA (1971): Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Sci* 112, 137-141
- Sinsabaugh RL (1994): Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biol Fert Soils* 17, 69-74
- Soil Survey Staff (1999): *Soil taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. 2nd ed. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources
- Tabatabai MA, Bremner JM (1969): Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1, 301-307
- Tabatabai MA, Bremner JM (1970): Arylsulfatase activity of soils. *Soil Sci Soc Am Proceedings* 34, 225-229
- Takami W, Horinouchi M, Nojiri H, Yamane H, Omori T (1999): Evaluation of trichloroethylene degradation by *E. coli* transformed with dimethyl sulfide monooxygenase genes and/or cumene dioxygenase genes. *Biotechnology Letters* 21, 259-264
- von Mersi W, Schinner F (1991): An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. *Biol Fert Soil* 11, 216-220



## **Capítulo 4**

---

**Microbial eco-physiological profiles to estimate  
the effectiveness of rhizoremediation of  
trichloroethylene-contaminated soils**





## Microbial eco-physiological profiles to estimate the effectiveness of rhizoremediation of trichloroethylene-contaminated soils

### Resumen

En este estudio se investigó la efectividad de usar la rizoremediación acelerada para eliminar TCE de un suelo contaminado artificialmente mediante el uso de *Medicago sativa* L y *Dittrichia viscosa* L. También se utilizaron índices eco-fisiológicos para evaluar la recuperación bioquímica y microbiológica de los suelos contaminados y plantados, enmendados o no con vermicompost de alperujo. Ambas plantas aumentaban la biorremediación del suelo contaminado por TCE. *D. viscosa* mejoraba la calidad del suelo contaminado aplicada sola o en combinación con vermicompost. Este último tratamiento, fue el único que incrementaba las estimaciones bioquímicas y biológicas hasta valores próximos a los mostrados por el suelo natural. Además, los perfiles filogenéticos de DGGE generados por estos suelos se encontraban muy relacionados. Estos resultados indicaron que *D. viscosa*, junto con vermicompost de alperujo de oliva, fue la estrategia más eficiente para recuperar un suelo contaminado por TCE bajo sus condiciones naturales. Por otro lado, los índices eco-fisiológicos fueron adecuados indicadores para evaluar del éxito de un episodio de biorremediación.

*Este artículo ha sido enviado a la revista FEMS Microbial Ecology*



# Microbial eco-physiological profiles to estimate the effectiveness of rhizoremediation of trichloroethylene-contaminated soils

B. Moreno, R. Nogales, E. Benitez\*

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, c/Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

## Abstract

The effectiveness of using enhanced rhizoremediation in removing trichloroethylene from an artificially contaminated soil using *Medicago sativa* L. and *Dittrichia viscosa* L. was investigated. Eco-physiological profiles were also used to evaluate biochemical and microbiological restoration of the contaminated and planted soils, amended or not with an olive-waste-derived vermicompost. Both plants enhanced bioremediation of the trichloroethylene-contaminated soil. *D. viscosa* boosted the quality of the contaminated soil used alone or mixed with the vermicompost. This latter was the only treatment that improved the overall biochemical and biological estimates to values close to those of the natural soil. In addition, the phylogenetic profiles of these soils were quite closely related. Both findings indicate that *D. viscosa*, together with vermicompost from olive waste, was the most efficient strategy to restore a trichloroethylene-contaminated soils under their natural conditions

**Capsule:** Eco-physiological profiles as an index for monitoring the success of a restoration scheme.

**Keywords:** trichloroethylene; rhizoremediation; eco-physiological profiles

## 1. Introduction

Trichloroethylene (TCE) is a chlorinated aliphatic hydrocarbon suspected of being carcinogenic and mutagenic (EPA, 1997). TCE is a persistent contaminant that infiltrates soil and ground water from the inappropriate disposal of dry-cleaning agents and degreasing solvents. Since TCE is a dense non-aqueous phase liquid, it may penetrate the groundwater, leaving behind residual pockets that can contribute to long-term contamination (Anderson and Andersen, 1996).

To date, no microorganisms able to degrade TCE under aerobic conditions have been isolated. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated soils can therefore be based only on co-metabolism, "the transformation of an organic compound by a microorganism incapable of using the substrate as a source of energy or of one of its constituent elements" (Alexander, 1967). The oxygenase enzymes involved in the breakdown of TCE, as well as substrates for co-metabolism, have been widely described (Saeki et al., 1999; Yang et al., 1999; Saul et al., 2000; Futamata et al., 2003; Hubert et al., 2005).

The feasibility of the co-metabolism of TCE by several organic amendments has been previously evidenced (Wu, Nye et al. 1998; Wu, Kitagawa et al., 1998; Kao and Lei, 2000; Kassenga et al., 2003). In a previous work, the present authors demonstrated the capacity of a vermicompost derived from an olive-waste mill for restoring a TCE-contaminated soil (Moreno et

al., 2008). Because they are rich in organic carbon readily available to microbial consortia and relatively inexpensive, this vermicompost may be an attractive instrument for *in situ* bioremediation of TCE-contaminated soils.

Rhizoremediation is a bioremediation strategy that seeks to stimulate pollutant degradation by the indigenous microbial community of the rhizosphere. The composition of such microbial communities is influenced mainly by the quality and quantity of the carbon sources released by plants as root exudates. In addition, they may also supply bacteria with cofactors required for the activation of enzymes involved in the pollutant-degradation pathway (Singer et al., 2003). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) has been proposed as a suitable plant for rhizoremediation. A successful rhizosphere degradation of chloronitroaromatic pollutants, polychlorinated biphenyls, trichloroethylene, petroleum hydrocarbons, and a mixture of organic chemicals [hexadecane, (2,2-dimethylpropyl)benzene, cis-decahydronaphthalene, benzoic acid, phenanthrene and pyrene] in contaminated soils have been reported, concluding that alfalfa roots increase the population size of bacteria, some of which are xenobiotic degraders, and even selectively increase the xenobiotic-degrading population in its rhizosphere (Narayanan et al., 1995; Nichols et al., 1997; Demnerová et al., 2005; Kirk et al., 2005; Liu et al., 2007).

Monitoring of contaminated-soil restoration efforts can be achieved following different approaches (Ruiz-Jaen and Aide, 2005). Soil microorganisms are very sensitive to any ecosystem perturbation and respond

\* Corresponding author. Tel.: +34 958181600; fax: +34958129600  
E-mail address: [emilio.benitez@eez.csic.es](mailto:emilio.benitez@eez.csic.es) (E. Benitez).

rapidly to stressors by adjusting activity rates, biomass, and community structure. In several cases, variation in microbial population and activity could also function as a predictor of change in soil health (Nielsen et al., 2002). In this sense, several enzyme activities, including keystones to the soil-nutrient cycles, have been postulated as useful markets of the impact of pollution on the metabolic activity of soil (Dick, 1997; Kiss, 2001; Margesin et al., 2007; Labud et al., 2007). Real-time polymerase chain reaction (PCR) targeting 16S rRNA genes has been proposed as a feasible method to estimate bacterial biomass in contaminated and altered environments (Cebbron et al., 2008; Moreno et al., 2009). Fingerprint patterns based on the separation of 16S rRNA PCR products by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Muyzer et al., 1993) have been widely used to visualize the resident bacterial community in contaminated soils (Macnaughton et al., 1999; Kozdroj and Elsas, 2001; Joynt et al., 2006; Vivas et al., 2008). The structural diversity of a bacterial community has been found to be very sensitive to environmental changes, reacting by shifts in its composition (Kandeler et al., 1999). When DNA sequence information is considered, diversity is described by the variation in the nucleotide sequences among individuals.

Microbiological estimates may therefore serve as a good index for evaluating soil health (Anderson, 2003), as well as the effect of contaminants on it (Labud et al., 2007). The combination of soil microbiological estimates, e.g. in sun rays or quotients, could be of great relevance for evaluating soil quality (Schloter et al., 2003).

In the present study, the effectiveness of using enhanced rhizoremediation in removing TCE from an artificially contaminated soil was investigated. Eco-physiological profiles were also used to evaluate biochemical and microbiological restoration of the TCE-contaminated and planted soils, amended or not with an olive-waste-derived vermicompost. This was attained by screening soil- and rhizosphere-community structure via DGGE, bacterial number population, and several enzyme activities involved in the main nutrient cycles within unplanted and planted soils, respectively.

## 2. Material and methods

### 2.1. Greenhouse experiment

The experimental soil used for this study was a calcareous loam (TypicXerorthent; Soil Survey Staff, 1999) collected from an agricultural field (0–20 cm in depth) in Granada, Spain. Undisturbed soil samples were taken with a stainless-steel tube and then packed in containers. After transportation to the lab, the soil was air-dried and three different sets of samples were prepared:

a) Soil amended with vermicompost from olive-mill waste (V). The vermicompost characteristics are described in the previous paper (Moreno et al., 2008). The relevant characteristics of the soil and the vermicompost are given in Table 1. As a means of reaching a soil organic-carbon content of 30 g dry wt kg<sup>-1</sup>, 1000 g of the soil were placed in 2-l black pots and thoroughly mixed with the vermicompost at a rate corresponding to 40 g dry wt kg<sup>-1</sup>. The water content was brought to 40% of the water-holding capacity of the soil by adding deionized water.

b) Soil planted with alfalfa (*Medicago sativa* L.) or false yellowhead (*Dittrichia viscosa* L.). Seeds of *M. sativa* were sown in the pots and, one week after emergence, the seedlings were thinned to 10 per pot (M). Seeds of *D. viscosa* were germinated *in vitro* and seedlings were thereafter transferred to a greenhouse and grown into the pots for 1 week (D). Pots were pre-irrigated with deionized water to reach 40% of the water-holding capacity of the soil.

c) Soil combining vermicompost and one of the two target plants (MV and DV).

Thereafter, 150 ml of TCE-contaminated water (0.4 mg TCE ml<sup>-1</sup>) was added to the soils for the following treatments: VT, MT, DT, MVT, and DVT. TCE-contaminated soils without vermicompost and without plants (T) and uncontaminated, unamended and unplanted soils (C) were used as controls.

The soils were incubated in a greenhouse for 12 weeks at 25°C. Throughout the incubation period, the water content was held constant at 60% of the water-holding capacity of the soil by adding distilled water. After this, soil samples were stored in glass vials at 4°C until biochemical and biological analyses were performed.

Table 1 Characteristics of soil (S) and vermicomposted olive-mill waste (VOW)

	S	VOW
Soil Organic Carbon (g kg <sup>-1</sup> )	16	329
Humic Acids (g kg <sup>-1</sup> )	---	38
Water-Soluble Carbon (g kg <sup>-1</sup> )	0.31	7.9
C/N	11	16
N (g kg <sup>-1</sup> )	1.4	20
P (g kg <sup>-1</sup> )	---	2.9
K (g kg <sup>-1</sup> )	---	12
pH	7.5	8.4
Polyphenols (g kg <sup>-1</sup> )	0	3.2
Dehydrogenase (µg INTF g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	5.1	248
β-glucosidase (µg PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	490	113000
Phosphatase (µg PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	439	95000
Urease (µg NH <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	4.0	393

(---) Not determined

## 2.2. TCE determination

For the determination of the losses of TCE due to evaporation, 100 g of soil, alone or amended with 4 g of vermicompost, were sterilized by tyndallization (100°C, 1 h, 3 days), contaminated with 6 mg of TCE, irrigated with deionized water to reach 60% field capacity, and incubated for three months in sterile and hermetic glasses opened twice per week under sterile conditions.

TCE were removed from soil samples by means of a microwave-assisted extraction with a MarsX (CEM, Matthews, NC, USA) system, operating at 200 psi and 115°C by using a mixture of hexane:acetone (1:1) for 10 min. Afterwards, closed vials were kept on ice for 30 min and then opened. The extracts were then filtered through Whatman 0.45µm PTFE Membrane Polypropylene Housing. The elute was added to anhydrous sodium sulphate, vortexed for 60 s and analysed by gas chromatography/electron-capture detector under the following conditions: capillary column: HP-5 (30 m by 0.25 mm); initial temperature 35°C; isothermal for four min; temperature rate 5°C/min; final temperature 40°C; isothermal for seven min; injector (splitless mode) 240°C; ECD 320°C; carrier gas-flow rate (nitrogen) 1 ml/s; sample volume 1 µl.

## 2.3. Soil organic carbon and enzymes activities

Soil organic carbon (SOC) content was determined using the Walkley-Black wet dichromate oxidation method (M.A.P.A., 1986). Water-soluble carbon (WSC) was extracted at 50°C for 1 h (Garcia et al., 1994). The C contents of WSC were determined by acid digestion with 1N potassium dichromate and sulphuric acid cc. at 160°C for 30 min. A spectrophotometric method was used to quantify the Cr<sup>3+</sup> produced by the reduction of Cr<sup>6+</sup> (λ = 590nm) (Sims and Haby, 1971).

Dehydrogenase activity was determined in 1 g of soil by the method of Von Mersi and Schinner (1991) modified by Garcia et al. (1997). Alkaline phosphatase and β-glucosidase activities were determined following the methods reported by Tabatabai and Bremner (1969) and Eivazi and Tabatabai (1987), respectively. Urease activity was determined according Nannipieri et al. (1974). For the analyses of *o*-diphenol oxidase, Perucci et al. (2000) was followed.

## 2.4. Soil-DNA extraction and PCR-DGGE analysis

The total DNA was extracted from subsamples (2 extractions for each of the three replicates per treatment) of 500 mg of soil by the bead-beating method, following the manufacturer's instructions MoBio UltraClean Soil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA). To remove trace concentrations of PCR inhibitors, the second step (Inhibitor Removal Solution) was repeated. The DNA samples were checked for concentration and quality using the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer

(NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware; USA).

PCR was performed with the 16S rRNA universal bacterial denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) primers (TIB®MOLBIOL, Berlin, Germany) F341, R907, and GC-F341 (P3) to amplify the V3 to V5 hypervariable regions of 16S rRNA genes. Primer P3 contained the same sequence as F341 but with an additional 40-nucleotide GC-rich sequence (GC clamp) at its 5' end (Yu and Morrison, 2004). The PCR program was performed as described Vivas et al. (2009).

DGGE analyses were conducted using 20 µl of the last PCR product loaded into a 50 to 60% urea-formamide-polyacrylamide gel. An INGENYphorU System (Ingeny International BV, The Netherlands) was run at 70 V for 18 h at 58°C to separate the fragments. Gels were silver stained with the Bio-Rad Silver Stain according to the standard DNA-staining protocol and photographed under UV light (λ =254 nm) using an UVitec Gel Documentation system (UVitec Limited, Cambridge, UK).

Representatives of bands that were clear and had high intensity were excised from DGGE gels and sequenced. DNA fragments from DGGE were isolated as described by Schweiger and Tebbe (1998) and modified by Vivas et al. (2009). This DNA isolated was checked for concentration and quality using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. PCR was conducted using primers F341 and 907R with 1 to 2 µl of this solution (5 to 10 ng for reaction) as described by Vivas et al. (2009). Thereafter, PCR fragments were purified by MBL-Agarosa Quickclean (Dominion-MBL SL, Spain), cloned, and subsequently sequenced in both directions by an automatic DNA sequencer (ABI-PRISM 310; Applied Biosystems, Inc.). Sequence identifications were performed using the "Sequence Match" facility of the Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>). An S\_ab score match higher than 0.7 allows associating the best match found to a genus name (Maidak et al., 2001). Possible chimeric sequences were checked using the CHECK\_CHIMERA program of the RDP database (Cole et al., 2007), and suspected sequences were removed from the analyses. Sequences were filed under GenBank accession numbers [FJ560502](#) and [FJ539023-9049](#).

## 2.5. Real-time PCR assay

Real-time PCR was performed to quantify the number of 16S rRNA copy in triplicate soil-DNA extracts. Universal primers specific for V3 hypervariable region of 16S rRNA of eubacteria P1 and P2 (Muyzer et al., 1993) were used. Real-time PCR was performed according to Vivas et al. (2009). Quantification of the DNA copy number was performed on a iQ5 thermocycler using iQ5-Cycler software (Bio-Rad, Munich, Germany).

The standard curve was generated by using a plasmid recombinant containing one copy of 16S rRNA fragment. The curve was drawn by plotting the Ct value as a log function of the copy number of 10-fold dilution

serial of plasmid DNA. As Ct values may vary slightly between experiments, parallel sets of the three dilution series of pure standard DNA were run in all experiments. The relationship between Ct and the target-gene copy number, and the copy numbers of the real-time standard were calculated as described Quian et al. (2007).

### 2.6. Data analyses

TCE and biochemical results are the means of 6 replicates (two per pot). Data of the real-time PCR represent the average of two independent soil-extract replicates per pot. Data were subjected to analysis of variance using the program STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) and Duncan's Multiple Range Test was used to separate the means with an overall significance level of 0.05.

The DGGE band patterns in different lanes were compared with the UVImap Analysis software (UVitec Limited, Cambridge, UK). The lanes were normalized to contain the same amount of total signal after background subtraction and the gel images were straightened and aligned to give a densitometric curve. DGGE banding data were used to estimate two diversity indices by treating each band as an individual operational taxonomic unit (OTU). According to Ibekwe and Grieve (2004), each band was presumed to represent the ability of that bacterial species to be amplified. Replicates of different OTUs were arbitrarily excised and sequenced, founding no differences in the sequence composition. The intensity of the bands was reflected as peak heights in the densitometric curve. The Shannon index of general diversity  $H'$  (Shannon and Weaver, 1963) was calculated from the following equation:

$$H' = - \sum (P_i \log P_i)$$

where  $P_i = n_i/N$ ;  $n_i$  =height of peak,  $N$  =sum of all peak heights in the curve.

To test whether similarities observed within and between samples were stronger or weaker than would be expected by chance, band-matching data was stored as a binary matrix and analysed using Raup and Crick's probability-based index of similarity  $S_{RC}$  (Raup and Crick, 1979). The  $S_{RC}$  is the probability that the randomized similarity would be greater than or equal to the observed similarity, and  $S_{RC}$  values above 0.95 or below 0.05 signify similarity or dissimilarity, respectively, which are not random assortments of the same species (bands or OTUs) (Rowan et al., 2003). The  $S_{RC}$  and cluster analyses were calculated using the PAST (Palaeontological statistics, version 1.82b) program (Hammer et al., 2001).

Genetic diversity  $\theta_{(n)}$  of sequenced *Proteobacteria* was calculated using the ARLEQUIN program (Schneider et al., 1997).

Eco-physiological profiles were designed in form of sun-ray plots by combining soil enzyme activities, bacterial population size, Shannon diversity index values

for DGGE profiles, and  $\theta_{(n)}$  of the sequenced *Proteobacteria* of the different treatments. The star area for each was measured using the measuring tools of Adobe Acrobat 9<sup>®</sup> (Adobe Systems Incorporated, CA, USA).

### 3. Results

After three months, 90% of the added TCE disappeared in the control soil T (Table 2). Evaporation of TCE in an artificially contaminated soil was evaluated under the greenhouse conditions, revealing that 39.5% of the TCE added had disappeared after 90 days. The presence of *Medicago sativa* or *Dittrichia viscosa* in the soils resulted in a significant drop in the TCE levels with respect to the control soil. The vermicompost, however, did not display the same capacity, and values similar to T were found in VT. The vermicompost even diminished the ability of the plants to accelerate the TCE removal, particularly in *M. sativa*.

Table 2 TCE concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) in the TCE-contaminated soils three months after contamination.

T	MT	DT	VT	MVT	DVT
5.95 ± 1.07	4.30 ± 0.48	0.94 ± 0.08	4.97 ± 0.48	6.84 ± 0.41	4.00 ± 0.23
	S	S	NS	NS	S

Values are means of six replicates ± standard error. The letter indicates a significant (S) or non-significant (NS) difference between T and the rest of treatments ( $p \leq 0.05$ ).

TCE values did not significantly change ( $p \leq 0.05$ ) the SOC levels found in all the unamended treatments at the end of the experiment (Table 3). Clearly, SOC values were boosted significantly when vermicompost was added ( $p \leq 0.05$ ), and, after three months, the increase was consistently significant in VT and, especially in MVT. Nevertheless, when *D. viscosa* was present in the amended soils (DVT), the levels of SOC were similar for those of the unamended soils. All the unamended soils also shared similar WSC levels (Table 3), and no variation with respect to initial values ( $200 \pm 11.9 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was detected ( $p \leq 0.05$ ). Vermicompost increased the WSC to  $600 \pm 40 \text{ mg kg}^{-1}$ . After three months, WSC decreased significantly ( $p \leq 0.05$ ) in the amended treatments, especially in DVT.

TCE had a negative effect on the soil-enzyme activities (Table 3) significantly decreasing the dehydrogenase,  $\beta$ -glucosidase, phosphatase, urease and *o*-diphenoloxidase activities ( $p \leq 0.05$ ). Soils under *D. viscosa*, combined or not with vermicompost, showed higher dehydrogenase activity than the unamended and unplanted contaminated soil (T). *D. viscosa* also boosted the soil  $\beta$ -glucosidase activity, and the same occurred when the vermicompost was used together with either of the two plants. Soils amended with vermicompost

Table 3 Chemical, biochemical and microbiological estimates of natural (C) and TCE-contaminated soils three months after contamination.

	C	T	MT	DT	VT	MVT	DVT
Soil Organic Carbon (g kg <sup>-1</sup> )	16.53±1.2 c	18.18±1.3 c	17.3±0.97 c	19.1±1.5 c	26.2±1.5 b	32.1±2.4 a	23.1±2.2 bc
Water-Soluble Carbon (mg Kg <sup>-1</sup> )	198±13 b	188±8.6 b	186±7.2 b	165±6.7 b	295±12 a	274±15 a	200±14 b
Dehydrogenase (µg INTF g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2.3±0.17 a	1.7±0.16 b	1.1±0.06 b	2.9±0.23 a	2.7±0.15 a	1.7±0.11 b	3.4±0.22 a
β-glucosidase (µg PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	485±8 a	344±11 b	389±13 b	670±56 a	388±13 b	557±11 a	562±21 a
Phosphatase (µg PNP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	437±9 a	295±10 b	264±11 b	478±46 a	489±40 a	535±51 a	606±26 a
Urease (µg NH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	4.9±0.49 a	1.2±0.11 c	0.75±0.06 c	1.1±0.12 c	3.0±0.22 b	2.2±0.21 bc	5.1±0.49 a
o-diphenol oxidase (µmol catechol 10min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	2.5±0.09 a	2.1±0.03 b	1.2±0.11 cb	1.7±0.17 bc	0.71±0.09 d	2.8±0.08 a	2.3±0.21 ab
Bacterial number (copy numbers g soil <sup>-1</sup> )	6.6E+08±	3.4E+08±	2.8E+07±	2.2E+08±	3.9E+08±	5.6E+08±	5.5E+08±
	2.5E+07 a	5.4E+07 b	9.4E+05 d	4.3E+07 c	1.8E+07 b	1.4E+07 a	3.2E+07 a
Species Richness (R) for DGGE profiles	19	25	21	28	20	25	28
Shannon H' index for DGGE profiles	2.94± d	3.21± b	3.03± d	3.32± c	2.98± b	3.20± a	3.32± a
Proteobacteria genetic diversity (θ(π))	257±168	279±169	319±194	289±189	279±169	283±185	307±186
Eco-physiological index area (sq mm)	332.58	172.97	104.46	253.57	223.84	299.27	427.41

Values are means of six replicates ± standard error. For each parameter, different letter indicates a significant difference between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

exhibited higher phosphatase activity than T, and the effect was independent of the presence of either of the two plants. Vermicompost alone or combined with *D. viscosa* significantly increased the urease activity of the TCE-contaminated soil.

A real-time PCR standard curve was generated for bacterial 16S rRNA quantification. Serially diluted DNA originating from recombinant plasmid including 16S rRNA fragment showed the single expected amplicon of 193 bp. The equation describing the relationship between Ct and the log number of 16S rRNA copies was  $Ct = -3.329 \times \log(16S \text{ rRNA}) + 38.072$ ,  $R^2 = 0.997$ . Target molecules were linear from  $10^4$  to  $10^9$  copies. TCE significantly lowered also the number of bacteria ( $p \leq 0.05$ ) in the natural soil (Table 3). Plants decreased this number still more whereas vermicompost alone had no effect on this parameter. Nevertheless, the combined action of the amendment and any of the two plants increased the number of 16S rRNA copies.

Figure 1 shows the DGGE profiles of the soils. The number of DGGE bands increased from 19 to 25 when the soil was artificially contaminated with TCE, as well as the structural diversity of the bacterial community examined by the Shannon diversity index  $H'$  (Table 3). TCE-contaminated soil amended with the vermicompost evidenced the lowest number of bands and  $H'$  index. *D. viscosa* alone or combined with vermicompost (OT and OVT), displayed the highest number of bands and  $H'$  from the DGGE banding patterns, while *M. sativa* alone or with vermicompost showed lower or similar number of bands and  $H'$  values, respectively, than the unamended and unplanted contaminated soil (T)

The  $S_{RC}$  values found by comparing the treatments are summarized in Figure 2. Similarities within replicas were significant in all by-products ( $S_{RC}=1$ , data not

shown). T was significantly dissimilar to MT and DVT, and these to each other ( $S_{RC}<0.05$ ). T and VT were significantly similar ( $S_{RC}>0.95$ ) and the same was true for DT and DVT. For the rest of the compared DGGE profiles, the similarity was no greater than expected by chance ( $0.95A>S_{RC}>0.05$ ). Figure 2 also shows the dendrogram generated by the Raup and Crick cluster analyses. The control soil clustered with TCE-contaminated soils under *D. viscosa*.

Representatives of bands that were clear and had high intensity were excised from DGGE gels and subjected to sequencing. The sequences of a total of 80 DNA fragments were successfully determined (560-588 bases), 70 of them revealing an S\_ab score match higher

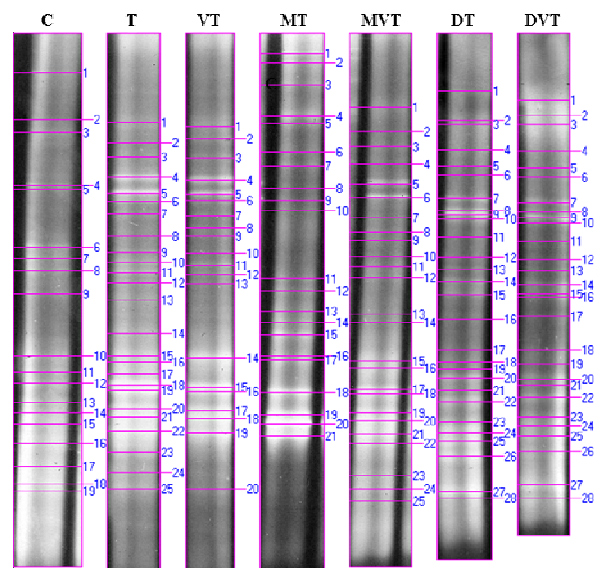


Fig. 1. DGGE profiles from natural (C) and TCE-contaminated soils three months after contamination



than 0.7, allowing the best match found to be associated with a genus name. The sequences consisted of 9, 11, 12, 10, 7, 11, and 10 dominant bands excised from DGGE analyses of the C, T, VT, MT, MVT, DT, and DVT, respectively (Table 4). The retrieved sequences could be attributed to a total of six different bacterial phyla: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, and *Firmicutes*. Within the *Proteobacteria* phyla four subclasses were found: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, and *Deltaproteobacteria*.

Contamination with TCE did not significantly modify the population of *Alphaproteobacteria* of the natural soil; nevertheless VT and DVT introduced a new band affiliated with this subclass. TCE increased from 1 to 4 the number of clones ascribed to *Betaproteobacteria* of the natural soil. The trend was similar for VT and MT, but while the vermicompost did not modify the structure of the bacterial population affiliated with this subclass, *M. sativa* did the opposite. Nevertheless, the combined action of vermicompost and *M. sativa* reserved only one of the clones presented in the above treatments. *D. viscosa* reduced the number of DGGE bands affiliated to the *Betaproteobacteria* by 75% with respect to the T treatment; the new one retrieved clone was also incorporated by *M. sativa*. The DVT treatment eliminated the retrieved clones ascribed to this subclass. No DGGE bands affiliated with *Gammaproteobacteria*

were retrieved in the natural soil and MVT and DVT treatments included one clone ascribed to this subclass. A single member of the subclass *Deltaproteobacteria* was recovered in the natural soil. The clone disappeared due to TCE except when *D. viscosa* was present. In general, TCE increased the genetic diversity inferred by the average sequence divergence  $\theta_{(n)}$  of the sequenced *Proteobacteria* (Table 3), and no important effects due to vermicompost were detected.

Contamination with TCE did not substantially alter the structure of the *Bacteroidetes* phylum of the natural soil. Nevertheless, both plants introduced new clones ascribed to this phylum when alone.

One of the two clones of *Acidobacteria* retrieved in the natural soil disappeared when the soil was artificially contaminated with TCE. The second one also disappeared when *M. sativa* was planted. This plant and the vermicompost, alone or combined, introduced two new clones ascribed to this phylum.

A single clone belonging to *Firmicutes* retrieved in the natural soil disappeared with TCE except when *M. sativa* was present.

Finally, only one DGGE band affiliated with *Gemmatimonadetes* was retrieved, and this happened in the VT treatment.

Eco-physiological indexes are shown in Figure 3. TCE decreased the area of the plot approximately 50% of the natural soil (Table 3). Neither the vermicompost nor the plants alone were able to measurably expand the area of the index. Combination between the vermicompost and *D. viscosa* was the only alternative that increased the area to values up to the uncontaminated soil.

#### 4. Discussion

This study investigates the effectiveness of using enhanced rhizoremediation in removing TCE from an artificially contaminated soil. It is known that the availability of pollutants to microorganisms and enzymes in artificially contaminated soils is quite different from that of historically contaminated sites. Nevertheless, it is also generally assumed that work at the laboratory and pilot scales should be undertaken prior field-scale studies (Semple et al., 2001).

Eco-physiological profiles were also used to evaluate biochemical and microbiological restoration of the TCE-contaminated and planted soils, amended or not with an olive-waste-derived vermicompost. This was achieved by screening the soil- and rhizosphere-community structure via DGGE, bacterial population, and several enzyme activities involved the main nutrient cycles in planted and unplanted soils.

Soil microorganisms respond rapidly to stressors by adjusting (i) activity rates, (ii) biomass, and (iii) community structure. Concretely, trichloroethylene (i) inhibits representative soil enzyme activities involved in the main biochemical cycles, (ii) affects microbial biomass and activity, and (iii) alters the soil structural

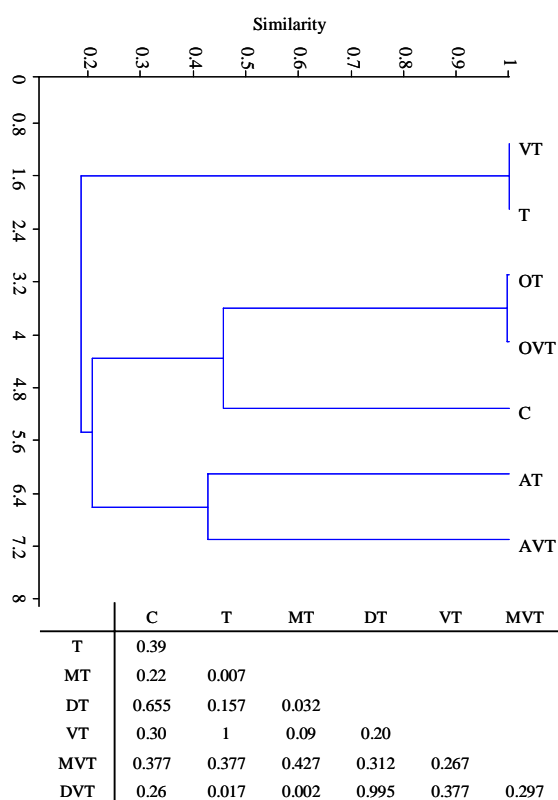


Fig. 2. Raup and Crick probability-based index of similarity cluster analyses and similarity values ( $S_{RC}$ ) for DGGE profiles from natural (C) and TCE-contaminated soils three months after contamination.

Enviado a FEMS Microbial Ecology

Table 4 Nearest match identification of bacterial 16S rRNA gene sequences isolated from natural (C) and TCE-contaminated soils three months after contamination.

GenBank entry	Band number							Taxon/genus	Closest phylogenetic relative; GenBank entry;	CHIMERA-CHECK	
	C	T	MT	DT	VT	MVT	DVT			S_ab	Olis
FJ560502	x							Acidobacteria/genus Gp4	uncultured bacterium; DQ404703	0.928	1457
FJ539023			x					Bacteroidetes/unclassified_Crenotrichaceae	uncultured bacterium; EU133650	0.791	1274
FJ539024			x					Proteobacteria (Beta subclass)/Herbaspirillum	uncultured $\beta$ -proteobacterium; AY133100	0.742	1331
FJ539025			x					Acidobacteria/genus Gp4	uncultured soil bacterium; DQ378239	0.853	1402
FJ539026			x					Proteobacteria (Beta subclass)/unclassified_Comamonadaceae	Ramlibacter sp.; AY429716	0.804	1334
FJ539027	x		x					Firmicutes/Cohnella	uncultured bacterium; EU134631	0.881	1281
FJ539028					x			Gemmatimonadetes/unclassified_Bacteria	uncultured Gemmatimonadetes bacterium; AY921785	0.737	1302
FJ539029		x			x			Proteobacteria (Beta subclass)/Herbaspirillum	Oxalobacteraceae bacterium; AY429715	0.942	1352
FJ539030						x	x	Acidobacteria/genus Gp6	uncultured Acidobacteria bacterium; DQ648906	0.862	1410
FJ539031				x				Bacteroidetes/Chitinophaga	uncultured bacterium; EU133718	0.790	1334
FJ539032					x		x	Proteobacteria (Alpha subclass)/unclassified_Rhizobiales	uncultured soil bacterium; DQ248308	0.810	1373
FJ539033		x			x			Proteobacteria (Beta subclass)/Massilia	Duganella sp.; EF575562	0.961	1420
FJ539034				x				Bacteroidetes/Niastella	uncultured soil bacterium; AY493956	0.847	1379
FJ539035			x	x				Proteobacteria (Beta subclass)/Herbaspirillum	uncultured $\beta$ -proteobacterium; AY133107	0.909	1357
FJ539036		x		x	x		x	Actinobacteria/Rubroacter	uncultured soil bacterium; AY493980	0.972	1381
FJ539037					x			Acidobacteria/genus Gp6	uncultured bacterium; AB186883	0.841	1432
FJ539038						x	x	Proteobacteria (Gamma subclass)/unclassified_ $\gamma$ -proteobacteria	uncultured soil bacterium; AY493939	0.957	1349
FJ539039	x			x			x	Proteobacteria (Delta subclass)/unclassified_Polyangiaceae	uncultured bacterium; EU134473	0.858	1321
FJ539040	x	x	x		x			Bacteroidetes/Niastella	uncultured bacterium; EU133628	0.862	1273
FJ539041	x	x		x		x		Bacteroidetes/Sporocytophaga	uncultured bacterium; EU133643	0.835	1281
FJ539042	x	x		x	x		x	Acidobacteria/genus Gp6	uncultured bacterium; EU132159	0.867	1282
FJ539043		x	x		x	x		Actinobacteria/Propionibacterium	Propionibacterium acnes; AF145256	1.000	1375
FJ539044		x	x		x	x		Proteobacteria (Beta subclass)/unclassified_Oxalobacteraceae	uncultured $\beta$ -proteobacterium; AF529102	0.940	1369
FJ539045		x		x	x		x	Actinobacteria/Rubroacter	uncultured soil bacterium; AY493980	0.836	1381
FJ539046	x		x	x		x	x	Proteobacteria (Alpha subclass)/Rhizobium	Rhizobium sp. MK15; EF173319	0.869	1390
FJ539047				x			x	Actinobacteria/Arthrobacter	Arthrobacter sp.; AY177353	0.973	1289
FJ539048	x	x						Proteobacteria (Beta subclass)/unclassified_Incertae sedis 5	uncultured bacterium; AM157274	0.906	1173
FJ539049	x	x		x	x	x	x	Proteobacteria (Alpha subclass)/unclassified_Rhizobiales	uncultured soil bacterium; DQ248308	0.931	1373

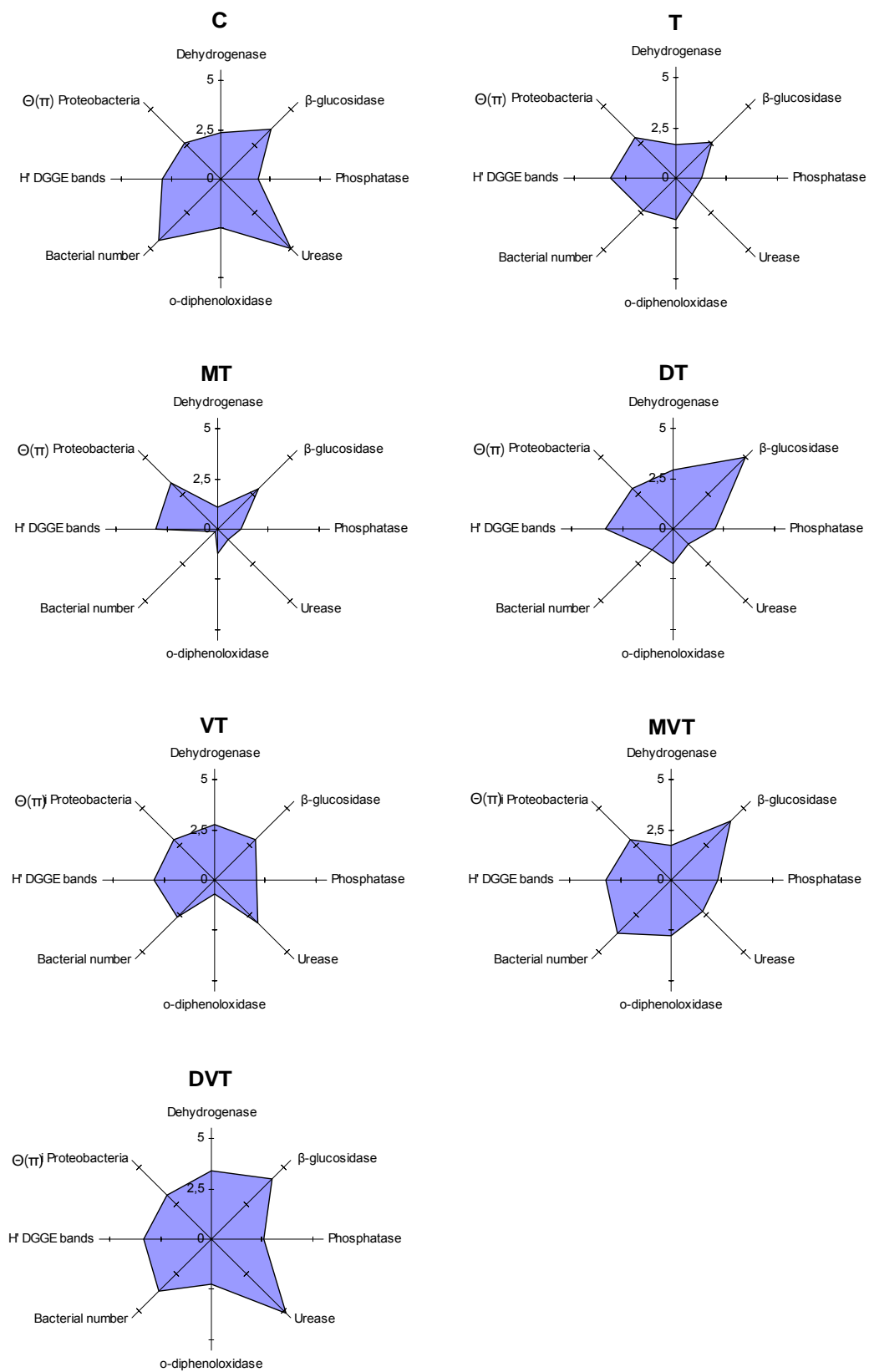


Fig. 3. Eco-physiological indexes of natural (C) and TCE-contaminated soils three months after contamination. Data have been harmonized in order to be assembled in a single plot per treatment.

diversity (Fuller et al., 1997; Moreno et al., 2008). It has been proposed that related microbiological parameters may be combined in sun-ray diagrams to give a comprehensive indicator of soil quality (Anderson, 2003; Schloter et al., 2003). In this study, we designed an eco-physiological profile (presented in the form of a sun ray plot), including the following microbiological estimates: dehydrogenase activity as an indicator of overall microbial activity (Nannipieri et al. 1990), keystones to the soil C cycle as cellulolytic ( $\beta$ -glucosidase) and ligninolytic (diphenol oxidase) activities (Kirk and Farrell 1987; Sinsabaugh 1994), urease and phosphatase activities related to N and P cycles, respectively (Dalal 1977; Nannipieri et al., 1990), bacterial population size (16S rRNA genes), Shannon  $H'$  index of diversity from DGGE banding patterns and, genetic diversity  $\theta(\pi)$  of the sequenced Proteobacteria. Sun-ray plots, in which the shape and the area of the stars allow a visual and statistical comparison of enzyme activities, have been used previously as indicators of microbial functional diversity in soil environments (Dilly and Blume, 1998; Moreno et al., 2009). To construct this eco-physiological index, some bacterial parameters have been added. It is recognized that soil bacteria are essential to functions critical to environmental quality, and that all life forms rely on bacterial processes for their survival (Kennedy, 1999). The most predominant bacterial group in many trichloroethylene-contaminated environments is usually ascribed to the Proteobacteria phylum (Connon et al., 2004; North et al., 2004; Jain et al., 2005). As Gram-negative bacteria, this phylum presents several mechanisms of resistance to organic solvents (Sikkema et al., 1995; Ramos et al. 2002).

Under the environmental conditions of the experiments, the evaporation ratio was quite high, as it was expected for a volatile organic compound. The natural soil displayed a great capacity of removing part of the non-evaporated TCE. Nevertheless, soil quality remained quite poorer after 90 days. Enzyme activities and the bacterial population size declined whereas DGGE-based estimates (bacterial diversity and *Proteobacteria* genetic diversity) increased. Soil contaminated with TCE contained novel dominant members ascribed to Betaproteobacteria (3) and Actinobacteria (3). Members belonging to these phyla have been described as bacteria specific to TCE-contaminated soils (Mera and Iwasaki, 2007).

When the vermicompost from olive wastes was used as an amendment, the TCE degradation rate was similar to those found in the natural soil. The vermicompost displayed no bioremediation capacity previously reported by Moreno et al. (2008), where both the quantity and the way of application were quite different from those of the present study. Despite the assumption that only a small amount of co-substrate is required to support TCE degradation (Fan and Scow, 1993), no extraordinary effects were detected with the amount of vermicompost used in the experiments. Nevertheless, vermicompost was adequate to enhance the soil eco-

physiological profile of the TCE-contaminated soil, mainly by increasing dehydrogenase and phosphatase activity to values close to those of the uncontaminated soil. DGGE-based estimates were also similar to those of unamended TCE-contaminated soil, suggesting that both soils were phylogenetically closer to each other.

The ability of both plants to increase the removal of TCE was notable, especially *D. viscosa*. Previous studies indicate the ability of several plants, including *M. sativa*, to promote the degradation of organic pollutants in the rhizosphere. Roots provide ideal attachment locations, steady redox conditions, nutritional status, soil aeration, and a steady food supply of exudates which increase the interaction between microbes, nutrients, and contaminants. In addition, species-specific properties of the plants (such as the ratio of root biomass to surface area, root depth, or the presence of nitrogen-fixing bacteria and mycorrhizae) are essential factors that affect the microbial community associated with plant roots and then the biodegradation of organic compounds (Walton and Anderson, 1990; Kirk et al., 2005; Renella et al., 2008). The effect of *M. sativa* in promoting remediation of several hydrocarbons in soil has previously been evidenced, leading to the conclusion that plants altered the microbial population in plant-specific changes (Kirk et al., 2005). Soil microbial population size and activity augment under alfalfa roots, contributing to the biodegradation of the contaminants (Fan et al., 2008). In our study, *M. sativa* increased the degradation of TCE with respect to the unplanted soil, but, in disagreement with the above findings, bacterial population size and diversity decreased. The area represented by the sun-ray plot was therefore smaller, suggesting that soil quality was not improved.

In the search for new strategies of phytoremediation, the success of *D. viscosa* in the bioremediation of soils contaminated with heavy metals has been previously evidenced (Murciego et al., 2007; Nogales and Benitez, 2006). *D. viscosa* is a common and ruderal plant widely distributed in the Mediterranean region. No available study has assayed this plant in the remediation of organic pollutants. In this study, *D. viscosa* was the most effective plant in removing almost the totality of the non-evaporated TCE. Enzymes such as dehydrogenase,  $\beta$ -glucosidase, and phosphatase increased under *D. viscosa*, and values close to those of the natural soil were recorded. The bacterial population size and diversity were lower and higher, respectively, than in unplanted TCE-contaminated soil. A lack of a relationship between bacterial number and structural complexity has previously been reported by other authors in hydrocarbon-contaminated soils, suggesting that, in these environments, as bacterial diversity increased, stability of the bacterial community augmented as well (Girvan et al., 2005). As occurred for *M. sativa*, the genetic diversity of *Proteobacteria* was higher than in unplanted and contaminated soil.

Vermicompost limited the ability of the two plants to eliminate TCE, particularly in *M. sativa*, where even

similar degradation rates to those of the unplanted soil were detected. Nevertheless, microbial estimates improved when vermicompost and plants were combined, displaying the highest areas of the eco-physiological indexes. Particularly remarkable was the interaction between vermicompost and *D. viscosa*, the only treatment that improved the biochemical and biological restoration in such a way that an area greater than that of the uncontaminated soil was noticed.

Despite soils with *M. sativa*, with or without vermicompost, clustered together, we cannot affirm that both treatments were similar in terms of bacterial structure. By contrast, soils under *D. viscosa*, with or without vermicompost, displayed a similar DGGE-based bacterial community structure. The DGGE analysis indicated a shift in the bacterial community in all the rhizosphere samples. Notably, uncontaminated soil clustered with those soils where *D. viscosa* was used to encourage the degradation of the TCE.

## 5. Conclusions

The natural soil used in this study presented a high ratio of TCE removal. This contaminant decreased soil biochemical and microbial activity, as well as bacterial biomass. Consequently, soil quality, estimated with eco-physiological profiles, became quite poorer.

Both *Medicago sativa* and *Dittrichia viscosa* enhanced bioremediation of the TCE-contaminated soil. Nevertheless, the former failed to improve the quality of contaminated soil except when combined with vermicompost from olive waste. *Dittrichia viscosa* boosted the quality of the TCE-contaminated soil used alone or mixed with the vermicompost. This latter was the only treatment that improved the overall biochemical and biological estimates to values close to those of the natural soil. In addition, the DGGE-based phylogenetic profiles of these soils were quite closely related. Both findings indicate that *D. viscosa*, together with vermicompost from olive waste, was the most efficient strategy to restore a TCE-contaminated soils under their natural conditions.

In general, no relationship between bacterial phyla and the degradation rates of TCE were found in this work. Nevertheless, TCE induced a shift in the autochthonous bacterial community and, as a result, the bacteria represented by the DGGE bands could be useful as indicators of TCE contamination.

We propose eco-physiological profiles as a valuable index for monitoring the success of a bioremediation scheme, estimating the quality of both contaminated and restored soils.

## Acknowledgements

This work has been financed by the Education and Science Ministry through projects REN2003-05359 and B. Moreno's grant. We would also like to thank C. Cifuentes and F. Calvo for the technical assistance and

David Nesbitt for assisting in the translation of the original manuscript into English.

## References

- Alexander, 1967. Agriculture and the Quality of Our Environment (N.C. Brady, Ed.) pp 331-342. Am. Soc. Adv. Sci. Washington D.C.)
- Anderson, T.H., 2003. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality: Biotic Indicators for Biodiversity and Sustainable Agriculture. Agriculture, Ecosystems and Environment 98(1-3), 285-293.
- Anderson, E.E., Andersen, R.G., 1996. Groundwater pollution primer: soil and groundwater pollution. <<http://cesun1.ce.vt.edu/enviro2/gwprimer.old/tce/tce.html>> Civil Engineering Dept. Virginia Tech. Fall.
- Cébron A., Norini M.P., Beguiristain T., Leyval C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. Journal of Microbiological Methods 73,148-159.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., Tiedje J.M., 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. Nucleic Acids Research 35, 169-172.
- Connon, S.A., Tovanabootr, A., Dolan, M., Vergin, K., Giovannoni, S.J., Semprini L., 2005. Bacterial community composition determined by culture-independent and -dependent methods during propane-stimulated bioremediation in trichloroethene-contaminated groundwater. Environmental Microbiology 7(2), 165-178.
- Dalal, R.C., 1977. Soil organic phosphorus. Advances in Agronomy 29, 83-113.
- Demnerová, K., Mackova, M., Speváková, V., Beranova, K., Kochánková, L., Lovecká, P., Ryslavá, E., Macek, T., 2005. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics—characterization of microbial populations. International Microbiology 8(3), 205-211.
- Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health, in: Pankhurst, C.E., Double, B.M., Gupta, V.V. (Eds.), Biological Indicators of Soil Health. CAB International, Oxon, pp. 121-157.
- Dilly, O., Blume, H.P., 1998. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. Advances in GeoEcology 31, 121-128.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1987. Glucosidases and galactosidases in soils. Soil Biology & Biochemistry 20, 601-606.
- Environmental Protection Agency (EPA), 1997. Technology Transfer Network. Trichloroethylene 79- 01- <<http://www.epa.gov/ttnuatw1/hlthef/tri-ethy.html>>
- Fan, S., Scow, K. M., 1993. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. Applied and Environmental Microbiology 59, 1911-1918.
- Fan, S., Li, P., Gong, Z., Ren, W., He, N., 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Chemosphere 71(8), 1593-1598.
- Fuller, M.E., Scow, K.M., Lau, S., Ferris, H., 1997. Trichloroethylene (TCE) and toluene effects on the structure and function of the soil community. Soil Biology and Biochemistry 29(1), 75-89.

- Futamata, H., Harayama, S., Hiraishi, A., Watanabe, K., 2003. Functional and structural analyses of trichloroethylene-degrading bacterial communities under different phenol-feeding conditions: laboratory experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(5), 594-600.
- Garcia, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., 1994. Biochemical parameters in soils regenerated by addition of organic wastes. *Waste Management and Research* 12, 457-466.
- Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28(1-2), 123-124.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, I., Glover, L.A., 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology* 7(3), 301-313.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hubert ,C., Shen, Y., Voordouw, G., 2005.Changes in soil microbial community composition induced by cometabolism of toluene and trichloroethylene. *Biodegradation* 16(1), 11-22.
- Ibekwe, A.M., Grieve, C.M., 2004. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiology Ecology* 48(2), 239-248.
- Jain, R.K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P.M., Bhattacharya, D., Thakur, I.S., 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science* 89, 101-112
- Joynt, J., Bischoff, M., Turco,R., Konopka, A., Nakatsu; C.H., 2006. Microbial Community Analysis of Soils Contaminated with Lead, Chromium and Petroleum Hydrocarbons. *Microbial Ecology* 51, 209-219.
- Kandeler, E., Tscherko, D., Spiegel, H., 1999. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biology and Fertility of Soils*. 28(4), 343-351.
- Kao, C., Lei, S., 2000. Using a peat biobarrier to remediate PCE/TCE contaminated aquifers. *Water Research* 34, 835-845.
- Kassenga, G. R., Pardue, J. H., Blair, S., Ferraro, T., 2003. Treatment of chlorinated volatile organic compounds in upflow wetland mesocosms. *Ecological Engineering* 19, 305-323.
- Kennedy, A.C., 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74, 65-76
- Kirk, T.K., Farrell, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41, 465-505.
- Kirk, J.L., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* 133(3), 455-465.
- Kiss, S., 2001. Advances in soil enzymology (Parts I-III). *Stud Univ Babeş-Bolyai Biol* 46, 1-48.
- Kozdroj, J., Elsas, J.D., 2001. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Applied Soil Ecology* 17, 31-42.
- Labud, V., Garcia, C., Hernandez, T., 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66(10), 1863-1871.
- Liu, L., Jiang, C.Y., Liu, X.Y., Wu, J.F., Han, J.G, Liu, S.J., 2007. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environmental Microbiology* 9(2), 465-473.
- M.A.P.A., 1986. *Metodos oficiales de analisis*. Tomo III. Plantas, productos organicos, fertilizantes, suelos, agua, fertilizantes organicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, Madrid, 532 pp.
- Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., White, D.C., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3566-3574.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker Jr, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research* 29(1), 173-174.
- Margesin, R., Hämmerle, M., Tscherko, D., 2007. Microbial Activity and Community Composition during Bioremediation of Diesel-Oil-Contaminated Soil: Effects of Hydrocarbon Concentration, Fertilizers, and Incubation Time. *Microbial Ecology* 53(2), 259-269.
- Mera, N., Iwasaki, K., 2007. Use of plate-wash samples to monitor the fates of culturable bacteria in mercury- and trichloroethylene-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77,437-445.
- Moreno, B., Vivas, A., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., Benitez, E. Restoring Biochemical Activity and Bacterial Diversity in a Trichloroethylene-Contaminated Soil: The Reclamation Effect of Vermicomposted Olive Wastes. *Environmental Science & Pollution Reserach Int.* (2008) DOI 10.1007/s11356-008-0035-y.
- Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Cañizares R., Castro, J., Benitez, E., Rainfed olive farming in south-eastern Spain: long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* (2009) DOI 10.1016/j.agee.2009.02.011.
- Murciego, A.M., Sánchez, A.G., González, M.A.R., Gil, E.P., Gordillo, C.T., Fernández, J.C., Triguero, T.B. 2007. Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environmental Pollution* 145(1), 15-21.
- Muyzer G, de Waal EC, and Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3), 695-700.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Sequi, P., 1974. Use of 0.1 M pyrophosphate to extract urease from a podzol. *Soil Biology & Biochemistry* 6, 359-362.
- Nannipieri, P, Greco, S, Ceccanti, B, 1990. Ecological significance of the biological activity in soil, in: Bollag, J.M., Stozky, G, (Eds). *Soil biochemistry*, vol 6. Dekker, New York, pp. 293-355.
- Narayanan, M., Davis, L.C., Erickson, L.E., 1995. Fate of volatile chlorinated organic compounds in a laboratory chamber with alfalfa plants. *Environmental Science and Technology* 29(9), 2437-2444.
- Nichols, T., Wolf, D., Rogers, H., Beyrouy, C., Reynolds, C., 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution* 95(1), 165-178.
- Nielsen, N.M., Winding, A., Binnerup, S., Hansen, B.M., Kroer, N., 2002. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute (NERI). Technical Report No. 388.

- Nogales, R., Benitez, E., 2006. Absorption of Zinc and Lead by *Dittrichia viscosa* Grown in a Contaminated Soil Amended with Olive-Derived Waste. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 538-544.
- North, N.N., Dollhopf, S.L., Petrie, L., Istok, J.D., Balkwill, D. L., Kostkal, J.E., 2004. Change in bacterial community structure during in situ biostimulation of subsurface sediment cocontaminated with uranium and nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4911-4920.
- Perucci, P., Casucci, C., Dumontet, S., 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology & Biochemistry* 32 (13), 1927-1933.
- Quian, H., Hu, B., Cao, D., Chen, W., Xu, X, Lu, Y., 2007. Biosafety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 239-244.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W., Segura, A., 2002. Mechanisms of Solvent Tolerance in Gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology* 56 (1), 743-768.
- Raup, D., Crick, R.E., 1979. Measurement of faunal similarity in paleontology. *Journal of Paleontology* 53, 1213-1227.
- Renella, G., Landi, L., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Pietramellara, G., Mench, M., Nannipieri, P., 2008. Long-term effects of aided phytostabilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environmental Pollution* 152(3), 702-712.
- Rowan, A.K, Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M., 2003. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 43(2), 195-206.
- Ruiz-Jaen, M.C, Aide, T.M., 2005. Restoration Success: How Is It Being Measured? *Restoration Ecology* 13(3), 569-577.
- Saeki, H., Akira, M., Furuhashi, K., Averhoff, B., Gottschalk, G., 1999. Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology* 145, 1721-1730.
- Saul, M.T., 2000. Aerobic Cometabolism of Halogenated Aliphatic Hydrocarbons: A Technology Overview. *Remediation Journal* 11(1), 29-36.
- Schlöter, M., Dilly, O., and Munch, J.C., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98(1-3), 255-262.
- Schneider, S., Kueffer, J., Roessli, D., Excoffier, L., 1997. Arlequin ver. 1.1: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Schwieger, F, Tebbe, C.C., 1998. A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12), 4870-4876.
- Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor T.R., 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112(2), 269-283.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The Mathematical Theory of Communication* The University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59(2), 201-22.
- Sims, J.R. Haby, V.A., 1971. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Science* 112, 137-141.
- Singer, A.C., Crowley, D.E., Thompson, I.P., 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* 21(3), 123-130.
- Sinsabaugh, R.L., 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils*. 17(1), 69-74.
- Soil Survey Staff, 1999: *Soil taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. 2nd ed. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1(4), 301-307.
- Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Benitez, E., 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology* 100, 1319-1326.
- von Mersi, W., Shinner, F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils*. 11(3), 216-220.
- Walton, B T., Anderson, T.A., 1990. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. *Applied and Environmental Microbiology* 56(4), 1012-1016.
- Yang, L., Chang, Y.F., Chou, M.S., 1999. Feasibility of bioremediation of trichloroethylene contaminated sites by nitrifying bacteria through cometabolism with ammonia. *Journal of Hazardous Materials* 69(1), 111-126.
- Yu, Z., Morrison, M., 2004. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8), 4800-4806.



# **DISCUSIÓN GENERAL**

**[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]**





## Discusión General

El 85 % de la producción española de aceite de oliva se concentra en Andalucía. Esta industria genera anualmente una gran cantidad de residuos lo que supone un enorme problema medioambiental para esta región. El alperujo constituye uno de sus principales residuos y entre las vías más conocidas para su estabilización se encuentran el compostaje y el vermicompostaje (Benitez y col., 2004; Albuquerque y col., 2006a; Cayuela y col., 2008a; Plaza y col., 2008). Las propiedades físico-químicas y biológicas de los productos finales obtenidos (compost y vermicompost) van a depender del proceso mediante el cual se haya llevado a cabo la estabilización.

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, el compostaje somete al residuo a un proceso de degradación diferente que el vermicompostaje, promoviendo el desarrollo de comunidades bacterianas diferentes en composts y vermicomposts. En los últimos años el estudio de las comunidades microbianas en estos productos estabilizados ha suscitado un gran interés (Anastasi y col., 2005; Aira y col., 2007b; Lazcano y col., 2008). Sin embargo, la información proporcionada por estos estudios es relevante en lo que a comunidad fúngica se refiere, siendo escasa la aportada al ámbito de la comunidad bacteriana. Las propiedades físico-químicas y bioquímicas de composts o vermicomposts (García y col., 1993; Benitez y col., 2005; Aira y col., 2007a; Cayuela 2008a), así como su estructura y diversidad bacteriana (Fracchia y col., 2006; Yang y col., 2007) han sido evaluadas previamente. Estos estudios enfocan sus análisis sobre un producto u otro, pero hasta la realización de esta tesis doctoral, los estudios destinados a comparar las propiedades bioquímicas y microbiológicas de un compost y un vermicompost obtenidos del mismo material original eran inexistentes.

De este modo, el primer capítulo de esta tesis pretendía caracterizar un alperujo de oliva y el compost y vermicompost obtenidos tras haber sido sometido este residuo a procesos de compostaje y vermicompostaje, respectivamente. Ambos procesos, incrementaban la actividad microbiana y bioquímica del alperujo, así como la diversidad bacteriana este residuo, sin embargo, este aumento fue más relevante para el caso del vermicompostaje (Vivas y col., 2009).

La estimación de la actividad deshidrogenasa, puede considerarse como un indicador de la actividad microbiana total puesto que es una actividad asociada con las células viables (Nannipieri y col., 2002). El alperujo mostraba baja actividad deshidrogenasa, principalmente debido a su alto contenido en polifenoles que ejercen un efecto inhibitorio sobre esta enzima (Benitez y col., 2004; Saavedra y col., 2006). El compostaje y especialmente, el vermicompostaje, incrementaban la actividad deshidrogenasa del alperujo. Este hecho se debe principalmente a la eliminación de polifenoles solubles totales durante el desarrollo de estos procesos (12% en el compostaje y 95% durante el vermicompostaje) (citas; Saavedra y col., 2006).

Las estimaciones de las actividades enzimáticas implicadas en los ciclos de nutrientes del C, N, P así como en la degradación de fenoles ( $\beta$ -glucosidasa, BAA-proteasa, fosfatasa y *o*-difenoloxidasa, respectivamente) varían significativamente entre compost y vermicompost. Este resultado sugiere que la degradación del residuo orgánico se lleva a cabo por vías diferentes dependiendo del proceso de estabilización implicado. Por lo general el vermicompost exhibía mayores actividades hidrolíticas que el compost, ha excepción de la actividad BAA-proteasa, donde tanto el alperujo como el compost mostraban las actividades más altas. Con respecto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa, Aira y col., (2007a) también observaron mayor actividad en el compost procesado con lombrices que en ausencia de las mismas.

## ***Discusión General***

Estos autores señalaron que la actividad  $\beta$ -glucosidasa podía haberse visto estimulada por la acción de las lombrices ya sea porque aumentaba la disponibilidad de sustrato para los microorganismos o porque estimulaba el metabolismo microbiano. Al igual que en la caso anterior, la mayor actividad fosfatasa detectada en el vermicompost podía deberse a que la acción de las lombrices liberaba sustratos fosforados que estimulaban esta actividad. La actividad proteasa depende mucho de la disponibilidad de sustrato (Aira y col., 2007a), y además es un buen indicador del grado de descomposición del residuo. Por lo que, la menor actividad BAA-proteasa detectada en el vermicompost frente al compost indicaría un mayor grado de estabilización del residuo vermicompostado. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martín García y col., (2004), quienes sugirieron que las proteínas presentes en los residuos de la industria del olivar, podían encontrarse asociadas a la fracción lignocelulósica de estos residuos, limitándose su degradación. La acción conjunta de los microorganismos y lombrices durante el vermicompostaje podía facilitar la despolimerización y degradación de los péptidos disponibles en el residuo, lo que explicaría la menor actividad BAA-proteasa detectada en el vermicompost frente al alperujo y al compost.

La comparación de la actividad microbiana y bioquímica exhibida por los diferentes materiales, alperujo, compost y vermicompost, se llevó a cabo mediante una estimación gráfica realizada a partir de diagramas de "rayo de sol" o de "estrella". La variabilidad de la forma de la estrella reflejaba la diversidad o abundancia de los microorganismos implicados, y el área de la estrella estaba asociada con su vitalidad (Bachmann y Kinzel, 1992). Por ello, la forma y el área de los diagramas obtenidos en nuestro estudio nos permitirían ordenar de mayor a menor los materiales utilizados: Vermicompost > Compost > Alperujo, siendo el vermicompost el material con mayor con mayor vitalidad y mayor diversidad o abundancia de microorganismos activos.

Los perfiles obtenidos mediante DGGE fueron utilizados para evaluar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas presentes en alperujo, compost y vermicompost, ya que esta técnica puede ser utilizada como una medida semi-cuantitativa de la diversidad bacteriana (Dilly y col., 2004). De este modo, las bandas mostradas por el DGGE indicaban que el vermicompostaje incrementaba la diversidad bacteriana del alperujo, mientras que el compost mostraba valores similares a los del residuo inicial. Los dendogramas de UPGMA y de Raup y Crick generados a partir de los coeficientes de similitud de Nei y Li (Nei y Li, 1979) y por los índices de similitud de Raup y Crick (Raup y Crick, 1979) respectivamente, agrupaban juntos al alperujo y al compost y por separado al vermicompost, indicando que la estructura de la comunidad bacteriana del compost era más similar a la del residuo sin estabilizar que la del vermicompost. Asimismo, los índices de similitud basados en la probabilidad de Raup y Crick señalaban que la estructura de la comunidad bacteriana del vermicompost era diferente de la que presentaban tanto alperujo como el compost.

Al igual que sucedía con la actividad microbiana y bioquímica, el compostaje y especialmente el vermicompostaje incrementaban la biomasa bacteriana del alperujo. Así, ambos procesos favorecían la actividad microbiana, la actividad bioquímica y la biomasa bacteriana del alperujo, pero el efecto del vermicompostaje fue más significativo. Además, el compostaje no modificaba de forma substancial la diversidad y estructura del residuo sin estabilizar. Aunque este hecho pueda deberse a la metodología del DGGE que sólo revela las poblaciones dominantes (Heuer y col., 2001), no hay que olvidar que el compostaje sólo reducía el contenido en polifenoles solubles en un 12 %, permaneciendo gran cantidad de estos compuestos tóxicos en el compost resultante, los cuales podían ejercer un efecto negativo sobre la comunidad bacteriana de este material.

Considerando los resultados obtenidos en nuestro estudio, ambas técnicas eran efectivas en la estabilización del residuo, sin embargo, el vermicompostaje generaba un producto más "dinámico y vital" que el compostaje, por lo menos en el caso del alperujo, por lo que el vermicompost presentaba mayor actividad microbiana, mayor actividad bioquímica así como mayor biomasa y diversidad bacteriana que el compost. Otros autores también han encontrado mayor actividad y biomasa microbiana en el vermicompost que en el compost de diferentes residuos, y sugerían que este hecho se debía principalmente a la acción estimulante de las lombrices (Aira y col., 2007a; Fracchia y col., 2006).

Los estudios enfocados a examinar las poblaciones bacterianas presentes en composts y vermicomposts son escasos y más aún cuando nos referimos a los subproductos de la industria del olivar. Nuestros resultados revelaron que las proteobacterias fue el grupo bacteriano predominante en los tres materiales analizados. Este hecho guarda relación con lo expuesto por Ntougias y col., (2006), quienes observaron que este grupo bacteriano fue predominante en el alperujo. Sin embargo, estos autores utilizaban un alperujo alcalino (tratado con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) y estimaban su diversidad sobre bacterias cultivables. Estos factores condicionan las especies identificadas, lo que podría explicar la ausencia de miembros afiliados a la sub-clase  $\beta$ -proteobacteria en el alperujo utilizado en este estudio, mientras que en el nuestro esta sub-clase fue la más abundante. Por otro lado, otros autores evidenciaron la abundancia de Proteobacterias en el compostaje de diferentes residuos (Danon y col., 2008), señalando que este grupo de bacterias era el predominante durante todo el proceso de compostaje.

Como ya ha sido señalado en apartados anteriores, la fase termofílica del compostaje condiciona en gran medida las comunidades microbianas desarrolladas en el compost (Klamer y Baath, 1998); lo mismo ocurre con la fase activa del vermicompost donde las lombrices procesan el residuo alterando su composición microbiana (Lores y col., 2006). En nuestro estudio, aun siendo las proteobacterias el grupo más abundante en los tres materiales analizados, los procesos de compostaje y vermicompostaje modificaban las poblaciones bacterianas del residuo inicial, y como era de esperar, las bacterias desarrolladas en el compost y el vermicompost de alperujo variaban en función del tratamiento de estabilización aplicado. De acuerdo con Danon y col., (2008) quienes estudiaron las poblaciones bacterianas predominantes según el estado de maduración de un compost, las poblaciones bacterianas determinadas en nuestro estudio indicaban que el vermicompost de alperujo mostraba grupos de bacterias características de un compost maduro mientras que el compost lo hacía de compost no maduros. Sin embargo, ambos productos presentaban menor número de  $\beta$ -proteobacteria que el alperujo revelando que tanto el compostaje como el vermicompostaje originaban cierto grado de maduración (Danon y col., 2008). Lazcano y col., (2008) evaluaron la estabilización de estiércol de ganado mediante procesos de compostaje y vermicompostaje, y concluyeron que aunque ambos procesos podían ser utilizados, el vermicompostaje lograba obtener un residuo más estabilizado. Similares resultados hemos encontrado en nuestro estudio, donde tanto el compostaje como el vermicompostaje fueron estrategias apropiadas para estabilizar el alperujo de oliva, no obstante, el vermicompost de alperujo mostró mayor actividad microbiana, mayor actividad bioquímica así como mayor biomasa y diversidad bacteriana que el compost (Vivas y col., 2009).

En estos últimos años nuestro grupo de investigación ha estado investigando sobre la revalorización del vermicompost de alperujo como enmienda orgánica para recuperar suelos degradados o contaminados con metales pesados (Benitez y col., 2004; Romero y col., 2005; Nogales y Benitez, 2006). Siguiendo con esta línea de investigación, en esta tesis se pretende evaluar la aplicación de vermicompost de alperujo y/o de especies vegetales con

## ***Discusión General***

potencial fitorremediador para acelerar la biorecuperación de suelos contaminados por tricloroetileno (TCE). Como han confirmado los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis, el vermicompost de alperujo posee elevada actividad microbiana y bioquímica, elevada biomasa bacteriana, y gran biodiversidad bacteriana (Vivas y col., 2009). Otros estudios previos llevados también a cabo por nuestro grupo de investigación han demostrado que el vermicompost de alperujo también posee altos niveles de carbono orgánico disponible y nutrientes, así como actividades hidrolíticas implicadas en la hidrólisis de moléculas de carbono y en la degradación de fenoles (Benitez y col., 2002; Saavedra y col., 2006) que pueden actuar en la degradación de TCE (Nelson y col., 1986). Además, el vermicompost presenta elevada actividad extracelular ligada a su material húmico, la cual puede permanecer activa en el suelo sin ser afectada por las condiciones del medio externo (Benitez y col., 2005). Estas propiedades hacen del vermicompost de alperujo un buen candidato para acelerar la biodegradación del TCE ya que pueden estimular la actividad de los microorganismos autóctonos del suelo contaminado. Esta actividad puede favorecer la biodegradación TCE. Sin embargo, para que esta biodegradación sea efectiva, los microorganismos indígenas del suelo deben ser capaces de resistir el episodio de contaminación (Filip y Demnerova, 2006). Otro factor importante a tener en cuenta es la presencia de bacterias resistentes a altas concentraciones de TCE en el vermicompost de alperujo, ya que estas bacterias podrían mejorar la eficacia de la biodegradación, especialmente cuando las condiciones ambientales de los suelos contaminados son desfavorables para el desarrollo y la actividad de la microflora indígena del suelo. Así, el estudio de bacterias presentes en el vermicompost de alperujo resistentes a elevadas concentraciones de TCE se expone en el segundo capítulo de esta tesis.

Nuestro estudio desveló la presencia de una bacteria cultivable resistente a altas concentraciones de TCE en el vermicompost de alperujo, la cual mostraba alta homología con la especie *Brevibacillus brevis*, una bacteria Gram-positiva. En esta bacteria fue aislado un fragmento de ADN conservado que codificaba para la familia de proteínas RND-HAE1. La presencia de esta familia de proteínas es la responsable de la resistencia a solventes orgánicos en bacterias (Ramos y col., 2002). Las proteínas RND-HAE1 son bombas de expulsión que transportan solventes orgánicos del interior al exterior de la célula (Zgurskaya y Nikaido, 2000) y son exclusivas de bacterias Gram-negativas (Tseng y col., 1999). Aunque en los últimos años se han detectado proteínas homólogas a HAE1 en bacterias Gram-positivas (Saier y col., 2002; Lorca y col., 2007) su función no es conocida. Sin embargo, la región conservada de HAE1 amplificada en el *Brevibacillus brevis* aislado no había sido detectada antes en bacterias Gram-positivas (Meguro y col., 2005).

La región de HAE1 amplificada en *B. brevis* contenía dos dominios conservados que mostraban alta homología con la proteína de membrana interna AcrB de *E. coli*. Estos dominios se encontraban localizados en la membrana interna (dominio AcrB transmembrana) y en el periplasma (dominio AcrB de poro). Puesto que *B. brevis* es una bacteria Gram-positiva, sólo posee una membrana citoplásmica, en la cual se encontrarían localizados estos dos dominios. La proteína AcrB de *E. coli* necesita asociarse con otras proteínas en el periplasma (proteínas de fusión de membrana-AcrA) y en la membrana externa (factor de membrana externo-TolC) para llevar a cabo la expulsión del solvente orgánico (Nikaido, 2000; Nikaido y Zgurskaya, 2001). En las bacterias Gram-negativas, el factor de membrana externo es una proteína esencial que se produzca el transporte (Saier and Paulsen, 2001); las bacterias Gram-positivas carecen de membrana externa y, por lo tanto de factor de membrana externo, por lo que, en ocasiones, son las proteínas de fusión de membrana las que se encargan de llevar a cabo el transporte. Así varios autores han encontrado proteínas de fusión de membrana asociadas a los transportadores de membrana

citoplasmática (ABC y RND) en bacterias Gram-positivas, funcionando como un sistema de transporte de dos componentes (Harley y col., 2000; Zgurskaya y col., 2008).

La proteína HAE1 detectada en el *B. brevis* aislado mostró homología con el transportador citoplasmático AcrB. Hasta el momento se desconoce si esta proteína se basta para expulsar el solvente orgánico, o si necesita estar asociada con una proteína de fusión de membrana para llevar a cabo el transporte. Por ello, serían necesarias más investigaciones dirigidas a conocer con más detalle el funcionamiento de estas proteínas HAE1 en bacterias Gram-positivas y su relevancia con respecto a la expulsión de solventes orgánicos en este tipo de bacterias.

El fragmento de ADN que codificaba para la proteína HAE1 (Meguro y col., 2005) no amplificó en una cepa *Brevibacillus brevis* de colección (no expuesta a TCE). Por otro lado, no se aislaron bacterias resistentes a TCE del alperujo. Estos hechos indican que el *B. brevis* aislado en el vermicompost, adquirió la secuencia durante el proceso de vermicompostaje. Puesto que las proteínas HAE1 son exclusivas de bacterias Gram-negativas, el fragmento de ADN aislado en el *B. brevis* del vermicompost procedería de este tipo de bacterias. La transferencia horizontal de genes (HGT) es un proceso por el cual se produce una transferencia de información genética entre bacterias afectando a la adaptación, especialización y evolución bacteriana (Smets y Barkay, 2005). Aún siendo estructuralmente diferentes, estudios previos han demostrado la transferencia horizontal de genes entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Courvalin, 1994; Pál y col., 2005). Para que este proceso de transferencia horizontal se produzca, las bacterias tienen que entrar en un estado de "competencia", el cual puede ser inducido por diversas alteraciones en su microhábitat (Ej.: alteración en las condiciones de crecimiento, densidad de población, estado de nutrientes (limitante o excesiva)... ) (Lorenz y Wackernagel, 1994; Thomas y Nielsen, 2005). Los intestinos de las lombrices han sido considerados como "Hot Spot" o zonas de intensa actividad biológica donde es susceptible que ocurra la HGT, ya que son zonas ricas en nutrientes donde la estimulación bacteriana y la interacción entre bacterias se ve favorecida (Daane y col., 1996; Thimm y col., 2001). Estos autores detectaron que la actividad de las lombrices influía sobre el grado de transferencia genética entre *Pseudomonas fluorescens* o *E. coli* y las bacterias autóctonas del suelo.

De este modo, y conforme a los resultados obtenidos en este estudio, pensamos que un proceso de transferencia horizontal de genes pudo ocurrir en el interior de *Eisenia fetida* durante el vermicompostaje de alperujo, donde el *Brevibacillus brevis* adquirió un gen que confería resistencia a solventes orgánicos. Bajo condiciones de estrés a TCE, esta bacteria podría expresar el gen adquirido, lo que explicaría la resistencia mostrada por el *B. brevis* aislado a elevadas concentraciones de este contaminante.

Llegados a este punto, las propiedades estudiadas del vermicompost de alperujo nos permiten sugerir a esta enmienda orgánica como un buen candidato para la biorecuperación de suelos contaminados por TCE. Como ya hemos comentado en apartados anteriores, el TCE es un compuesto químicamente estable, por lo que una vez en el suelo, se convierte en un contaminante persistente (Anderson y Andersen, 1996; USEPA, 1996). Asimismo, este TCE puede lixiviarse desde el suelo y contaminar las aguas subterráneas, donde su baja biodegradabilidad hace que pueda permanecer largos períodos de tiempo.

El TCE puede degradarse bajo condiciones aerobias mediante co-metabolismo. Entre los co-sustratos utilizados para favorecer el co-metabolismo de TCE se encuentran los sustratos orgánicos (Kao y Yang, 2000), residuos orgánicos (Kao y col., 2004) e incluso enmiendas orgánicas en forma de compost (Katsenovich y col., 2007). Estos autores observaron una

## ***Discusión General***

eficiente degradación de TCE en aguas subterráneas contaminadas cuando aplicaban un "sistema biobarrera" formado por los co-sustratos mencionados anteriormente. Sin embargo la aplicación de este tipo de sistema en estrategias de recuperación de suelos contaminados por TCE no había sido estudiada hasta ahora.

En el tercer capítulo de la presente tesis, llevamos a cabo un experimento de columnas a escala laboratorio para evaluar el impacto de una contaminación por TCE sobre la microflora del suelo y el efecto que ejercería la aplicación de una "biobarrera" en forma de vermicompost de alperujo sobre este impacto. Los resultados obtenidos indicaron que el TCE afectaba negativamente a la actividad microbiana y a la actividad bioquímica del suelo y producía alteraciones en su estructura bacteriana. La aplicación del sistema biobarrera en forma de vermicompost actuaba de forma "tampón" frente al episodio de contaminación por TCE, reduciendo los lixiviados, amortiguando su efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática del suelo y estimulando la resistencia bacteriana frente a la contaminación por TCE (Moreno y col., 2008).

En nuestro estudio, aproximadamente el 56% y el 43% del TCE añadido se lixiviaba durante el primer mes en las columnas sin y con vermicompost, respectivamente. En general, el sistema "biobarrera" reducía el TCE lixiviado con respecto al sistema en ausencia de "biobarrera", principalmente debido a la adsorción del contaminante por la materia orgánica del vermicompost (Katsenovich y col., 2007). No obstante, el TCE adsorbido en la enmienda orgánica fue posteriormente degradado, puesto que al final del experimento no se detectó TCE en la capa de vermicompost. El efecto del vermicompost también fue importante en el suelo situado sobre la biobarrera, dónde los valores de TCE fueron significativamente inferiores a los del sistema sin enmienda orgánica.

Estudios previos han empleado la estimación de actividades enzimáticas para evaluar el efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre la calidad de los suelos (Trasar-cepeda y col., 2000; Gianfreda y col., 2005; Labud y col., 2007). Estas actividades pueden dar una indicación de la actividad microbiana total (actividad deshidrogenasa), del potencial oxidativo del suelo (actividad *o*-difenoloxidasas) y de los cambios en los principales ciclos bioquímicos (actividades  $\beta$ -glucosidasas, fosfatasa, ureasa y arilsulfatasa). La actividad microbiana y la actividad bioquímica estimadas en nuestro estudio señalaban que el TCE tenía un efecto negativo generalizado sobre todas las actividades enzimáticas estimadas, a excepción de la *o*-difenoloxidasas que no se veía afectada por la contaminación. Los resultados obtenidos también indicaban que el vermicompost atenuaba este efecto negativo, principalmente en la capa de suelo situada bajo la enmienda orgánica.

Aunque los estudios destinados a evaluar el efecto de los hidrocarburos alifáticos sobre la actividad microbiana del suelo son escasos (Li y col., 2005), se sabe que los solventes orgánicos con un coeficiente de partición en *n*-octanol y agua ( $\log k_{ow}$ ) entre 1,5 y 4 son muy tóxicos para los microorganismos ya que pueden entrar por difusión al interior de la célula o acumularse en su membrana citoplasmática produciendo en último término la muerte celular (Ramos y col., 2002). Por lo que la toxicidad del TCE sobre la actividad microbiana podría ser debida a que posee un valor de  $\log k_{ow}$  de 2,42. Estudios previos han observado que los hidrocarburos aromáticos causan un efecto negativo sobre las actividades deshidrogenasa y ureasa de suelos contaminados (Lee y col., 2000; Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2003; Gianfreda y col., 2005). En el presente estudio, donde la contaminación fue producida por hidrocarburos alifáticos, observamos la misma tendencia, siendo la actividad ureasa la más sensible a este tipo de contaminación. El TCE producía una inhibición del orden de 27 veces en el suelo sin enmienda orgánica y el vermicompost amortiguaba esta inhibición principalmente en el suelo situado por debajo de la biobarrera.

Es importante estimar la actividad extracelular de un suelo ya que estas enzimas pueden permanecer activas en el mismo, e iniciar o participar en la descomposición de compuestos orgánicos complejos (Sinsabaugh, 1994). Sin embargo, el TCE también provocaba una inhibición de la actividad  $\beta$ -glucosidasa extracelular (total y específica) en ambos sistemas (sin y con biobarrera orgánica), aunque la inhibición producida en el sistema con vermicompost fue menos notable. Puesto que, el descenso de la actividad enzimática extracelular no venía asociado con un descenso en el contenido de carbono húmico, esta actividad estaba más asociada con el tipo que con la cantidad de carbono húmico (Benitez y col., 2000). La técnica de isoelectroenfoque (IEF) nos permite estudiar la actividad enzimática de los complejos humus-enzimáticos y separar la materia húmica enzimáticamente activa de la no activa en el vermicompost (Benitez y col., 2000b). Esta técnica reveló que la actividad  $\beta$ -glucosidasa extracelular unida a la fracción húmica  $>10^4$  Dalton fue inhibida en las columnas sin biobarrera orgánica, al contrario que en el sistema con vermicompost, donde no sólo no fue inhibida, sino que el suelo situado por encima y por debajo de la enmienda orgánica mostró valores superiores a los del suelo sin contaminar. Esto podría ser debido a la presencia de complejos humus-enzimáticos estables en el vermicompost, que protegen a la enzima de la inhibición (Benitez y col., 2005), los cuales serían introducidos por el vermicompost y/o estimulados en las capas de suelo junto a la enmienda orgánica.

La diversidad estructural es muy sensible a los cambios ambientales y reacciona ante éstos modificando su composición (Kandeler y col., 1999). En nuestro estudio pudimos observar que el TCE causaba importantes modificaciones en la estructura bacteriana del suelo natural tras 90 días de aplicación, como indica el dendograma de UPGMA generado a partir de los perfiles de DGGE obtenidos. La biobarrera formada por vermicompost tendía a impedir el efecto tóxico del TCE, como indicaba la baja homología encontrada entre el suelo contaminado sin biobarrera y el suelo en presencia de vermicompost, especialmente en la capa de suelo situada bajo la enmienda orgánica. Además, el contaminante provocó un aumento de la diversidad bacteriana del suelo natural, que fue importante en el sistema sin vermicompost y en el suelo situado bajo la biobarrera en el sistema con vermicompost. Este hecho coincidía con lo indicado por Van Bruggen y Semenov, (2000), quienes señalaron que una perturbación del suelo conllevará un inicial descenso de la biodiversidad seguido de un aumento de la misma debido a que se logra un nuevo equilibrio dinámico.

Sin embargo, aunque el TCE aumentaba la diversidad bacteriana del suelo natural, tenía un efecto negativo sobre su actividad microbiana y su actividad bioquímica, excepto en el suelo situado por debajo del vermicompost, donde diversidad y actividad se veían estimuladas. Esto puede ser debido a que la técnica del DGGE sólo revela la presencia de poblaciones bacterianas dominantes (Heuer y col., 2001) independientemente de su estado metabólico. Además, este estudio se llevo a cabo utilizando ADN<sub>r</sub>, por lo que los perfiles obtenidos en el DGGE ofrecían una idea de la población bacteriana total sin poder diferenciar entre poblaciones activas y no activas. Por otro lado, la actividad enzimática medida no sólo estimaba la actividad bacteriana, por lo que la inhibición causada por el contaminante podría afectar a otros grupos microbianos más que a las bacterias.

Como hemos comentado en párrafos anteriores, los mecanismos moleculares que confieren resistencia a solventes orgánicos en bacterias (bombas de expulsión RND-HAE1), sólo han sido descritos en Gram-negativas (Tseng y col., 1999; Meguro y col., 2005), lo que explicaría que las alteraciones inducidas por la contaminación por TCE sobre la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. La presencia de este contaminante hacía desaparecer las bandas correspondientes a bacterias Gram-positivas (Actinobacteria) y mantenía o



## ***Discusión General***

estimulaba la aparición de bandas correspondientes a bacterias Gram-negativas (Proteobacteria y Flavobacterium) en los perfiles mostrados por el DGGE. Además, cuando considerábamos el tipo de transportadores RND-HAE1 presentes en los distintos sistemas, pudimos observar que el TCE modificaba la estructura de la comunidad bacteriana del suelo natural, y mantenía o incrementaba el número de clones que codificaban para proteínas RND, excepto para el suelo situado por debajo de la biobarrera. En el sistema con vermicompost aparecían nuevos clones que codificaban para proteínas RND (*Pseudomonas fluorescens* y *Acinetobacter sp.*) indicando, que la aplicación de esta enmienda orgánica estimulaba la resistencia a solventes en la población bacteriana autóctona o introducía nuevas especies capaces de sobrevivir en ambientes contaminados con TCE.

Los resultados obtenidos en este estudio señalan que el vermicompost de alperujo aceleraba la biodegradación del TCE y reducía el impacto negativo de este contaminante sobre la actividad microbiana, la actividad bioquímica y la estructura bacteriana del suelo, beneficios que hacen de la aplicación de esta enmienda orgánica una eficiente estrategia para recuperar suelos contaminados por TCE (Moreno y col., 2008).

Otra estrategia para recuperar suelos contaminados por TCE consistió en el uso de especies vegetales con potencial fitorremediador. El TCE presente en los suelos no suele estar disponible para las plantas, especialmente en aquellos suelos que poseen cantidades significativas de materia orgánica (Cunningham y col. 1996). Por ello, la biodegradación de TCE principalmente se lleva a cabo mediante la acción de los microorganismos presentes en la rizosfera de la planta, proceso conocido como rizorremediación. Las plantas leguminosas son adecuadas para su uso en este proceso gracias a que poseen un sistema radicular muy ramificado, el cual permite albergar un gran número de microorganismos. La alfalfa (*Medicago sativa*) es una de las especies de leguminosas que ha sido exitosa en la rizodegradación de hidrocarburos aromáticos (Nichols y col., 1997; Muratova y col., 2003; Fan y col., 2008) o alifáticos clorados (Narayanan y col., 1995). Por otro lado, la olivarda (*Dittrichia viscosa*) es una planta de la región mediterránea perteneciente a la familia de las compuestas (Compositae), y es especialmente abundante en áreas que han sido modificadas y alteradas por actividades antrópicas. El uso de *Dittrichia viscosa* ha sido exitoso en la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados (Nogales y Benitez, 2006; Murciego y col., 2007), sin embargo, hasta la realización de la presente tesis doctoral, el uso de esta planta para biorremediar contaminantes orgánicos no había sido investigado.

Aunque la biodegradación de TCE ha sido descrita en la rizosfera de diferentes plantas (Walton y Anderson, 1990), los estudios sobre rizorremediación de TCE en suelos son muy escasos. Por ello, el cuarto y último capítulo de esta tesis pretendía evaluar la restauración de suelos contaminados por TCE mediante el uso de alfalfa (*Medicago sativa*) u olivarda (*Dittrichia viscosa*), enmendados o no con vermicompost de alperujo. Los resultados obtenidos revelaron que el suelo enmendado con vermicompost y plantado con *Dittrichia viscosa* fue el único tratamiento que consiguió aumentar la calidad de suelo contaminado hasta valores superiores que los mostrados por el suelo natural (sin contaminar).

Como pudimos observar en el experimento del sistema biobarrera (tercer capítulo), el TCE produce un efecto inhibitorio sobre la actividad microbiana y bioquímica del suelo e induce cambios en su diversidad y estructura bacteriana (Moreno y col., 2008). Así, la estimación de estos parámetros bioquímicos y microbiológicos nos pueden aportar una idea de la calidad del suelo, contaminado (sistema sin vermicompost) o recuperado (sistema con vermicompost).

En el presente estudio, el éxito del proceso de biorrecuperación del suelo contaminado fue estimado mediante el uso de índices eco-fisiológicos en forma de diagramas de "rayo de sol" o de "estrella". Estos diagramas ya fueron utilizados en el primer capítulo de esta tesis para obtener una visión global de la actividad microbiana y bioquímica tanto del alperujo como de su compost y vermicompost (Vivas y col., 2009). No obstante, estos diagramas también han sido utilizados para estimar la diversidad funcional de suelos sometidos a diferentes usos (Dilly y Blume, 1998; Moreno y col., 2009). Puesto que las bacterias del suelo llevan a cabo funciones esenciales para mantener la calidad de un suelo (Kennedy, 1999) y las proteobacterias son el grupo de bacterias predominante en ambientes contaminados con TCE (Connon y col., 2005; North y col., 2004; Jain y col., 2005), estimaciones microbiológicas que hagan referencia a estos parámetros deben ser incluidas en "los diagramas de rayo de sol o de estrella" con el fin de construir índices eco-fisiológicos que sean indicativos de la calidad del suelo. De este modo, los índices eco-fisiológicos estarán integrados por medidas de la actividad deshidrogenasa (como indicador de la actividad microbiana total), actividades hidrolíticas ( $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa y ureasa), actividad o-difenoloxidasas (como indicador de la degradación de compuestos recalcitrantes), biomasa bacteriana, índices de diversidad  $H'$  de Shannon de la población bacteriana y diversidad genética  $\theta(n)$  de la población de Proteobacterias secuenciadas.

Gran parte del TCE añadido a los diferentes tratamientos se perdía por evaporación. No obstante, el suelo natural fue eficiente en la eliminación del porcentaje de TCE se había evaporado. Al igual que en el experimento de las columnas con el sistema biobarrera (Moreno y col., 2008), este contaminante inhibía la actividad microbiana y bioquímica del suelo y estimulaba su diversidad y estructura bacteriana, reduciendo a la mitad la calidad del suelo contaminado con respecto al suelo sin contaminar tal y como indicaba el área del índice eco-fisiológico.

A diferencia de los resultados obtenidos por Moreno y col., (2008) en el tercer capítulo de la presente tesis, en este estudio el vermicompost no aumentaba la eliminación de TCE de forma significativa con respecto al suelo contaminado sin enmendar. Este hecho se debe fundamentalmente a que la forma de aplicación y la cantidad de vermicompost empleada en este estudio fue muy diferente al del caso anterior. Además, aunque algunos autores han señalado que solamente se necesita una pequeña cantidad de co-sustrato para que se lleve a cabo el co-metabolismo de TCE (Fan and Scow, 1993), la cantidad de vermicompost utilizada para enmendar las macetas no fue suficiente para observar un efecto estimulante en la degradación de este contaminante. Las estimaciones basadas en los perfiles obtenidos por DGGE (diversidad genética  $\theta(n)$  de la población de Proteobacterias secuenciadas e índices de similitud basados en la probabilidad de Raup y Crick) indicaban que la estructura y diversidad de la población bacteriana del suelo contaminado y del suelo contaminado y enmendado eran muy similares. Sin embargo, este último era capaz de aumentar la calidad del suelo contaminado, principalmente gracias a que estimulaba su actividades deshidrogenasa y fosfatasa.

La alfalfa (*Medicago sativa*) y especialmente la olivarda (*Dittrichia viscosa*) favorecieron la eliminación del TCE en el suelo. Estudios previos han descrito que la alfalfa promueve la degradación de hidrocarburos en la rizosfera (Narayanan y col., 1995; Demnerová y col., 2005; Fan y col., 2008). Kirk y col., (2005) observaron que la población bacteriana desarrollada en la rizosfera de las plantas variaba en función de la especie de planta. Fan y col., (2008) detectaron una estimulación en la densidad y actividad de la población bacteriana en la rizosfera de alfalfa que contribuía a la biodegradación de los contaminantes. Sin embargo, aunque nuestros resultados reflejaban un aumento en la eliminación del TCE en el suelo contaminado plantado con alfalfa, su densidad y diversidad bacterianas no se

## ***Discusión General***

vieron incrementadas excepto para el caso de la diversidad genética de Proteobacteria donde ambos tratamientos, con alfalfa u olivarda, exhibieron un valor superior al del suelo contaminado. Por otro lado, el área del índice eco-fisiológico del tratamiento con alfalfa fue inferior al del suelo contaminado, sugiriendo que este tratamiento no promovía una mejora en la calidad del suelo contaminado.

El tratamiento con olivarda fue el único que consiguió eliminar totalmente el TCE del suelo contaminado. Esta planta incrementaba la actividad microbiana total (actividad deshidrogenasa) y algunas actividades hidrolíticas ( $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa) hasta valores cercanos a los mostrados por el suelo sin contaminar. Sin embargo, exhibía una densidad bacteriana más baja y una biodiversidad bacteriana más alta que el suelo sin contaminar, por lo que fue imposible establecer una relación entre estos dos parámetros. Similares resultados fueron descritos por Girvan y col., (2005) quienes sugirieron que en suelos contaminados por hidrocarburos, un aumento de la biodiversidad bacteriana implicaba un aumento en la estabilidad de la comunidad bacteriana. Asimismo, Avidano y col., (2005) observaron que la presencia de diferentes contaminantes no influían sobre la densidad bacteriana del suelo pero sí inducían cambios en la estructura de su comunidad bacteriana. De todas formas, los tratamientos en presencia de *Dittrichia viscosa* aumentaban la calidad del suelo contaminado.

Cuando la alfalfa u olivarda eran aplicadas en suelos enmendados con vermicompost de alperujo, se limitaba en gran medida la capacidad de eliminar TCE del suelo contaminado, siendo esta limitación muy severa para el caso de la alfalfa. No obstante, las áreas de los índices ecofisiológicos indicaban que la interacción entre enmienda orgánica y planta mejoraba la calidad del suelo contaminado con TCE. El tratamiento que combinaba la olivarda y el vermicompost fue el más efectivo en la recuperación bioquímica y biológica del suelo contaminado, mostrando un área incluso superior que el suelo sin contaminar.

El dendograma creado a partir de los índices de similitud basados en la probabilidad de Raup y Crick, señalaba que la estructura de la comunidad bacteriana se diferenciaba y agrupaba en función de la especie de planta. Los tratamientos con olivarda exhibían una estructura de la comunidad bacteriana similar, independientemente de la presencia de vermicompost. El suelo natural (sin contaminar) se agrupaba con los tratamientos con olivarda, lo que indicaba que la estructura de la comunidad bacteriana desarrollada en estos tratamientos tenía similitud con la del suelo natural. Estos resultados guardan relación con lo comentado en el párrafo anterior, donde se manifestaba la efectividad de la interacción entre olivarda y vermicompost como estrategia para recuperar bioquímica y biológicamente suelos contaminados por TCE.

En este estudio no observamos una relación clara entre grupos de bacterias secuenciados y grado de degradación de TCE. Sin embargo, al igual que ocurría en el experimento del sistema biobarrera, el TCE provocaba alteraciones en la comunidad bacteriana del suelo. Por lo que el análisis de los perfiles obtenidos mediante DGGE podrían ser utilizados como indicadores de la contaminación por este solvente orgánico. Asimismo, los índices eco-fisiológicos utilizados en este estudio, los cuales estaban constituidos por estimaciones bioquímicas y microbiológicas, podrían ser buenos indicadores del impacto de un episodio de contaminación así como del éxito de una estrategia de recuperación del suelo contaminado, mediante la estimación de la calidad de ambos suelos, contaminados y restaurados.

En esta tesis hemos observado que la aplicación de vermicompost de alperujo en forma de biobarrera orgánica o la aplicación de esta enmienda orgánica en combinación con

olivarda (*Dittrichia viscosa*), son estrategias exitosas para recuperar suelos contaminados por TCE.

Es importante comentar que, aunque las actividades microbianas y bioquímicas nos dan una idea de los procesos que están teniendo lugar en un proceso de biorremediación (Taylor y col., 2002), es muy enriquecedor complementar estas medidas con estimaciones microbiológicas (biomasa, diversidad y estructura bacteriana) obtenidas mediante técnicas de biología molecular (PCR cuantitativa, DGGE y SSCP) ya que la combinación de todas ellas nos permiten tener una idea más amplia y completa de los cambios que se producen en un suelo tras un episodio de contaminación o durante un proceso de biorremediación como confirman los resultados obtenidos en la presente tesis. De este modo, la combinación de estimaciones bioquímicas y microbiológicas en forma de diagramas de "rayo de sol" o de "estrella" son propuestos como bioindicadores apropiados para evaluar la calidad de suelos tanto contaminados como recuperados.



# **CONCLUSIONES**

**[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]**



## Conclusiones

- La caracterización del compost y vermicompost derivados del alperujo demostró que ambas tecnologías de reciclaje (compostaje y vermicompostaje) son adecuadas para llevar a cabo la estabilización de los residuos procedentes de la industria del olivar. No obstante, el vermicompostaje daba lugar a un producto final con mayor actividad microbiana y bioquímica y mayor biomasa y diversidad bacteriana, y por lo tanto, más vital.
- EL compostaje y el vermicompostaje modificaban la estructura de la comunidad bacteriana del residuo original de manera diversa, indicando que estos procesos llevan a cabo la descomposición del residuo orgánico por diferentes vías.
- Una bacteria cultivable gram-positiva resistente a TCE que guardaba alta homología con *Brevibacillus brevis* fue aislada en el vermicompost de alperujo. Una región de ADN que codificaba para las bombas de expulsión RND-HAE1 (exclusivas de bacterias gram-negativas), las cuales confieren resistencia a solventes orgánicos, ha sido amplificada en la bacteria aislada.
- El hecho de que no se aislaran bacterias resistentes a TCE en el alperujo sin estabilizar sugiere que un proceso de transferencia horizontal de genes desde bacterias Gram-negativas al *B. brevis* aislado haya podido ocurrir durante el proceso de vermicompostaje.
- El TCE ejerce un efecto tóxico sobre la actividad microbiana y bioquímica del suelo. La aplicación de vermicompost en forma de "sistema biobarrera" atenúa el efecto inhibitorio de este contaminante.
- Las técnicas de DGGE y SSCP indicaban que el TCE provocaba modificaciones en la diversidad y estructura de la comunidad bacteriana del suelo, así como en los transportadores RND-HAE1 detectados en el suelo contaminado. Por otro lado, el vermicompost estimulaba la expresión de mecanismos resistentes a solventes orgánicos en la comunidad bacteriana autóctona o introducía nuevas especies capaces de sobrevivir en ambientes contaminados por TCE.
- La aplicación de alfalfa (*Medicago sativa* L) u olivarda (*Dittrichia viscosa* L) mejoraban la calidad de un suelo contaminado por TCE, no obstante, la aplicación conjunta de olivarda y vermicompost de alperujo fue el único tratamiento capaz de recuperar las propiedades bioquímicas y microbiológicas del suelo contaminado por TCE hasta valores próximos a los mostrados por el suelo sin contaminar
- El análisis de DGGE agrupó el tratamiento de olivarda con vermicompost con el suelo natural. De este modo, los resultados obtenidos sugieren la aplicación de olivarda en combinación con vermicompost de alperujo como una buena estrategia para recuperar suelos contaminados por TCE.
- En la presente tesis doctoral hemos encontrado que la aplicación combinada de estimaciones bioquímicas y moleculares, sólo o en forma de diagramas de "rayos de sol" o de "estrella" son buenos indicadores para evaluar la estabilización de un residuo tóxico, el impacto de un contaminante sobre el suelo e incluso el éxito de un proceso de biorremediación.







# **BIBLIOGRAFIA**

**[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]**



## **Bibliografía**

- Adam G. and Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33(7-8), 943-951. 2001.
- Aira M, Monroy F., and Domínguez J. Effects of two species of earthworms (*Allolobophora* spp.) on soil systems: a microfaunal and biochemical analysis. *Pedobiologia* 47(5-6), 877-881. 2004.
- Aira M, Monroy F, and Domínguez J. Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. *Science of the Total Environment* 385(1-3), 252-261. 2007.
- Aira M., Monroy F., and Domínguez J. *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) Modifies the Structure and Physiological Capabilities of Microbial Communities Improving Carbon Mineralization During Vermicomposting of Pig Manure. 54(4), 662-671. 2007 .
- Alba, J. (1998). Elaboración del aceite de oliva. Barranco, D., Fernandez-Escobar, R. and Rallo, L. (Eds). En *El cultivo del olivar*. Junta de Andalucía-Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 517-545.
- Alburquerque J., González J, Tortosa G, Baddi G, and Cegarra J. Evaluation of "alperujo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation* 20(2), 257-270. 2009.
- Alburquerque J.A., González J., García D., and Cegarra J. Effects of a compost made from the solid by-product ("alperujo") of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bioresource Technology* 98(4), 940-945. 2007.
- Alburquerque J.A., González J., García D., and Cegarra J. Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* 64(3), 470-477. 2006.
- Alburquerque J.A., González J., García D., and Cegarra J. Composting of a solid olive-mill by-product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Management* 26(6), 620-626. 2006 .
- Alburquerque JA., González J., García D., and Cegarra J. Effects of bulking agent on the composting of "alperujo", the solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Process Biochemistry* 41(1), 127-132. 2006i.
- Alburquerque JA, González J., García D., and Cegarra J. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* 91(2 ), 195-200. 2004.
- Alef K. and Nannipieri P. Enzyme Activities. In: P. Nannipieri and K. Alef, Editors, *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press Limited, San Diego, CA , 311-373. 95.
- Anastasi A, Varese G.C., and Filipello Marchisio V. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia* 97(1), 33-44. 2005.
- Anderson JPE. Soil respiration. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Chemical and Microbiological Properties. Part 2*, 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI, 831-871. 82.

## **Bibliografía**

- Anderson, E. y Andersen, R. (1996). Groundwater pollution primer: soil and groundwater pollution. <<http://cesun1.ce.vt.edu/enviro2/gwprimer.old/tce/tce.html>> Civil Engineering Dept. Virginia Tech.
- Anderson JPE. and Domsch KH. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10(3), 215-221. 78.
- Anderson TA. , Guthrie EA., and Walton BT. Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environmental Science and Technology* 27(13), 2630-2636. 93.
- Anderson TA and Walton BT. Comparative fate of [<sup>14</sup>C]trichloroethylene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 2041-2047. 95.
- Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M, and Gianfreda L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57(5), 401-412. 2004.
- AOAC (1984). Official methods of analysis. 14<sup>th</sup> edition. Williams, S. (Ed), 40 pp. association of official analytical chemists. Arlinton, VI.
- Aranda E., Barois I., Arellano P., Irisson S., Salazar T., Rodriguez J., and Patron JC. Vermicomposting in the tropics. P. Lavelle, L. Brussaard and P. Hendrix, Editors, *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*, CAB International Publishing, New York , 285-287. 99.
- Aranda E., Sampedro I., Ocampo JA, and García-Romera I. Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth: 13th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium: State-of-the-Art in Biodeterioration, Biodegradation, and Bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 58(3-4), 176-179. 2006.
- Arjona R., Ollero P., and Vidal F. Automation of an olive waste industrial rotary dryer. *Journal of Food Engineering* 68(2), 239-247. 2005.
- Arp DJ, Yeager CM, and Hyman MR. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation* 12(2), 81-103. 2001.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. Toxicological Profile for Trichloroethylene. U.S. Department of Health & Human Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp19-c3.pdf>
- Avidano L, Gamalero E, Cossa GP, and Carraro E. Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Applied Soil Ecology* 30(1), 21-33. 2005.
- Azbar N., Bayram A., Filibely A., Muezzinoglu A., Sengul F., and Ozer A. A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34, 209-247. 2004.
- Bachmann G. and Kinzel H. Physiological and ecological aspects of the interactions between plant roots and rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry* 24(6), 543-552. 92.
- Bakken LR. Culturable and nonculturable bacteria in soil. In: *Modern Soil Microbiology* (eds J.D. van Elsas, J.T. Trevors & E.M.H. Wellington), Marcel Dekker, New York. 47-61. 97.
- Bastias BA, Huang ZQ, Blumfield T, Xu Z, and Cairney JWG. Influence of repeated prescribed burning on the soil fungal community in an eastern Australian wet sclerophyll forest. *Soil Biology and Biochemistry* 38(12), 3492-3501. 2006.

- Benitez E., Melgar R., and Nogales R. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 36(10), 1615-1623. 2004.
- Benítez E., Melgar R., Sainz H., Gómez M., and Nogales R. Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum*, L.) grown with olive cake mulches. *Soil Biology and Biochemistry* 32(13), 1829-1835. 2000.
- Benitez E, Nogales R, Elvira C, Masciandaro G, and Ceccanti B. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* 67(3), 297-303. 99.
- Benitez E, Nogales R, Masciandaro G, and Ceccanti B. Isolation by isoelectric focusing of humic-urease complexes from earthworm (*Eisenia fetida*)-processed sewage sludges. *Biology and Fertility of Soils*. 31(6), 489-493. 2000 .
- Benitez E, Sainz H, Melgar R, and Nogales R. Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: A pilot scale study. *Waste management and research* 20(2), 134. 2002.
- Benitez E, Sainz H, and Nogales R. Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Bioresource Technology* 96(7), 785-790. 2005.
- Bielefeldt AR., Stensel HD., and Strand SE. Cometabolic Degradation of TCE and DCE without Intermediate Toxicity. *Journal of Environmental Engineering*. 121, 791-797. 95.
- Borja R., Alba J., Martín A., Ruiz A. y Hidalgo F. (1993). Caracterización y digestión anaerobia de las aguas de lavado del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, 44(2), 85-90
- Borja R., Rincón B., Raposo F., Alba J., and Martín A. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste. *Biochemical Engineering Journal* 15(2), 139-145. 2003.
- Borneman J. and Triplett EW. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63(7), 2647-2653. 97.
- Brewer LJ. and Sullivan DM. Maturity and Stability Evaluation of Composted Yard Trimmings. *Compost Science & Utilization* 11(2), 96-112. 2003.
- Brohon B., Delolme C., and Gourdon R. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry* 33(7-8), 883-891. 2001.
- Broos K., Mertens J., and Smolders E. Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soil microbial and plant growth assays: a comparative study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(3), 634-640. 2005.
- Burns RG. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14(5), 423-427. 82.
- Canet R., Pomares F., Cabot B., Chaves C., Ferrer E., Ribó M., and Albiach M.R. Composting olive mill pomace and other residues from rural southeastern Spain: Pay-as-you-throw: a tool for urban waste management. *Waste Management* 28(12), 2585-2592. 2008.
- Cayuela M.L. , Mondini C., Sánchez-Monedero M.A., and Roig, A. Chemical properties and hydrolytic enzyme activities for the characterisation of two-phase olive mill wastes composting. *Bioresource Technology* 99(10), 4255-4262. 2008.

## **Bibliografía**

- Cayuela ML., Bernal MP., and Roig A. Composting olive mill wastes and sheep manure for orchard use. *Compost Science and Utilization* 12(2), 130-136. 2004.
- Ceccanti B., Masciandaro G., Garcia C., Macci C., and Doni S. Soil Bioremediation: Combination of Earthworms and Compost for the Ecological Remediation of a Hydrocarbon Polluted Soil. *Water, Air and Soil Pollution* 177(1), 383-397. 2006.
- CEPA (Canadian Environmental Act), 1993. Priority Substances List Assessment Report: Trichloroethylene. Environment Canada, Health Canada.
- Chekol T and Vough LR. A Study of the Use of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) for the Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil. *Remediation Journal* 11(4), 89-101. 2001.
- C.I.I. (1969) Métodos de referencia para la determinación de elementos minerales en vegetales. *Anal. Edaf. Agrobiol.* 28, 409-430.
- Connon S.A., Tovanabootr A., Dolan M., Vergin K., Giovannoni S.J., and Semprini L. Bacterial community composition determined by culture-independent and -dependent methods during propane-stimulated bioremediation in trichloroethene-contaminated groundwater. *Environmental Microbiology* 7(2), 165-178. 2005.
- Contreras-Ramos SM., Álvarez-Bernal D., and Dendooven L. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*). *Soil Biology and Biochemistry* 40(7), 1954-1959. 2008.
- Cooperband LR., Stone AG., Fryda MR., and Ravet JL. Relating compost measures of stability and maturity to plant growth. *Compost science & utilization* 11(2), 113-124. 2003.
- Courvalin P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(7), 1447-1451. 94.
- Cronan JE. Phospholipid modifications in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 5(2), 202-205. 2002.
- Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP, and Hsu FC. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in agronomy* 56, 55 . 96.
- Daane LL, Molina JA, Berry EC, and Sadowsky MJ. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62(2), 515-521. 96.
- Dalal RC. Soil microbial biomass; what do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38(7), 649-665. 98.
- Dalton H. and Stirling DI. Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 297, 481-496. 82.
- Danon M., Franke-Whittle I.H., Insam H., Chen Y., and Hadar Y. Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *FEMS Microbiology Ecology* 65, 133-144. 2008.
- Dawson JJC, Godsiffe EJ, Thompson IP, Ralebitso-Senior TK, Killham KS, and Paton GI. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39(1), 164-177. 2007.
- De Bertoldi M. The control of the composting process and quality of end products. D.V. Jackson, J.M. Merillot and P. L'Hermite, Editors, *Composting and Compost Quality Assurance Criteria*, Commission of the European Communities , 85-93. 92.

- de Bont JAM. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis . Trends in Biotechnology 16(12), 493-499. 98.
- Delgado-Moreno L. and Peña Aránzazu. Compost and vermicompost of olive cake to bioremediate triazines-contaminated soil. Science of The Total Environment In Press, Corrected Proof. 2008.
- Demnerová K, Mackova M, Speváková V, Beranova K, Kochánková L, Lovecká P, Ryslavá E, and Macek1 T. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics—characterization of microbial populations. International Microbiology 8(3), 205-211. 2005.
- Dilly O, Bloem J, Vos A, and Munch JC. Bacterial Diversity in Agricultural Soils during Litter Decomposition. Applied and Environmental Microbiology 70(1), 468-474. 2004.
- Dilly O. and Blume HP. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. Advances in Geocology 31, 29-36. 98.
- Dinh T., Paulsen IT., and Saier MH Jr. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology 176(13), 3825-3831. 94.
- Domínguez, J. (1996). Estudio y comparación de los procesos de compostaje y vermicompostaje. Aplicación práctica al tratamiento de purines de cerdo. Tesis Doctoral de la Universidad de Vigo. Director: Dr. S. Mato.
- Domínguez J. , Edwards CA., and Subler S. A comparison of vermicomposting and composting. Biocycle 38(4), 57-59. 97.
- Domínguez J. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. C.A. Edwards, Editor, *Earthworm Ecology, second edition*, CRC Press, Boca Raton, FL , 401-424. 2004.
- Domínguez J. and Edwards CA. Effects of stocking rate and moisture content on the growth and maturation of *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in pig manure: 5th International Symposium on Earthworm Ecology. Soil Biology and Biochemistry 29(3-4), 743-746. 97.
66. Doran JW. and Safley M. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), Biological Indicators of Soil Health. CAB International, Oxon, 1-28. 97.
- Doran JW. and Zeiss MR. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Applied Soil Ecology 15(1), 3-11. 2000.
- Doube BM. and Brown GG. Life in a complex community: functional interactions between earthworms, organic matter, microorganisms, and plant growth. C.A. Edwards, Editors, *Earthworm ecology*, St. Lucie Press, Boca Raton , 179-211. 98.
- Edwards CA. Breakdown of animal, vegetable, and industrial organic wastes by earthworms. Earthworms in Waste and in Environment. SPB Academic Publishing, P.O. Box 97747, 2509 GC The Hague, The Netherlands, 21-31. 88.
- Edwards CA. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. European Journal of Soil Biology 38(3-4), 225-231. 2002.
- Edwards CA. Earthworm ecology, 2nd ed. St. Lucie Press/CRC Press, Boca Raton, Fla. 2004.
- Edwards CA. and Burrows I. The potential of earthworm composts as plant growth media. C.A. Edwards and E. Neuhauser, Editors, Earthworms in Waste and Environmental Management, SPB Academic Press, The Hague, The Netherlands , 21-32. 88.



## **Bibliografía**

- Eibes G., Cajthaml T., Moreira MT., Feijoo G., and Lema JM. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64(3), 408-414. 2006.
- Elliott ET. The potential use of soil biotic activity as an indicator of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) *Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Melbourne , 250-256. 94.
- Elvira C., Sampedro L., Benítez E., and Nogales R. Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: A pilot-scale study. *Bioresource Technology* 63(3), 205-211. 98.
- Fan S., Li P., Gong Z., Ren W., and He N. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere* 71(8), 1593-1598. 2008.
- Fernandes P, Ferreira BS, and Cabral JMS. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22(3), 211-216. 2003.
- Fernández-Bayo J.D., Nogales, R. and Romero, E. 2007. Improvement of Imidacloprid (Confidor®) soil-sorption capacity by the addition of vermicompost from spent grape marc. *The Science of Total Environment*, 378: 95-100.
- Fernández-Bayo Jesus D., Romero E., Schnitzler, F. and Burauel, P. 2008 Assesment of pesticide availability in soil fractions after the incorporation of winery-distillery vermicomposts. *Environmental Pollution*, 154, 330\_337
- Filip Z. and Demnerova K. Microbial resistance to chemical contaminants-an essential precondition of natural attenuation in groundwater aquifer. *Management of Intentional and Accidental Water Pollution*. Springer, The Netherlands, 113-127. 2006.
- Ford CZ., Saylor GS., and Burlage RS. Containment of a genetically engineered microorganism during a field bioremediation application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(3), 397-400. 99.
- Fox BG., Borneman JG., Wackett LP., and Lipscomb JD. Haloalkene Oxidation by the Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: Mechanistic and Environmental Implicationst. *Biochemistry* 29(27), 6419-6427. 90.
- Fracchia L., Dohrmann A, Martinotti M, and Tebbe C. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(6), 942-952. 2006.
- Frostegard A. and Baath E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*. 22( 1), 59-65. 96.
- Fuller ME, Scow KM, Lau S, and Ferris H. Trichloroethylene (TCE) and toluene effects on the structure and function of the soil community. *Soil Biology and Biochemistry* 29(1), 75-89. 97.
- Futamata H, Harayama S, Hiraishi A, and Watanabe K. Functional and structural analyses of trichloroethylene-degrading bacterial communities under different phenol-feeding conditions: laboratory experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(5), 594-600. 2003.
- Gajalakshmi S. and Abbasi SA. Effect of the application of water hyacinth compost/vermicompost on the growth and flowering of *Crossandra undulataefolia*, and on several vegetables. *Bioresource Technology* 85(2), 197-199. 2002.
- Gallardo-Lara, F; Azcón, M. y Polo, A. (2000). Phytoavailability and extractability of potassium, magnesium and manganese in calcareous soil amended with olive oil wastewater. *Journal*

*Environmental Science Health*, B35, 623-643

- García Ortiz, A. y Frías Ruiz L. (1994). El alpechín y los orujos húmedos. Sus posibles usos. *Agricultura*, 746, 815-819
- García C, Hernández T, Costa C, Ceccanti B, Masciandaro G, and Ciardi C. A study of biochemical parameters of composted and fresh municipal wastes. *Bioresource Technology* 44(1), 17-23. 93.
- García C., Hernández T., Costa F., and Ceccanti B. Biochemical parameters in soils regenerated by addition of organic wastes. *Waste Management and Research* 12, 457-466. 94.
- Garg P., Gupta A., and Satya S. Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. *Bioresource Technology* 97(3), 391-395. 2006.
- Garland JL. and Mills AL. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8), 2351-2359. 91.
- Gates DD. and Siegrist RL. In-situ chemical oxidation of trichloroethylene using hydrogen peroxide. *Journal of Environmental Engineering* 121(9), 639-644. 95.
- Gerritse J., Drzyzga O., Kloetstra G., Keijmel M., Wiersum LP., Hutson R., Collins MD., and Gottschal JC. Influence of Different Electron Donors and Acceptors on Dehalorespiration of Tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12), 5212-5221. 99.
- Gianfreda L. and Bollag JM. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: Stotzky G, Bollag JM, editors. *Soil Biochemistry*, vol. 9. New York: Marcel Dekker; 123-194. 96.
- Gianfreda L, Rao MA, Piotrowska A, Palumbo G, and Colombo C. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: Intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment* 341(1-3), 265-279. 2005.
- Gomes NCM, Heuer H, Schönfeld J, Costa R, Mendonça-Hagler L, and Smalla K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil* 232(1), 167-180. 2001.
- Gordon M., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Heilman P., Muiznieks I., Ruzaj M., Shurtleff BB., Strand S., Wilmoth J., and Newman LA. Phytoremediation of Trichloroethylene with Hybrid Poplars. *Environmental Health Perspectives* 106(4), 1001-1004. 98.
- Grathwohl P. and Reinhard P. Desorption of trichloroethylene in aquifer material: rate limitations at the grain scale. *Environmental Science and Technology* 27( 12), 2360-2366. 93.
- Gupta R. and Garg V.K. Stabilization of primary sewage sludge during vermicomposting. *Journal of Hazardous Materials* 153(3), 1023-1030. 2008.
- Haddadin MS. , Abdulrahim SM., Al-Khawaldeh GY., and Robinson RK. Solid state fermentation of waste pomace from olive processing. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 74(7), 613-618. 99.
- Hall, J.E., Bland, R., y Neale, E. (1986). Vermistabilization of sewage sludge in the UK. En: *Compost: production Quality and Use*. London. pp. 792-797
- Hanson RS. and Brusseau GA. Biodegradation of low-molecular weight halogenated compounds by aerobic bacteria. In: *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals* (Ed. Chaudry, G.R.). Dioscorides Press, Portland, Oregon, 227-297. 94.

## **Bibliografía**

- Harkness MR., Bracco AA., Brennan MJ., DeWeerd KA., and Spivack JL. Use of bioaugmentation to stimulate complete reductive dechlorination of trichloroethene in Dover soil columns. *Environmental Science and Technology* 33 , 1100-1109. 99.
- Haro M-A. and de Lorenzo V. Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene: Twenty years of the European Federation of Biotechnology. *Journal of Biotechnology* 85(2), 103-113. 2001.
- Harris JA. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European Journal of Soil Science* 54(4), 801-808. 2003.
- Harry M., Jusseaume N., Gambier B., and Garnier-Sillam E. Use of RAPD markers for the study of microbial community similarity from termite mounds and tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33(4-5), 417-427. 2001.
- Harvey PJ., Campanella BF., Castro PM., Harms H., Lichtfouse E., Schäffner AR., Smrcek S., and Werck-Reichhart D. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution Research International* 9(1), 29-47. 2002.
- He J., Ritalahti KM., Yang K-L., Koenigsberg SS, and Löffler FE. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* 424, 62-65. 2003.
- Heitzer A. and Saylor GS. Monitoring the efficacy of bioremediation. *Tibtech* 11, 334-343. 93.
- Heuer H., Wieland G., Schonfeld J., Schnwalder A., Gomes NCM., and Smalla K. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* (ed. P.A. Rochelle), Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. 177-190 . 2001.
- Hickman ZA. and Reid BJ. The co-application of earthworms (*Dendrobaena veneta*) and compost to increase hydrocarbon losses from diesel contaminated soils. *Environment International* 34(7), 1016-1022. 2008.
- Holliger C. , Hahn D., Harmsen H., Ludwig W., Schumacher W., Tindall B., Vazquez F., Weiss N., and Zehnder AJB. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* 169, 313-321. 98.
- Holliger C. and Schraa G. Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria . *FEMS Microbiology Reviews* 15(2-3), 297-305. 94.
- Hong S., Xingang L., Guoqiang H., and Bin J. A study on cometabolic bioventing for the *in situ* remediation of trichloroethylene . *Environmental Geochemistry and Health* 28(1-2), 137-142. 2006.
- Huling SG. and Weaver JW. Dense nonaqueous-phase liquids. EPA Ground-water Issue Paper, EPA/540/4-91/002. 91.
- Hyman MR., Russell SA., Ely RL., Williamson KJ., and Arp DJ. Inhibition, Inactivation, and Recovery of Ammonia-Oxidizing Activity in Cometabolism of Trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4), 1480-1487. 95.
- Isken S. and de Bont JAM. Bacteria tolerant to organic solvents. 2(3), 229-238. 98.
- Iturbe R., Flores C., and Torres LG. Operation of a 27-m<sup>3</sup> biopile for the treatment of petroleum-contaminated soil . *Remediation Journal* 17(2), 97-108. 2007.
- Jackson, M.L. (1970). *Análisis químico de suelos*. 662 pp. Ed. Omega, S.A. Barcelona.

- Jenkinson DS. and Ladd JN. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul, E.A., Ladd, J.N. (Eds), *Soil Biochemistry*, vol. 5. Dekker, New York, 415–471. 81.
- Jenkinson DS. and Powlson DS. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil--V: A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 8(3), 209-213. 76.
- Johnsen K., Jacobsen C., Torsvik V., and Sorensen J. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. *Biology and Fertility of Soils*. 33(6), 443-453. 2001.
- Jorgensen K., Puustinen J., and Sourtti A. Bioremediation of petroleum hydrocarbon –contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* 107, 245-254. 2000.
- Jurado F., Cano A., and Carpio J Modelling of combined cycle power plants using biomass. *Renewable Energy* 28(5), 743-753. 2003.
- Kandeler E. , Tscherko D., and Spiegel H. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biology and Fertility of Soils*. 28(4), 343-351. 99.
- Kao CM., Chen KF., Chen YL., Chen TY., and Huang WY. Biobarrier System for Remediation of TCE-Contaminated Aquifers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72(1), 87-93. 2004.
- Kao CM, Chen SC, and Su MC. Laboratory column studies for evaluating a barrier system for providing oxygen and substrate for TCE biodegradation. *Chemosphere* 44(5), 925-934. 2001.
- Kao CM and Prosser J. Intrinsic bioremediation of trichloroethylene and chlorobenzene: Field and laboratory studies. *Journal of Hazardous Materials* 69(1), 67-79. 99.
- Kao CM and Yang L. Enhanced bioremediation of trichloroethene contaminated by a biobarrier system. *Water Science and Technology* 42(3-4), 429-434. 2000.
- Katsenovich Y., Öztürk Z., Allen M., and Wein G. Evaluation of soil solid amendments for TCE biodegradation in a biobarrier system. *Remediation Journal* 17(3), 67-80. 2007.
- Kaushik P and Garg VK. Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* 90(3), 311-316. 2003.
- Kelly CJ., Bienkowski PR., and Sayler GS. Kinetic analysis of a *tod-lux* bacterial reporter for toluene degradation and trichloroethylene cometabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 69(3), 256-265. 2000.
- Khan AG., Kuek C., Chaudhry TM., Khoo CS., and Hayes WJ. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41(1-2), 197-207. 2000.
- Khazaal K., Boza J. y Ørskov E.R. (1994). Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the in vitro gas production technique with or without polyvinilpyrrolidone or nylon bag. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49, 133-149
- King JMH., DiGrazia PM., Applegate B., Burlage R., Sanseverino J., Dunbar P., Larimer F., and Sayler GS. Rapid, Sensitive Bioluminescent Reporter Technology for Naphthalene Exposure and Biodegradation. *Science* 249(4970), 778-781. 90.  
Notes: 10.1126/science.249.4970.778.
- King RB, Long GM., and Sheldon JK. *Practical environmental bioremediation, the field guide*. Lewis publishers, NY. 97.

## ***Bibliografía***

- Kirk JL, Klironomos JN, Lee H, and Trevors JT. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* 133(3), 455-465. 2005.
- Kisand V and Wikner J. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods* 54(2), 183-191. 2003.
- Klamer M. and Baath E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 9-20. 98.
- Krokida MK., Maroulis ZB., and Kremalis C. Process design of rotary dryers for olive cake. *Drying Technology* 20(4), 771-788. 2002.
- Kästner M. and Mahro B. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 668-675. 96.
- Labud V, Garcia C, and Hernandez T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66(10), 1863-1871. 2007.
- Lazcano C., Gómez-Brandón M., and Domínguez J. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere* 72(7), 1013-1019. 2008.
- Leahy JG. and Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 54(3), 305-315. 90.
- Lee MD, Odom JM., and Buchanan Jr RJ. NEW PERSPECTIVES ON MICROBIAL DEHALOGENATION OF CHLORINATED SOLVENTS: Insights from the Field. *Annual Review of Microbiology* 52(1), 423-452. 98.
- Lee S., Moe WM., Valsaraj KT., and Pardue JH. EFFECT OF SORPTION AND DESORPTION RESISTANCE ON AEROBIC TRICHLOROETHYLENE BIODEGRADATION IN SOILS. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(8), 1609-1617. 2002.
- Lee S-M., Jung J-Y., and Chung Y-C. Measurement of ammonia inhibition of microbial activity in biological wastewater treatment process using dehydrogenase assay. *Biotechnology Letters* 22(12), 991-994. 2000.
- Leigh M.B., Fletcher J.S., Fu X., and Schmitz F.J. Root Turnover: An Important Source of Microbial Substrates in Rhizosphere Remediation of Recalcitrant Contaminants. *Environmental Science and Technology* 36(7), 1579-1583. 2002.
- Leigh M.B., Prouzova P, Mackova M, Macek T, Nagle D.P., and Fletcher J.S. Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Bacteria Associated with Trees in a PCB-Contaminated Site. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4), 2331-2342. 2006.  
Notes: 10.1128/AEM.72.4.2331-2342.2006.
- Lendvay JM. , Löffler FE., and Dollhopf M. Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environmental Science and Technology* 37, 1422-1431. 2003.
- Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Wattiau P, Top EM, Verstraete W, and Springael D. Occurrence and community composition of fast-growing Mycobacterium in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* 51(3), 375-388. 2005.
- Little CD, Palumbo AV, Herbes SE, Lidstrom ME, Tyndall RL, and Gilmer PJ. Trichloroethylene Biodegradation by a Methane-Oxidizing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 54(4), 951-956. 88.

- Liu L, Jiang C-Y, Liu X-Y, Wu J-F, Han J-G, and Liu S-J. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environmental Microbiology* 9(2), 465-473. 2007.
- Lorca GL, Barabote RD, Zlotopolski V, Tran C, Winnen B, Hvorup RN, Stonestrom AJ, Nguyen E, Huang L-W, Kim DS, and Saier Jr. MH. Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: Comparative genomic analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768(6), 1342-1366. 2007.
- Lorenz K. and Kandeler E. Biochemical characterization of urban soil profiles from Stuttgart, Germany. *Soil Biology and Biochemistry* 37(7), 1373-1385. 2005.
- Lorenz MG. and Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58(3), 563-602. 94.
- Lores M., Gómez-Brandón M., Pérez-Díaz D., and Domínguez, J. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biology and Biochemistry* 38(9), 2993-2996. 2006.
- Luijten MLGC., de Weert J., Smidt H., Boschker HTS., de Vos WM., Schraa G., and Stams AJM. Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(3), 787-793. 2003. Notes: 10.1099/ijs.0.02417-0.
- Lung AJ., Lin C-M., Kim JM., Marshall MR., Nordstedt R., Thompson NP., and Wei CI. Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in Cow Manure Composting. *Journal of Food Protection* 64(9), 1309-1314. 2001.
- Lynch JM. and Whipps JM. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129( 1), 1-10. 90.
- Ma WK, Siciliano SD, and Germida JJ. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37(9), 1589-1597. 2005.
- Maliszewska-Kordybach B. and Smreczak B. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International* 28(8), 719-728. 2003.
- Mameri AN., Aiouche F., Belhocine D., Grib H., Lounici H., Piron DL., and Yahiat Y. Preparation of activated carbon from olive mill solid residue. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 75(7), 625-631. 2000.
- M.A.P.A. (1986). Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos, fertilizantes, suelos, agua, productos fitosanitarios y fertilizantes orgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid
- Marin JA., Hernandez T., and Garcia C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental Research* 98(2), 185-195. 2005.
- Martin Garcia A.I., Yañez Ruiz D.R., Moumen A., and Molina Alcaide E. Effect of polyethylene-glycol on the chemical composition and nutrient availability of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) by-products. *Animal Feed Science and Technology* 114(1-4), 159-177. 2004.
- Martín-Gil J., Navas-Gracia L., Gómez-Sobrino E., Correa-Guimaraes A., Hernández-Navarro S., Sánchez-Báscones M., and del Carmen Ramos-Sánchez M. Composting and vermicomposting experiences in the treatment and bioconversion of asphaltens from the Prestige oil spill.

## **Bibliografía**

- Bioresource Technology 99(6), 1821-1829. 2008.
- Martín Moreno C., González Becerra A., and Blanco Santos MJ. Tratamiento biológico de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología* 21, 103-120. 2004.
- Masghouni M. and Hassairi M. Energy applications of olive-oil industry by-products: I. The exhaust foot cake. *Biomass and Bioenergy* 18(3), 257-262. 2000.
- Massa V., Infantino A., Radice F., Orlandi V., Tavecchio F., Giudici R., Conti F., Urbini G., Di Guardo A., and Barbieri P. Efficiency of natural and engineered bacterial strains in the degradation of 4-chlorobenzoic acid in soil slurry. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63(1), 112-115. 2009.
- Maymo-Gatell X., Chien Y-T., Gossett JM., and Zinder SH. Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *Science* 276(5318), 1568-1571. 97. Notes: 10.1126/science.276.5318.1568.
- Megharaj M. , Singleton I., McClure NC., and Naidu R. Influence of Petroleum Hydrocarbon Contamination on Microalgae and Microbial Activities in a Long-Term Contaminated Soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38(4), 439-445. 2000.
- Meguro N, Kodama Y, Gallegos MT, and Watanabe K. Molecular Characterization of Resistance-Nodulation-Division Transporters from Solvent- and Drug-Resistant Bacteria in Petroleum-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1), 580-586. 2005.
- Miller RE and Guengerich FP. Metabolism of trichloroethylene in isolated hepatocytes, microsomes, and reconstituted enzyme systems containing cytochrome P-450. *Cancer research* 43(3), 1145-1152. 83.
- Mishra S., Jyot J., Kuhad RC., and Lal B. Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4), 1675-1681. 2001. Notes: 10.1128/AEM.67.4.1675-1681.2001.
- Molina Alcaide E. and Nefzaoui A. Recycling of olive oil by-products: Possibilities of utilization in animal nutrition: Olive Oil Processes and By-Products Recycling. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38(3-4), 227-235. 96.
- Monroy F., Aira M., and Domínguez J. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (*Oligochaeta*). *Applied Soil Ecology* 39(2), 127-132. 2008.
- Moreno B., Garcia-Rodriguez S., Cañizares R., Castro J., and Benítez E. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* In press. 2009.
- Moreno B, Vivas A Nogales R Macci C Masciandaro G Benitez E. Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes. *Environmental Science and Pollution Research* . 2008.
- Mueller JG., Cerniglia CE., and Pritchard PH. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Crawford, R.L. and Crawford, D.L., Editors, 1996. *Bioremediation — Principles and Applications*, Cambridge University Press, UK, 125–195. 96.
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, and Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419(6907), 587-593. 2002. Notes: 10.1038/nature01050.

- Muratova A. , Hübner Th., Tischer S., Turkovskaya O., Möder M., and Kusch P. Plant-rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 5(2), 137-151. 2003. Taylor & Francis.
- Murciego AM , Sánchez AG, González MAR, Gil EP, Gordillo CT, Fernández JC, and Triguero TB. Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environmental Pollution* 145(1), 15-21. 2007.
- Muyzer G and Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1), 127-141. 98.
- Namkoong W. , Hwang E-Y., Park J-S., and Choi J-Y. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution* 119(1), 23-31. 2002.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini MT., Landi L., Pietramellara G., and Renella G. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54(4), 655-670. 2003.
- Nannipieri P., Grego S., and Ceccanti B. Ecological significance of biological activity in soil. In: Bollag J-M, Stotzky G (eds) *Soil biochemistry*, vol 6. Dekker, New York, 293-355. 90.
182. Nannipieri P., Kandeler E., and Ruggiero P. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns RP, Dick RP, editors. *Enzymes in the Environment Activity, Ecology and Applications*. New York7 Marcel Dekker; 1-33. 2002.
- Narayanan M., Davis LC., and Erickson LE. Fate of volatile chlorinated organic compounds in a laboratory chamber with alfalfa plants. *Environmental Science and Technology* 29(9), 2437-2444. 95.
- Ndegwa PM. and Thompson SA. Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresource Technology* 76(2), 107-112. 2001.
- Nei M. and Li W-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases (molecular evolution/mitochondrial DNA/nucleotide diversity). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(10), 5269-5273. 79.
- Nelson MJK, Montgomery SO, O'Neill EJ, and Pritchard PH. Aerobic Metabolism of Trichloroethylene by a Bacterial Isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 52( 2), 383-384. 86.
- Niaounakis M. and Halvadakis CP. Olive-mill waste management: literature review and patent survey. In: tybothito-George Dardanos Publications, Athens, Greece . 2004.
- Nichols T, Wolf D, Rogers H, Beyrouy C, and Reynolds C. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. 95(1), 165-178. 97.
- Nielsen NM., Winding A., Binnerup S., Hansen BM., and Kroer N. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute (NERI). Technical Report No. 388. 2002.
- Nikaido H. and Zgurskaya HI. AcrAB and Related Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3(2), 215-218. 2001.
- Nogales R and Benitez E. Absorption of Zinc and Lead by *Dittrichia viscosa* Grown in a Contaminated Soil Amended with Olive-Derived Wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76(3), 538-544. 2006.
- Nogales R., Cifuentes C., and Benitez E. Vermicomposting of Winery Wastes: A Laboratory Study. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 40(4), 659-673. 2005. Taylor & Francis.



## **Bibliografía**

- Nogales R., Elvira C., Benitez E., and Gallardo-Lara F. Agricultural use of compost and vermicompost from twon refuse, 1: Processes, maturity and quality of products. *Residuos* 26 , 53-57. 95.
- Nogales R., Melgar R., and Benitez E. Potential Use of Olive-Waste Ash from Cogeneration Plants as a Soil Amendment. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 41(8), 1405-1415. 2006.
- Nogales R., Melgar R., Guerrero A., Lozada G., Benítez E., Thompson R., and Gómez M. Growth and reproduction of *Eisenia andrei* in dry olive cake mixed with other organic wastes. *Pedobiologia* 43(6), 744. 99.
- Nogales R., Thompson R., Calmet A., Benitez E., Gómez M., and Elvira C. Feasibility of vermicomposting residues from olive oil production obtained using two stage centrifugation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 33(7), 1491-1506. 98.
- Nogales, R., Saavedra, M., Benitez, E. 2008. Recycling of wet olive cake "alperujo" through treatment with fungi and subsequent vermicomposting. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17, 1822-1827
- Ntougias S., Zervakis G.I., Ehaliotis C., Kavroulakis N., and Papadopoulou K.K. Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in Microbiology* 157(4), 376-385. 2006.
- Oldenhuis R., Oedzes JY., van der Waarde JJ., and Janssen DB. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology* 57(1), 7-14. 91.
- Ovreas L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters* 3(3), 236-251. 2000.
- Pál C., Papp B., and Lercher MJ. Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nature Genetics* 37, 1372-1375. 2005.
- Pankhurst CE., Yu S., Hawke BG., and Harch BD. Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. *Biology and Fertility of Soils*. 33(3), 204-217. 2001.
- Parras M. y Torres F.J. (1994). La demanda di olio di oliva vergine nel mercato spagnolo: aspettidel mercato del consumatore. *Olivae*, 54, 22-32.
- Parsons F., Lage G., and Rice R. Transformation of chlorinated organic solvents in ground water environments in Southern Florida. *Journal of the American Chemical Society* 23, 286-287. 83.
- Parsons F., Wood PR., and DeMarco J. Transformations of tetrachloroethene and trichloroethene in microcosms and groundwater. *Journal American Water Works Association* 76, 56-59. 84.
- Paulsen IT. , Park JH., Choi PS., and Saier Jr. MH. A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria . *FEMS Microbiology Letters* 156(1), 1-8. 97.
- Pérez-Piqueres A., Edel-Hermann V., Alabouvette C., and Steinberg C. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38(3), 460-470. 2006.
- Perucci P, Casucci C, and Dumontet S. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32(13), 1927-1933. 2000.
- Pierce FJ. and Larson WE. Developing criteria to evaluate sustainable land management. Kimble, J.M. (Ed.), *Proc. Of the 8th Int. Soil Management Workshop: Utilization of Soil Survey Information for Sustainable Land Use*, May 1993, USDA-SCS, National Soil Survey, Lincoln, WI, 7-14. 93.

- Pinkart HC, Wolfram JW, Rogers R, and White DC. Cell Envelope Changes in Solvent-Tolerant and Solvent-Sensitive *Pseudomonas putida* Strains following Exposure to o-Xylene. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3), 1129-1132. 96.
- Plaza C, Nogales R, Senesi N, Benitez E, and Polo A. Organic matter humification by vermicomposting of cattle manure alone and mixed with two-phase olive pomace. *Bioresource Technology* 99(11), 5085-5089. 2008.
- Powlson DS. The soil microbial biomass: before, beyond and back. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, G.E. (Eds.), *Beyond the Biomass*. Wiley, Chichester, UK, 3-20. 94.
- Pradhan SP., Conrad JR., Paterek JR., and Srivastava VJ. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. *Journal of Soil Contamination* 7(4), 467-480. 98.
- Pramanik P., Ghosh G.K., Ghosal P.K., and Banik P. Changes in organic - C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. *Bioresource Technology* 98(13), 2485-2494. 2007.
- PRTR-España. Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://www.prtr-es.es>
- Qian H., Hu B., Cao D., Chen W., Xu X., and Lu Y. Bio-safety Assessment of Validamycin Formulation on Bacterial and Fungal Biomass in Soil Monitored by Real-Time PCR. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78(3), 239-244. 2007.
- Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, Teran W, and Segura A. Mechanisms of Solvent Tolerance in Gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology* 56 (1), 743-768. 2002.
- Ramos JL, Duque E, Rodriguez-Hervas JJ, Godoy P, Haidour A, Reyes F, and Fernandez-Barrero A. Mechanisms for Solvent Tolerance in Bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 272(7), 3887-3890. 97.
- Rasche ME., Hyman MR., and Arp DJ. Factors Limiting Aliphatic Chlorocarbon Degradation by *Nitrosomonas europaea*: Cometabolic Inactivation of Ammonia Monooxygenase and Substrate Specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 57(10), 2986-2994. 91.
- Reddy GVB., Sollewijn Gelpke MD., and Gold MH. Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. *Journal of Bacteriology* 180(19), 5159-5164. 98.
- Reeves DW. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems: XIVth ISTRO Conference on Agroecological and Economical Aspects of Soil Tillage. *Soil and Tillage Research* 43(1-2), 131-167. 97.
- Roberts PV., Hopkins GD., Mackay DM., and Semprini L. A field evaluation of in-situ biodegradation of chlorinated ethenes: part 1, methodology and field site characterization. *Ground Water* 28(4), 591-604. 90.
- Robinson KG., Farmer WS., and Novak JT. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Water Research* 24(3), 345-350. 90.
- Roig A., Cayuela M.L., and Sánchez-Monedero M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26(9), 960-969. 2006.
- Romero E, Benitez E, and Nogales R. Suitability of Wastes from Olive-Oil Industry for Initial Reclamation of a Pb/Zn Mine Tailing. *Water, Air, and Soil pollution* 165(1-4), 153-165. 2005.

## **Bibliografía**

- Rondon MR., August PR., Bettermann AD., Brady SF., Grossman TH., Liles MR., Loiacono KA., Lynch BA., MacNeil IA., Minor C., Tiong CL., Gilman M., Osburne MS., Clardy J., Handelsman J., and Goodman RM. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6), 2541-2547. 2000.  
Notes: 10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000.
- Rubinos DA. , Villasuso R., Muniategui S., Barral MT., and Díaz-Fierros F. Using the landfarming technique to remediate soils contaminated with hexachlorocyclohexane isomers. *Water, Air and Soil Pollution* 181(1-4), 385-399. 2007.
- Russell HH. , Matthews JE., and Sewell GW. TCE Removal from Contaminated Soil and Ground Water. EPA (US Environmental Protection Agency) . 92.
- Ryckeboer J., Mergaert J., Coosemans J., Deprins K., Swings J., and . Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin . *Journal of Applied Microbiology* 94(1), 127-137. 2003.
- Saavedra M, Benitez E, Cifuentes C, and Nogales R. Enzyme Activities and Chemical Changes in Wet Olive Cake after Treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* 17(1), 93-102. 2006.
- Saeki H, Akira M, Furuhashi K, Averhoff B, and Gottschalk G. Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology* 145, 1721-1730. 99.
- Saier MH Jr., Goldman SR., Maile RR., Moreno MS., Weyler W., Yang N., and Paulsen IT. Transport Capabilities Encoded Within the *Bacillus subtilis* Genome. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 4(1), 37-67. 2002.
- Saier MH Jr. and Paulsen IT. Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in Cell and Development Biology* 12(3), 205-213. 2001.
- Sampedro I. , Aranda E., Martín J., García-Garrido JM., García-Romera I, and Ocampo JA. Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology* 26(2), 149-156. 2004.
- Sardesai Y and Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents. *Research in Microbiology* 153(5), 263-268. 2002.
- Scheu S. Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (Lumbricidae). *Biology and Fertility of Soils*. 5(3), 230-234. 87.
- Schlegel HG. *Microbiología General*. Edición Omega S. A. Barcelona. 654. 97.
- Schloss PD, Hay AG., Wilson DB., and Walker LP. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting . *FEMS Microbiology Ecology* 46(1), 1-9. 2003.
- Schloter M, Dilly O, and Munch JC. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 98(1-3), 255-262. 2003.
- Schnabel WE., Dietz AC., Burken JG., Schnoor JL., and Alvarez PJ. Uptake and transformation of trichloroethylene by edible garden plants. *Water Research* 31(4), 816-824. 97.
- Schumann, A.W. y Sumner , M.E. (1999). Plant nutrient availability from mixtures of fly ashes and biosolids. *J. Environ. Qual.*, 28, 1651-1657

- Semple KT., Reid BJ., and Fermor TR. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112(2), 269-283. 2001.
- Senesi N. and Loffredo E. The chemistry of soil organic matter. In: D.L. Sparks, Editor, *Soil Physical Chemistry* (2nd ed.), CRC Press, Boca Raton. D.L. Sparks, Editor, *Soil Physical Chemistry* (2nd ed.), CRC Press, Boca Raton , 239-370. 99.
- Senesi N., Plaza C., Brunetti G, and Polo A. A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances: Organic Wastes in Soils: Biochemical and Environmental Aspects - Biochemical and Environmental Aspects, Second General Annual Conference of European Geosciences Union, Soil System Sciences Division, Session SSS12, Recycling of Organic Wastes in Soils: Biochemical and Environmental Issues. *Soil Biology and Biochemistry* 39(6), 1244-1262. 2007.
- Sequeiros, L., Méndez, M. y Sousa, M. (1995). Tecnología de obtención de aceite de oliva por dos fases. seguimiento y situación actual en Andalucía. *Tecnoambiente*, Julio, 59-62
- Shi W., Becker J., Bischoff M., Turco RF., and Konopka AE. Association of Microbial Community Composition and Activity with Lead, Chromium, and Hydrocarbon Contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8), 3859-3866. 2002.  
Notes: 10.1128/AEM.68.8.3859-3866.2002.
- Shi W., Bischoff M., Turco R., and Konopka A. Microbial Catabolic Diversity in Soils Contaminated with Hydrocarbons and Heavy Metals. *Environmental Science and Technology* 39(7), 1974-1979. 2005.
- Sikkema J, de Bont JA, and Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59(2), 201-22. 95.
- Sikkema J., Weber FJ., Heipieper HJ., and de Bont JAM. Cellular toxicity of lipophilic compounds: Mechanisms, implications, and adaptations. *Biocatalysis* 10, 113-122. 94.
- Sinsabaugh R.L. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils*. 17(1), 69-74. 94.
- Smets BF. and Barkay T. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nature Reviews Microbiology* 3, 675-678. 2005.
- Sojka RE. and Upchurch DR. Reservations Regarding the Soil Quality Concept. *Soil Science Society of America Journal* 63(5), 1039-1054. 99.
- Stevenson FJ. *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions.* (2nd edn), John Wiley & Sons, New York . 94.
- Sung Y., Ritalahti KM., Apkarian RP., and Löffler FE. Quantitative PCR Confirms Purity of Strain GT, a Novel Trichloroethene-to-Ethene-Respiring Dehalococcoides Isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), 1980-1987. 2006.  
Notes: 10.1128/AEM.72.3.1980-1987.2006.
- Suyama A., Yamashita M., Yoshino S., and Furukawa K. Molecular Characterization of the PceA Reductive Dehalogenase of *Desulfotobacterium* sp. Strain Y51. *Journal of Bacteriology* 184(13), 3419-3425. 2002.  
Notes: 10.1128/JB.184.13.3419-3425.2002.
- Tabatabai MA. Soil enzymes. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties.* ASA-CSSA-SSSA Publ, Madison, 903-947. 82.

## **Bibliografía**

- Tallini M., Bertoni LA., and Traversim ML. Effect of humic acids on growth and biomass partitioning of container growth olive plants, *Acta Horticulture* **294** (1991), pp. 75–80. *Acta Horticulture* 294, 75-80. 91.
- Taylor JP, Wilson B, Mills MS, and Burns RG. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 34(3), 387-401. 2002.
- Tejada M., Gonzalez JL., Hernandez MT., and Garcia C. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: Effect on soil microbial properties. *Bioresource Technology* 99(8), 2872-2880. 2008.
- Tekin AR. and Dalgic AC. Biogas production from olive pomace. *Resources, Conservation and Recycling* 30(4), 301-313. 2000.
- Thanabalu T., Koronakis E., Hughes C., and Koronakis V. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *The EMBO Journal* 17, 6487-6496. 98.
- Thimm T, Hoffmann A, Fritz I, and Tebbe CC. Contribution of the Earthworm *Lumbricus rubellus* (Annelida, Oligochaeta) to the Establishment of Plasmids in Soil Bacterial Communities. *Microbial Ecology* 41(4), 341-351. 2001.
- Thomas CM. and Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria . *Nature Reviews Microbiology* 3, 711-721. 2005.
- Thomas JM., Ward CH., Raymond RL., Wilson JT., and Loehr RC. Bioremediation. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego, California. 92.
- Tiedje JM., Cho JC., Murray A., Treves D., Xia B., and Zhou J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: *Sustainable Management of Soil Organic Matter* (eds R.M. Rees, B.C. Ball, C.D. Campbell & C.A. Watson), CAB International, Wallingford. 393–412. 2001.
- Tognetti C. , Laos F., Mazzarino MJ., and Hernández MT. Composting versus vermicomposting: a comparison of end product quality. *Compost Science & Utilization* 13( 1), 6-13. 2005.
- Tognetti C. , Mazzarino MJ., and Laos F. Compost of municipal organic waste: Effects of different management practices on degradability and nutrient release capacity: Special Section: Enzymes in the Environment, *Enzymes in the Environment III*. *Soil Biology and Biochemistry* 40(9), 2290-2296. 2008.
- Tomati U., Grappelli A., and Galli E. The presence of growth regulators in earthworm-worked wastes. Bonvicini Paglioi, A.M., Omodeo, P. (Eds.), *On Earthworms*. Proceedings of International Symposium on Earthworms, Selected Symposia and Monographs, *Unione Zoologica Italiana*, 2. Mucchi, Modena, 423-435. 87.
- Tomati, U., Galli, E., Pasetti, L. y Volterra, E. (1995). Bioremediation of olive-mill wastewaters by composting. *Waste Management and Research*, 13, 509-518
- Torstensson L. Microbial assays in soils. In: Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (Eds.), *Soil Ecotoxicity*. CRC Lewis Publishers, London, 207-233. 97.
- Trasar-Cepeda C., Leirós MC., Seoane S., and Gil-Sotres F. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32(13), 1867-1875. 2000.
- Trevors JT. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry* 16(6), 673-674. 84.

- Tscherko D. and Kandeler E. Classification and monitoring of soil microbial biomass, N-mineralisation and enzyme activities to indicate environmental changes. *Die Bodenkultur* 50(215-226). 99.
- Tseng T-T., Gratwick KS., Kollman J., Park D., Nies DH., Goffeau A., and Saier Jr. MH. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1(1), 107-125. 99.
- Tsukagoshi N. and Aono R. Entry into and Release of Solvents by *Escherichia coli* in an Organic-Aqueous Two-Liquid-Phase System and Substrate Specificity of the AcrAB-TolC Solvent-Extruding Pump. *Journal of Bacteriology* 182(17), 4803-4810. 2000. Notes: 10.1128/JB.182.17.4803-4810.2000.
- Uceda, M. Hermoso, H. y González, J. (1995). Evolución de la tecnología del aceite de oliva, nuevos sistemas ecológicos: Ensayos y conclusiones. *Alimentación, Equipos Y Tecnología*, 5, 93-98
- U.S. Environmental Protection Agency (1996). Clean Up the Nation's Waste Sites: Markets and Technology Trends, 1996 edition. (*EPA 542-R-96-005: 1-10*). Washington, DC: Office of solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office
- U.S. Environmental Protection Agency USEPA (1998) An Analysis of Composting as an Environmental Remediation Technology (EPA530-R-98-008).
- U.S. Environmental Protection Agency (1999) Remedial Technology Fact Sheet. Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons, EPA/600/F-98/021, 1999.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2000). Engineered approaches to in situ bioremediation of chlorinated solvents: Fundamentals and field applications (*EPA 542-R00-008*). Washington, DC: Office of solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office.
- Valdrighi MM., Pera A., Agnolucci M., Frassinetti S., Lunardi D., and Vallini G. Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study: Utilisation of Waste Organic Matter. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 58(2-3), 133-144. 96.
- van Bruggen AHC. and Semenov AM. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15(1), 13-24. 2000.
- Vance ED., Brookes PC., and Jenkinson DS. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19(6), 703-707. 87.
- Vancura V. and Hovadik A. Root exudates of plants II. Composition of root exudates of some vegetables. *Plant and Soil* 22, 21-32. 65.
- Venter, J.M. y Reinecke, A.J. (1988). The life cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *S. Afr. J. Zool.*, 3, 161-165.
- Vermuë M., Sikkema J., Verheul A., Bakker R., and Tramper J. Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp. *Biotechnology and Bioengineering* 42(6), 747-758. 93.
- Vidali M. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163-1172. 2001.
- Vivas A., Moreno B., del Val C., Cristina Macci C., Masciandaro G., and Benitez E. Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1287-1296. 2008.

## **Bibliografía**

- Vivas A, Moreno B Garcia-Rodriguez S and Benitez E. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology* 100(3), 1319-1326. 2009.
- Viñas M. , Sabaté J., Grifoll M., and Solanas AM. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. *Residuos. Revista técnica.* 59, 78-82. 2001.
- Walton BT and Anderson TA. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. *Applied and Environmental Microbiology* 56(4), 1012-1016. 90.
- White DG., Goldman JD., Demple B., and Levy SB. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179(19), 6122-6126. 97.
- Wiese FW., Chang HC., Lloyd RV., Freeman JP., and Samokyszyn VM. Peroxidase-Catalyzed Oxidation of 2,4,6-Trichlorophenol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34(3), 217-222. 98.
- Wilson JT., Cosby RL., and Smith GB. Potential for biodegradation of organo-chlorine compounds in groundwater. Giuliano Ziglio (ed.), *Ground water contamination with organo-chlorine compounds of industrial origin.* Monduzzi Editore SpA, Bologna, Italy , 183-195. 83.
- Wilson JT. and McNabb JF. Biological transformation of organic pollutants in groundwater. *EOS* 64, 505-506. 83 .
- Wilson JT., McNabb JF., Wilson BH., and Noonan MJ. Biotransformation of selected organic pollutants in ground water. *Developments in Industrial Microbiology* 24, 225-234. 83i.
- Wilson JT. and Wilson BH. Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 49(1), 242-243. 85.
- Yang Y. and McCarty PL. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic culture. *Environmental Science and Technology* 32, 3591-3597. 98.
- Yang Y. and McCarty PL. Biomass, Oleate, and Other Possible Substrates for Chloroethene Reductive Dehalogenation. *Bioremediation Journal* 4(2), 125-133. 2000. Taylor & Francis.
- Yang Y., Pesaro M., Sigler W., and Zeyer J. Identification of microorganisms involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community. *Water Research* 39(16), 3954-3966. 2005.
- Yang Z.H., Xiao Y., Zeng G.M., Xu Z.Y., and Liu Y.S. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(4), 918-925. 2007.
- Yu EW., Aires JR., and Nikaido H. AcrB Multidrug Efflux Pump of *Escherichia coli*: Composite Substrate-Binding Cavity of Exceptional Flexibility Generates Its Extremely Wide Substrate Specificity. *Journal of Bacteriology* 185(19), 5657-5664. 2003. Notes: 10.1128/JB.185.19.5657-5664.2003.
- Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils.* 29(2), 111-129. 99.
- Zgurskaya HI. and Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes . *Molecular Microbiology* 37(2), 219-225. 2000.

Zgurskaya HI, Yamada Y, Tikhonova EB, Ge Q, and Krishnamoorthy G. Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* In Press, Uncorrected Proof. 2008.

Zucconi F, Peta A, Forte M, and De Bertoldi M. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22 , 54-57. 81.