

EMPLEO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LACCASA EN SISTEMAS MEMBRANARIOS PARA REMOCIÓN DE AGENTES DE POLUCIÓN: CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS

Employment of laccasa producing microorganisms in membrane system for polluting agents removal: consideration and perspectives

Liliana Serna C.¹, Fernando L. Cuesta A.¹;

RESUMEN

La contaminación se define como la presencia en un ecosistema de agentes de polución que alcanzan un nivel de concentración considerablemente alto, ocasionando efectos adversos. Ante los grandes problemas ambientales que éstos ocasionan en la cadena alimentaria, se han formulado diversos métodos para mitigar los daños; entre los que se encuentran el empleo de métodos enzimáticos asociados a microorganismos o a otros agentes biológicos; y sistemas que permiten el metabolismo de contaminantes de forma efectiva y práctica. Utilizar de manera conjunta estos sistemas, aparece como la opción más acertada para eliminar agentes de polución a un costo energético razonable, lo cual permite emplearlos en la industria. En la presente revisión se identifican las condiciones de proceso propicias para la implementación tecnológica de sistemas membranarios tipo biopelícula que utilizan microorganismos productores de laccasa como agente de descontaminación.

Palabras clave: laccasa, biofilm, sistema membranario, compuestos halogenados.

ABSTRACT

The contamination is defined as the presence in an ecosystem of pollution agents which reach an abnormal concentration level, causing adverse effects. Due to the big environmental problems that these cause in food chain, diverse methods have been formulated to minimize (reduce) the effects; among those enzymatic methods associated to microorganisms or to other biological agents are used; and systems that allow the metabolism of pollutants in an effective and practical way. The combined use of these systems is

¹ Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, AA237, Palmira, Colombia. E-mail: *lsernac@palmira.unal.edu.co; flcuestaa@palmira.unal.edu.co *Autora para correspondencia.

Recibido:

Aceptado:

the most appropriated option to eliminate pollution agents at a reasonable energetic cost whose use in the industry is allowed. In the present review the right process conditions are identified for technological implementation of membrane systems biofilm-type where microorganisms producing of laccase are used as decontamination agent.

Key words: laccasa, biofilm, membrane system, halogen compound.

INTRODUCCIÓN

La contaminación se define como la introducción en un ecosistema de ciertas sustancias o forma de energía que al alcanzar un nivel de concentración anormal ocasionan efectos adversos. Debido a la interacción entre los medios acuático, terrestre y atmósfera, la circulación de los agentes de contaminación tiene repercusiones importantes, los compuestos contaminantes más estudiados y su acción en el ecosistema se recogen en el **Cuadro 1**.

En la atmósfera, los agentes de polución primarios son el material particulado (MP), óxidos de nitrógeno (NO_x), dióxido de azufre (SO₂), gases sulfito reductores (TRS), dióxido de carbono (CO₂) y monóxido de carbono (CO). Todos ellos influyen en la destrucción de la capa de ozono cuando reaccionan con los componentes del aire. El daño en la capa de protección contra la radiación ultravioleta (UV) se produce por la emisión de gases que contienen cloro formando los clorofluorocarbonos (CFC), los cuales liberan átomos de cloro (Cl) al llegar a la estratosfera, siendo cada uno de ellos responsable de romper muchas moléculas de ozono (O₃) y transformarlas en oxígeno y monóxido de cloro; seguidamente, los monóxidos de cloro se remueven de la atmósfera durante las precipitaciones.

En el agua, el Cl reacciona formando ácido clorhídrico y ácido hipocloroso, entre otros. La ionización de los ácidos clorhídrico e hipocloroso reduce el pH del agua, lo cual a largo plazo influye en las funciones fisiológicas de los organismos acuáticos. La acción de los ácidos clorados modifica la actividad y la estructura cuaternaria de la metalotioneína (MT); la cual es una proteína que interviene en la transferencia de iones metálicos en organismos acuáticos y en la homeostasis de metales a nivel fisiológico; por lo tanto la presencia de ácidos clorados en estuarios produce trastornos metabólicos y aumento en la tasa de respiración (Mandel, 2007).

Debido a su naturaleza gaseosa, el Cl raramente se encuentra en forma pura en el suelo. Si es liberado al suelo reacciona con el agua formando ácido hipocloroso y ácido clorhídrico, los cuales pueden reaccionar

con elementos del suelo, generando compuestos de inhibición enzimática que actúan especialmente a nivel extracelular. Las enzimas extracelulares actúan como un límite físico o químico a superficies minerales y orgánicas. La fosfatasa ácida por ejemplo, es una de las muchas fosfatasas funcionales en la tierra y es principalmente responsable de la mineralización de compuestos de fosfato orgánicos en suelos ácidos. Una inhibición en el complejo enzimático altera la homeostasis celular de los agentes relacionados con el sistema (Huang., 2003).

Indiferentemente de la ubicación de los agentes de polución de aire, agua o suelo, la problemática se debe ver en forma global, ya que afecta varios ecosistemas. A nivel industrial, el manejo de efluentes gira en torno a zonas de estabilización, donde la acción de microorganismos lleva a una oxidación del componente de polución, no obstante si el proceso es anaerobio o aerobio, el sistema demanda una cantidad importante de espacio, e importantes costos energéticos y de funcionamiento. En cuanto a las emisiones gaseosas, las alternativas tecnológicas son la destrucción del contaminante, empleando medios químicos y catalíticos, y la recuperación del flujo de aire contaminado, que no es más que una serie de operaciones de filtración para clasificar MP. Además, existen estudios que avalan la acción de ciertas plantas y sus microorganismos asociados, que tienen una acción mitigante en el control de emisiones atmosféricas, para degradar, contener o estabilizar contaminantes medioambientales (Montgomery, 2004; Ramos, 2005); esto es posible mediante la acción de los sistemas enzimáticos microbianos que involucran nitroreductasa, dehalogenasa, peroxidasa, nitrilasa y en mayor medida, laccasa. Sin embargo, este proceso de biorremediación requiere mucho tiempo y es inconveniente para acoplarlo en procesos productivos.

A raíz de los inconvenientes nombrados, surge la idea de emplear enzimas asociadas a sistemas membranarios tipo biopelícula indiferente del tipo de descarga del agente de polución, lo cual permite la transformación de contaminantes de forma efectiva a un costo energético razonable y práctico para emplearlo en la industria. Por tal motivo el objetivo de este artículo fue la revisión de metodologías enzimáticas que involucran microorganismos productores de laccasa, en conjunto con un medio membranario artificial como agente de descontaminación.

Sistemas membranarios asociados a microorganismos productores de laccasa

La laccasa (EC 1.10.3.2) es una polifenol oxidasa que actúa sobre p-difenoles, algunos de ellos conteniendo halógenos en su estructura (Xu, 1996). Su sitio catalítico se caracteriza por tener cuatro átomos de cobre (Cu), los cuales acoplan cuatro electrones de la reducción de dioxígeno a agua en la respectiva oxidación de sustratos (Solomon y Sundaram, 1996).

Existe gran cantidad de microorganismos productores de laccasa; sin embargo, los estudios adelantados en el empleo de microorganismos adheridos como productores de laccasa se enfocan en una procariota perteneciente a la familia *Bacillaceae* y en organismos fúngicos asociados con procesos de putrefacción de material orgánico (**Cuadro 2**), debido a la adaptación de los mismos a medios variables y a la capacidad de formación de matriz tipo biofilmina. *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Bjerkandera* sp. han mostrado adaptación a medios con una concentración considerable de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), logrando desarrollarse y presentando un significativo potencial para metabolizar el agente de polución (Cerniglia y Sutherland, 2006).

Los sistemas membranarios son polímeros estructurales encargados de proveer a los microorganismos adheridos condiciones óptimas para su desarrollo. Dependiendo de las características de dichos sistemas se asegura la acción de sus complejos enzimáticos y la remoción de los agentes de polución en las distintas clases de efluentes. Se emplean como estructura de soporte, desarrollo del microorganismo y medio de producción enzimático y actúan como barrera permeable selectiva al paso de estructuras o compuestos químicos entre dos fases o condiciones. Su configuración geométrica depende de las características endógenas del microorganismo (Wang y Wang, 2006), y este campo es susceptible de amplias investigaciones.

El desarrollo simbiótico entre el microorganismo productor de laccasa y la matriz membranaria es objeto de estudio, debido a la naturaleza artificial de la membrana. Las características más importantes en sistemas membranarios a nivel estructural son morfología, tamaño y densidad del poro de la membrana, distribución estadística del tamaño del poro, tortuosidad del flujo y volumen que ocupan los poros. La ampliación de estos conceptos se presenta en el **Cuadro 3**. En cuanto a la caracterización funcional del sistema membranario, lo que se estudia es la permeabilidad de la membrana, los coeficientes de retención, los factores de separación, las características de adsorción, los coeficientes de difusión efectiva y diversas pruebas de compatibilidad química, mecánica y física.

Condiciones de crecimiento microbiano en sistemas membranarios

El crecimiento de células microbianas productoras de enzimas en sistemas membranarios puede llevarse a cabo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

La capacidad de las enzimas para actuar en actividades metabólicas que involucran condiciones aeróbicas se ve afectada por diversidad de factores como la composición nutricional que requiere el microorganismo

adherido, el pH del medio, el perfil de temperatura, la porosidad de la membrana y la retención de partículas (; Dalfard *et al.*, 2006; Gnanamani *et al.*, 2006; Aksu *et al.*, 2007). Los niveles de oxígeno disuelto se convierten en un parámetro de proceso que determina la filtrabilidad membranaria. A niveles altos de oxígeno disuelto, la resistencia en la membrana es mayor, ello se refleja en la porosidad de la membrana y su capacidad para retener el material particulado del efluente (Jin *et al.*, 2006).

En la práctica hay pocos estudios que involucren el desarrollo de agentes biológicos productores de enzimas para la remoción de compuestos de polución en condiciones aeróbicas. En la remoción de agentes de polución mediante el uso de laccasa, la oxidación reductiva del agente de polución es menos eficaz en condiciones aerobias debido a las características de producción de la enzima.

Los mecanismos involucrados en procesos anaeróbicos son la dechlorinación reductiva, en la cual un grupo halógeno es reemplazado por un grupo hidrógeno, involucrando la transferencia de dos electrones; y la dehalorespiración, mecanismo donde un hidrocarburo clorado se emplea como aceptor de electrones para apoyar el crecimiento microbiano.

Las rutas metabólicas, tanto aeróbicas como anaeróbicas, resultan ser eficientes en la remoción de compuestos de polución; pese a ello, aparecen ventajas directas e indirectas que sugieren un proceso sin aceptor de electrones externo. Cuando el oxígeno aparece como único aceptor de electrones, el oxígeno disuelto es un parámetro de control en el proceso (Jin *et al.*, 2006); la disposición de zonas de estabilización es más demandante en procesos aeróbicos, sea por manejo físico o por requerimientos en materias primas (Savant *et al.*, 2006) y los procesos aeróbicos involucran volatilización de compuestos orgánicos, lo que implica otra fase del proceso (Kosaric y Blaszczyk, 1991). En contraposición, subproductos de condiciones anaerobias con un alto valor calórico pueden ser recirculados en otras fases del proceso productivo (Rajeswari *et al.*, 2000).

Tipos de reactores asociados con matriz membranaria y modos de operación

Los reactores que involucran la utilización de una membrana permeable tipo biopelícula son de lecho empaquetado (Canovas-Diaz y Howell, 1988), los cuales emplean además materiales naturales o sintéticos como soporte de la membrana (**Cuadro 4**). El modo de proceso inicia con un flujo de agua seguido por un flujo en contracorriente de aire. Los microorganismos adheridos en la matriz membranaria se desarrollan hasta llegar a una fase de estabilización, en la cual se hace una remoción eficaz de los agentes nocivos. En la operación con este tipo de reactor se pueden presentar inconvenientes como la baja tasa de degradación y la no homogeneidad de la membrana a lo largo del proceso, lo que conlleva a una acumulación de

agentes de polución en altas concentraciones en la estructura membranaria y esto resulta nocivo para los microorganismos adheridos. Además, la afinidad que tiene la enzima por el sustrato resulta también relevante en la remoción de agentes de polución mediante reactores de lecho empaquetado, la laccasa presenta un alto grado de afinidad con compuestos fenólicos y p-difenólicos (Robles *et al.*, 2002); sin embargo, los inhibidores enzimáticos modifican la actividad enzimática dando como resultado una inadecuada acción contra los agentes de polución; la presencia de componentes con Fe_2^+ , Ag_2^+ , y Cu_2^+ principalmente, afectan la formación del complejo enzima-sustrato, presentándose baja tasa de degradación (Xu, 1996; Robles *et al.*, 2002).

Una configuración que mejora considerablemente la transferencia de masa es utilizar membranas de forma independiente, las cuales actúan en un contraflujo de aire y agua (**Figura 1**). Se debe prestar atención a la configuración geométrica de la membrana, ya que se debe ajustar a las características del microorganismo. Lo ideal es emplear estructuras tubulares, ya que la superficie de contacto es mayor respecto a una configuración esférica. Al aumentar la superficie de contacto entre sistema membranario y agente de polución, los índices de transferencia de masa se mejoran considerablemente, debido a la secreción extracelular de laccasa (Luke y Burton, 2001).

Las configuraciones para procesos anaeróbicos son similares. Lo único que varía es la ausencia del flujo de aire (Rajeswari *et al.*, 2000).

En el análisis de la transferencia de masa para cualquier configuración de reactor asociado con estructuras membranarias, se debe tener en cuenta que: (1) la transferencia de flujos en fase acuosa o líquida debe ser principalmente difusiva, ya que se logra con esto controlar en alguna medida las condiciones de desarrollo del microorganismo adherido. A nivel intraparticular, la característica del sustrato en gran medida es insoluble, pero el microorganismo emplea la fase soluble del sustrato para su desarrollo. No obstante, este mecanismo debe ser evaluado por tratarse de un proceso que demanda tiempo; (2) los metabolitos resultantes deben ser retirados de una forma rápida y eficiente, el empleo de flujos forzados se presenta como la mejor opción; (3) la porosidad de la membrana es objeto de ambigüedad, por una parte influye de forma negativa en los procesos metabólicos al interior de la estructura membranaria (Raghavarao *et al.*, 2003); en contraste, un grado de porosidad membranaria facilita procesos de difusión (Miller y Grant, 2005; Jin *et al.*, 2006); (4) el desgaste de la membrana disminuye la eficiencia del proceso.

De igual manera, la interacción entre flujo, sistema membranario y reacción catalítica trae implicaciones energéticas que se traducen en una transferencia de calor global en el proceso, sea como pérdida o

ganancia de calor. Sin embargo, la acción de los microorganismos adheridos es sensible a este fenómeno, por lo que se debe tener en cuenta que: (1) los flujos que entran y salen del módulo bioreactor son consecuencia de cambios energéticos sensibles y de concentraciones de productos como O_2 , CO_2 , y agua entre otros; (2) se debe emplear mecanismos de convección natural o difusión para el control de flujos no forzados de componentes en fase gaseosa; (3) se debe tener especial cuidado en la interacción entre el material del bioreactor y las corrientes que cruzan alrededor del mismo. Lo más recomendable es emplear métodos convectivos para la refrigeración de dichos flujos.

La configuración de los reactores a escala piloto y laboratorio son, en gran mayoría, secuencia de reactores en continuo, reactores en contracorriente, filtro de contacto anaeróbico y reactor difásico de matriz membranaria-carbón activado granular (Sahinkaya y Dilek, 2007).

El nivel de remoción de contaminantes no sólo depende de los controles del efluente, se debe hacer una adecuada caracterización de los microorganismos que se emplean y, en mayor instancia, de la producción de enzimas de los mismos, esto fue demostrado por (Choi *et al.*, 2007), quienes encontraron que a pesar de haber realizado un buen control de los efluentes los niveles de remoción de mono, di y triclorofenoles no fueron los adecuados, debido a la toxicidad del compuesto en los microorganismos y la inadecuada identificación enzimática de los mismos. Sahinkaya y Dilek (2007) determinaron que los niveles aceptables de remoción de clorofenoles son de 53 mg L^{-1} para monofenoles y 25 mg L^{-1} para diclorofenoles.

La configuración del reactor y el material de soporte de la membrana son también piezas claves dentro de los sistemas membranarios, Alvarez (2006), por ejemplo, empleando piedra pómez como soporte de membrana en un reactor de lecho fluidizado logró operar el sistema por 300 días, esto es más del doble del tiempo que se obtiene utilizando metodologías convencionales aplicadas en laboratorio, que logran un tiempo de operación aceptable de 40 a 120 días.

Una alternativa en investigaciones de manejo de efluentes clorados es el empleo de radiación solar y fotocátalisis, como tratamiento adjunto a los sistemas membranarios con microorganismos productores de laccasa (Malato, 2003; Pedroza., 2007); después de la acción biológica de la laccasa, el tratamiento fotocatalítico mineraliza el compuesto clorado. Es una alternativa promisorio de estudio, debido al auge que se presenta en la producción de fotoceldas, un componente de alto valor económico.

También se emplean sistemas membranarios aeróbicos y anaeróbicos combinados para la remoción de agentes de polución en agua (Tartakovsky, 2005). El método experimental evalúa el control de tricloroetileno (TCE) aprovechando la acción sinérgica de arqueas metanogénicas en la fase aerobia y en la fase anaerobia. Aunque se reportan como parámetros de referencia a nivel de laboratorio los niveles de remoción de TCE y transferencia de masa, las características de los microorganismos adheridos se desplazan a un segundo plano.

En los procesos de remoción de compuestos volátiles (COV) las alternativas de control se centran en tres soluciones tecnológicas que involucran el empleo de microorganismos y la producción de complejos enzimáticos. El biolimpiador, filtro biorregulador y biofiltro (Garner y Barton, 2002). El proceso es de metabolismo aeróbico, demandante de un alto contenido de humedad para mejorar el perfil de temperatura del proceso y la transferencia de oxígeno es fundamental.

El sistema de biolimpiado incluye recirculación de flujo de aire a través de dos módulos: filtro convencional encargado de estandarizar el tamaño de partícula y módulo membranario, en el cual se lleva a cabo la oxidación de los compuestos orgánicos volátiles (**Figura 2**). El sistema membranario posee una fase hidrofóbica, regulando el contacto del microorganismo con el flujo de aire (Freitas dos Santos *et al.*, 1997).

El biofiltro es un ducto alargado dotado de nutrientes para el desarrollo de microorganismos y con materiales de soporte que respaldan el proceso en la transferencia de flujos de aire (Nukunya *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2006). Anterior al contacto del aire y del sistema membranario aparecen dos fases de adecuación de flujo: un filtro convencional asociado con carbón activado para reducir la concentración de agentes de polución y un módulo de humidificación para elevar el contenido de humedad y refrigerar la corriente de aire. En el módulo membranario se identifican dos operaciones: (1) la transferencia de agentes de polución de la fase gaseosa a la fase acuosa, la cual depende en mayor medida de las características del sustrato en la estructura membranaria, condiciones de flujo de la fase acuosa, naturaleza de la transferencia de agentes, posible recirculación de los mismos en los flujos que convergen en el proceso y valores de difusión de los agentes de polución (Jin-Ying *et al.*, 2005); (2) la oxidación de los agentes contaminantes por los microorganismos adheridos.

El filtro biodosificador opera bajo los mismos parámetros del proceso anterior. No obstante, difiere en la fase de humidificación del flujo de aire. El sistema membranario que entra en contacto con el flujo de aire tiene un contenido de humedad adecuado para favorecer el contacto y acción del microorganismo

adherido. La humidificación se lleva a cabo por goteo a contracorriente (Soccol *et al.*, 2003). El sistema es similar a la operación de una torre de absorción de gases (Figura 3) . Un inconveniente que se presenta en los biodosificadores es el control de la transferencia de calor convectiva y conductiva a través del sistema membranario; de no ser adecuada, el desarrollo de los microorganismos sería desfavorable. Este aspecto es poco reportado en la literatura científica.

Campos de exploración para la aplicación de sistemas membranarios en la remoción de agentes de polución

En la literatura aparecen varios aspectos trascendentales para la investigación de sistemas membranarios, como son: el uso de cepas transgénicas, estrategias para aumentar los rendimientos de producción enzimática, el modelamiento de las cinéticas de producción enzimática y de transferencia de masa y la evaluación de diversos sustratos.

Para el modelamiento del proceso cinético de agentes de polución se requiere un amplio conocimiento en los siguientes aspectos: (1) coeficientes de difusión del agente de polución en medios acuífero, aéreo y atmosférico, (2) condiciones asociadas al medio como temperatura y pH, y (3) concentración del agente de polución.

De otro lado, la filtración siempre aparece como una etapa previa al sistema membranario y las características del filtro de remoción de agentes de polución es otro aspecto susceptible de estudio. Utilizar materiales térreos propicios para el desarrollo de microorganismos asegura la acción catalítica sobre el compuesto nocivo y de esta manera el nivel de toxicidad se reduce de manera drástica, asegurando un tiempo de operación mayor en la fase del biorreactor. Una alternativa es utilizar sustratos térreos de tipo mineral (Gadd, 2007), lo que permite el desarrollo de microorganismos, en su mayoría fúngicos, con niveles altos de producción de enzimas.

CONCLUSIONES

Utilizar sistemas membranarios con microorganismos productores de laccasa y lograr su desarrollo a medida que entra en contacto con flujos líquidos o gaseosos con un alto grado de toxicidad de compuestos especialmente halogenados, se convierte en una tecnología promisorio y de un alto espectro de aplicación; sin embargo, los problemas de poner en marcha las herramientas tecnológicas a escala industrial son aún considerables. Por otro lado, las membranas pueden diferenciarse significativamente en su estructura y constitución y su comportamiento funcional es diferente, cualquier cambio puede modificar su estructura

y consecuentemente reducir la eficiencia de remoción del contaminante, por esto los materiales de membrana, su comportamiento en el biorreactor y su afinidad con el microorganismo adherido, son temas que ameritan aún ser investigados.

LITERATURA CITADA

Aksu, Z., and S. Tezer. 2000. Equilibrium and kinetic modeling of biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature. *Process Biochem.* 36:431-439.

Aksu, Z., N. Kilic, S. Ertugrul, and G. Dönmez. 2007. Inhibitory effects of chromium (VI) and Remazol Black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 40:1167-1174.

Alvarez, M. 2006. Enhancement of sulphide production in anaerobic packed bed bench-scale biofilm reactors by sulphate reducing bacteria. *Biotechnol. Lett.* 28:175-181.

Banat, I.M., P. Nigam, D. Singh, and R. Marchant. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresour. Technol.* 58:217-227.

Bhat, T.R., D. Venkataramani, V. Ravi, and C. Murty. 2006. An improved differential evolution method for efficient parameter estimation in biofilter modeling. *Biochem. Eng. J.* 28:167-176.

Canovas-Diaz, M., and J.A. Howell. 1988. Stratified mixed culture biofilm model for anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 32:348-355.

Cerniglia, C.E., and J.B. Sutherland. 2006. Relative roles of bacteria and fungi in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and bioremediation of contaminated soils. p. 182-211. *In* Gadd, G.M. (ed.) *Fungi in biogeochemical cycles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Cho, K.S., H. Ryu, and N. Lee. 2000. Biological deodorization of hydrogen sulphide using porous lava as a carrier of *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biosci. Bioeng.* 90:25-31.

Choi, J.H., Y. Kim, and J. Choi. 2007. Reductive dechlorination and biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol using sequential permeable reactive barriers: Laboratory Studies *Chemosphere* 67:1551-1557.

Dalfard, A., K. Khajeh, M. Soudi, H. Manesh, B. Ranjbar, and R. Sajedi. 2006. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* 39:1409-1416.

Darling, W.G., and D.C. Gooddy. 2007. Assessing the applicability of global CFC and SF₆ input functions to groundwater dating in the UK. *Sci. Total Environ.* 387(1-3):353-362.

Derwent, R.G., P. Simmonds, B. Grealley, S. O'doherty, A. McCulloch, A. Manning, *et al.* 2007. The phase-in and phase-out of European emissions of HCFC-141b and HCFC-142b under the Montreal Protocol: Evidence from observations at Mace Head, Ireland and Jungfraujoch, Switzerland from 1994 to 2004. *Atmos. Environ.* 41:757-767.

Fang, S., and Y. Mu. 2007. NO_x fluxes from three kinds of agricultural lands in the Yangtze Delta, China. *Atmos. Environ.* 41:4766-4772.

Freitas dos Santos, L.M., P. Pavasant, L.F. Strachan, E.N. Pistikopoulos, and A.G. Livingston. 1997. Membrane attached biofilms for waste treatment—fundamentals and applications. *Pure Appl. Chem.* 11:2459-2469.

Gabriel, D., and M.A. Deshusses. 2003. Performance of a full-scale biotrickling filter treating H₂S at a gas contact time of 1.6 to 2.2 seconds. *Environ. Progr.* 22:111-118.

Gadd, G. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 111:3-49.

Garner, L.G., and T.A. Barton. 2002. Biofiltration for abatement of VOC and HAP emissions. *Met. Finish.* 100(11):12-18.

Gnanamani, A.M., M. Jayaprakashvel, and S. Arulmani. 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme Microb. Technol.* 38:1017-1021.

Ho, K.L., Y. Cheng, and C. Tseng. 2007. Continuous deodorization and bacterial community analysis of a biofilter treating nitrogen-containing gases from swine waste storage pits. *Biores. Technol.* 8:2757-2765.

Huang, Q. 2003. Effects of several low-molecular weight organic acids and phosphate on the adsorption of acid phosphatase by soil colloids and minerals. *Chemosphere* 52:571-579.

Jarosz-Wilkolazka, A., M. Graz, B. Braha, S. Menge, D. Schlosser, and G.J. Krauss. 2006. Species-specific Cd-stress response in the white rot basidiomycetes *Abortiporus biennis* and *Cerrena unicolor*. *Biometals* 19:39-49.

Jin, L., W. Lee, C.H. Lee, I.S. Chang, X. Huang, and T. Swaminathan. 2006. Effect of DO concentration on biofilm structure and membrane filterability in submerged membrane bioreactor. *Water Res.* 40:2829-2836.

Jin-Ying, X., H. Hong-Ying, Z. Hong-Bo, and Q. Yi. 2005. Effects of adding inert spheres into the filter bed on the performance of biofilters for gaseous toluene removal. *Biochem. Eng. J.* 23:123-130.

Jung, H., F. Xu, and K. Li. 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme Microb. Technol.* 30:161-168.

Kapdan, I., F. Kargi, G. McMullan, and R. Marchant. 2000. Comparison of white rot fungi cultures for decolourisation of textile dyestuffs. *Bioprocess Eng.* 22:347-251.

Khayet, M. 2003. The effects of air gap length on the internal and external morphology of hollow fiber membranes. *Chem. Eng. Sci.* 58:3091-3104.

Kim, D., and G.A. Sorial. 2007. Role of biological activity and biomass distribution in air biofilter performance. *Chemosphere* 66:1758-1764.

Kinney, K.A., C.A. Plessis, E.D. Schroeder, D. Chang, and K.M. Scow. 1996. Optimizing microbial activity in a directionally switching biofilter. p. 150-157. Conference on biofiltration, University of Southern California, Davis, California, USA.

Kirby, N. 1999. Bioremediation of textile industry wastewater by white rot fungi. 90 p. Ph.D. Thesis. University of Ulster, Coleraine, UK.

Koe, L.C.C., L. Wu, Y. Loo, and Y. Wu. 2001. Field trial testing of a biotrickling filter for sewage odour control. p. 902-950. A&WMA's 94th Annual Conference & Exhibition, Orlando. 24-28 June. The Air & Waste Management Association, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

Kosaric, N., and R. Blaszczyk. 1991. Aerobic granular sludge and biofilm reactors. Adv. Biochem. Eng. 41:28-31.

Kunla, M., B. Novotný, and K. Svobodová. 2007. The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. Biores. Technol. 98:2109-2115.

Lee, T.H., H. Aoki, Y. Sugano, and M. Shoda. 2000. Effect of molasses on the production and activity of dye decolorizing peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec1. J. Biosci. Bioeng. 89:545-549.

Li, X., and X. Wang. 2006. Modeling of membrane fouling in a submerged membrane bioreactor. J. Membrane Sci. 278:151-161.

Luke, A.K., and S.G. Burton. 2001. A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. Enzyme Microb. Technol. 29:348-356.

Malato, S. 2003. Applied studies in solar photocatalytic detoxification: an overview. Solar Energy 75:329-336.

Mandel, S. 2007 Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) differentially interacts with chromatin to regulate genes essential for embryogenesis. Dev. Biol. 303:814-824.

McCulloch, A., P.M. Midgley, and A.A. Lindley. 2006. Recent changes in the production and global atmospheric emissions of chlorodifluoromethane (HCFC-22). Atmos. Environ. 40:936-942.

Miller, M., and D. Grant. 2005. Modeling transport and degradation of hydrophobic pollutants in biofilter biofilms. Chem. Eng. J. 113:197-204.

Montgomery, R. 2004. Development of biobased products. *Biores. Technol.* 91:1-29.

Novotny, C., P. Erbanova, T. Cajthaml, N. Rothschild, C. Dosoretz, and V. Sasek. 2000. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:850-853.

Nukunya, T., J.S. Devinny, and T.T. Tsotsis. 2005. Application of a pore network model to a biofilter treating ethanol vapor. *Chem. Eng. Sci.* 60:665-675.

Osma, J.F., J. Toca Herrera, and S. Rodríguez Couto. 2007. Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. *Dyes Pigments* 75:32-37.

Pedroza, A. 2007. Sequential treatment via *Trametes versicolor* and UV/TiO₂/RuxSey to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. *Chemosphere* 67:793-801.

Prasad, K.K., S. Venkata Mohan, R. Sreenivas Rao, P. Ranjan Bikas, and P.N. Sarma. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochem. Eng. J.* 24:17-26.

Qui, D. 2007. Decline in the concentrations of chlorofluorocarbons (CFC-11, CFC-12 and CFC-113) in an urban area of Beijing, China. *Atmospheric Environment* (in review).

Raghavarao, K.S., T.V. Ranganathan, and N.G. Karanth. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13:127-135.

Rajeswari, K.V., M. Balakrishnan, A. Kansal, K. Lata, and V.N. Kishore. 2000. State of the art of anaerobic digestion technology for industrial waste water treatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 4:135-156.

Ramos, J.L. 2005. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Environ. Biotechnol.* 16:275-281.

.Robles, A., L. Rosario, M. Martínez-Cañamero, N. Omar, R. Pérez, and A. Gálvez. 2002. Characterization of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme Microb. Technol.* 31:516-522.

Rosales, E., S. Rodriguez Couto, and M. Sanromán. 2007. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme Microb. Technol.* 40:1286-1290.

Sahinkaya, E., and F. Dilek. 2007. Effect of feeding time on the performance of a sequencing batch reactor treating a mixture of 4-CP and 2,4-DCP. *J. Environ. Manage.* 83:427-436.

Savant, D.V., R. Rahman, and D.R. Ranade. 2006. Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Biores. Technol.* 97:1092-1104.

Smet, E., G. Chasaya, H. Van Langenhove, and W. Verstraete. 1996. The effect of inoculation and the type of carrier material used on the biofiltration of methyl sulphides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:293-298.

Soccol, C.R., A.L. Woiciechowski, S. Vandenberghe, M. Soares, G.K. Neto, and V. T.Soccol. 2003. Biofiltration: an emerging technology. *Indian J. Biotechnol.* 2:396-410.

Solomon, U.M., and T.E. Sundaram. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases, *Chem. Rev.* 96:2563-2605.

Sorial, G.A., F.L. Smith, M.T. Suidan, A. Pandit, P. Biswas, and R.C. Brenner. 1998. Evaluation of trickle-bed air biofilter performance for styrene removal. *Water Res.* 32:1593-1603.

Sugimori, D., R. Banzawa, M. Kurozumi, and I. Okura. 1999. Removal of disperse dyes by the fungus *Cunninghamella polymorpha*. *J. Biosci. Bioeng.* 87:252-254.

Sun, D., C. Hay, and S. Khor. 2006. Effects of hydraulic retention time on behavior of start-up submerged membrane bioreactor with prolonged sludge retention time. *Desalination* 195:209-225.

Tartakovsky, B.2005. Degradation of trichloroethylene in a coupled anaerobic–aerobic bioreactor: Modeling and experiment. *Biochem. Eng. J.* 26:72-81.

Tran, T., S. Gray, R. Naughton, and B. Bolto. 2006. Polysilicato-iron for improved NOM removal and membrane performance. *J. Membrane Sci.* 280:560-571.

Ünyayar, A., M. Mazmanci, H. Ataç, E. Erkurt, and G. Coral. 2005. A Drimaren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia troglia*: one step isolation and identification. *Enzyme Microb. Technol.* 36:10-16.

Verdin, A. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 53:65-70.

Vladislavljević, G.T., M. Shimizu, and T. Nakashima. 2006. Production of multiple emulsions for drug delivery systems by repeated SPG membrane homogenization: Influence of mean pore size, interfacial tension and continuous phase viscosity. *J. Membrane Sci.* 284:373-383.

Wang, L., and X. Wang. 2006. Study of membrane morphology by microscopic image analysis and membrane structure parameter model. *J. Membrane Sci.* 283:109-115.

Whiteley, C., and D. Lee. 2006. Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme Microb. Technol.* 38:291-316.

Xu, F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35:7608-7614.

Yang, Y.H., and E.R. Allen. 1994. Biofiltration control of hydrogen sulphide 1. Design and operational parameters. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 44:863-868.

Cuadro 1. Principales compuestos químicos contaminantes y su acción en el ecosistema.**Table 1. Main chemical pollutant agents and their action in the ecosystem.**

Compuesto químico	Acción en el ecosistema	Referencia
Clorofluorocarbonos (CFCs)	Rompen moléculas de ozono (O ₃) y las transforman en oxígeno y monóxido de cloro.	Darling y Gooddy, 2007; Qui, 2007
Hidroclorofluoruro-carbonados (HCFCs)	Interviene en la transformación de oxígeno en monóxido de carbono.	McCulloch <i>et al.</i> , 2006; Derwent <i>et al.</i> , 2007
Óxido nitroso (NO _x)	Genera lluvia ácida, reacciona con el agua de la atmósfera formando ácidos sulfúrico y nítrico.	Fang y Mu, 2007
Hidrocarbonos policíclicos aromáticos (PAHs)	Se forman como consecuencia de la combustión incompleta de la materia orgánica, son mutagénicos y carcinogénicos. El componente clorado ingresa a la estructura membranaria celular, modificando las funciones de regulación intra y extracelulares.	Verdin, 2004; Whiteley y Lee, 2006
Clorofenoles	Compuestos orgánicos persistentes, que en su molécula contienen uno o más átomos de cloro. Son cancerígenos y tienen efecto sobre los sistemas inmunológico, reproductivo y nervioso. A nivel celular producen trastornos metabólicos y daños en el sistema enzimático.	Savant <i>et al.</i> , 2006; Choi <i>et al.</i> , 2007; Sahinkaya y Dilek, 2007

Cuadro 2. Microorganismos productores de laccasa.

Table 2. Microorganisms producers of laccasa.

Microorganismo	Tipo	Referencia
<i>Trametes pubescens</i>	Hongo de putrefacción blanco	Osma <i>et al.</i> , 2007
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomycete	Prasad <i>et al.</i> , 2005
<i>Cerrena unicolor</i>	Hongo de putrefacción blanco	Jarosz-Wilkolazka <i>et al.</i> , 2006
<i>Abortiporus biennis</i>	Hongo de putrefacción blanco	Jarosz-Wilkolazka <i>et al.</i> , 2006
<i>Bjerkandera</i> spp.	Hongo de putrefacción blanco	Novotny <i>et al.</i> , 2000; Cerniglia y Sutherland, 2006
<i>Coriolopsis</i> spp.	Hongo de putrefacción blanco	Novotny <i>et al.</i> , 2000; Cerniglia y Sutherland, 2006
<i>Irpex</i> spp.	Hongo de putrefacción blanco	Novotny <i>et al.</i> , 2000; Cerniglia y Sutherland, 2006
<i>Phanerochaete</i> spp.	Hongo de putrefacción blanco	Novotny <i>et al.</i> , 2000; Cerniglia y Sutherland, 2006
<i>Pleurotus</i> spp.	Hongo de putrefacción blanco	Novotny <i>et al.</i> , 2000; Cerniglia y Sutherland, 2006
<i>Trametes versicolor</i>	Hongo de putrefacción blanco	Cerniglia y Sutherland, 2006; Akzu <i>et al.</i> , 2007
<i>Neurospora crassa</i>	Ascomycete	Luke y Burton, 2001
<i>Hirschioporus laricinus</i>	Hongo de putrefacción blanco	Banat <i>et al.</i> , 1996;
<i>Inonotus hispidus</i>	Hongo de putrefacción blanco	Banat <i>et al.</i> , 1996; Kirby, 1999
<i>Phlebia tremellosa</i>	Hongo de putrefacción blanco	Banat <i>et al.</i> , 1996; Kirby, 1999
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hongo de putrefacción blanco	Banat <i>et al.</i> , 1996; Kirby, 1999
<i>Funalia trogii</i>	Hongo de putrefacción blanco	Ünyayar <i>et al.</i> , 2005
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hongo de putrefacción blanco	Gnanamani <i>et al.</i> , 2006
<i>Coriolus versicolor</i>	Hongo de putrefacción blanco	Kapdan <i>et al.</i> , 2000
<i>Cunninghamella polymorpha</i>	Hongo de putrefacción blanco	Sugimori <i>et al.</i> , 1999
<i>Geotrichum candidum</i>	Hongo de putrefacción blanco	Lee <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Hongo de putrefacción blanco	Aksu y Tezer, 2000
<i>Fusarium solani</i>	Hongo de putrefacción blanco	Verdin, 2004
<i>Dichomitus squalens</i>	Hongo de putrefacción blanco	Kunla <i>et al.</i> , 2007
<i>Trichophyton rubrum</i>	Hongo de putrefacción blanco	Jung <i>et al.</i> , 2002
<i>Trametes hirsuta</i>	Hongo de putrefacción blanco	Rosales <i>et al.</i> , 2007
<i>Chalara</i> (syn. <i>Thielaviopsis</i>) <i>paradoxa</i>	Hyphomycete	Robles <i>et al.</i> , 2002
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hongo de putrefacción blanco	Gnanamani <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus</i> spp.	Bacteria	Dalfard <i>et al.</i> , 2006

Cuadro 3. Características estructurales más importantes de sistemas membrenarios asociados a microorganismos productores de laccasa.

Table 3. The most important structural characteristics of membrane systems associated to microorganisms producers of laccasa.

Característica estructural	Justificación	Referencia
Morfología y tamaño medio de los poros	Expresados generalmente mediante un factor de forma y un valor de radio o de diámetro de poro equivalente.	Wang y Wang, 2006; Vladislavljević <i>et al.</i> , 2006
Densidad superficial de poros	Distribución de números de poros por unidad de área en un sistema membrenario.	Tran <i>et al.</i> , 2006
Porosidad en volumen	Fracción del volumen total de membrana que está ocupada por los poros o huecos.	Khayet, 2003; Wang y Wang, 2006
Tortuosidad	En general los poros no son cilíndricos y uniformes, de forma que el área ocupada en la superficie no se corresponde después con el volumen ocupado en el interior de la membrana.	Li y Wang, 2006; Sun <i>et al.</i> , 2006
Distribución estadística de tamaños de poro	Se presenta una no uniformidad en las características físicas de los poros y en su distribución en el sistema membrenario.	Khayet, 2003; Wang y Wang, 2006

Cuadro 4. Materiales de soporte utilizados en reactores asociados con matriz membranaria.

Table 4. Support materials used in reactors associated with membrane matrix.

Materiales naturales	Referencia
Materiales térreos	Smet <i>et al.</i> , 1996
Compostaje	Cho <i>et al.</i> , 2000
Materiales térreos musgosos	Yang y Allen, 1994
Astillas de madera	Cho <i>et al.</i> , 2000;
Rocas de lava	Nukunya <i>et al.</i> , 2005
Materiales sintéticos	
Soporte cerámico	Gabriel y Deshusses, 2003
Filtro de polietileno	Sorial <i>et al.</i> , 1998
Filtro de poliuretano	Koe <i>et al.</i> , 2001
Espuma	Kinney <i>et al.</i> , 1996
Carbón activado granular	Ho <i>et al.</i> , 2007
Peletizados de tierra diatomacea extrusada	Kim <i>et al.</i> , 2005; Kim y Sorial, 2007

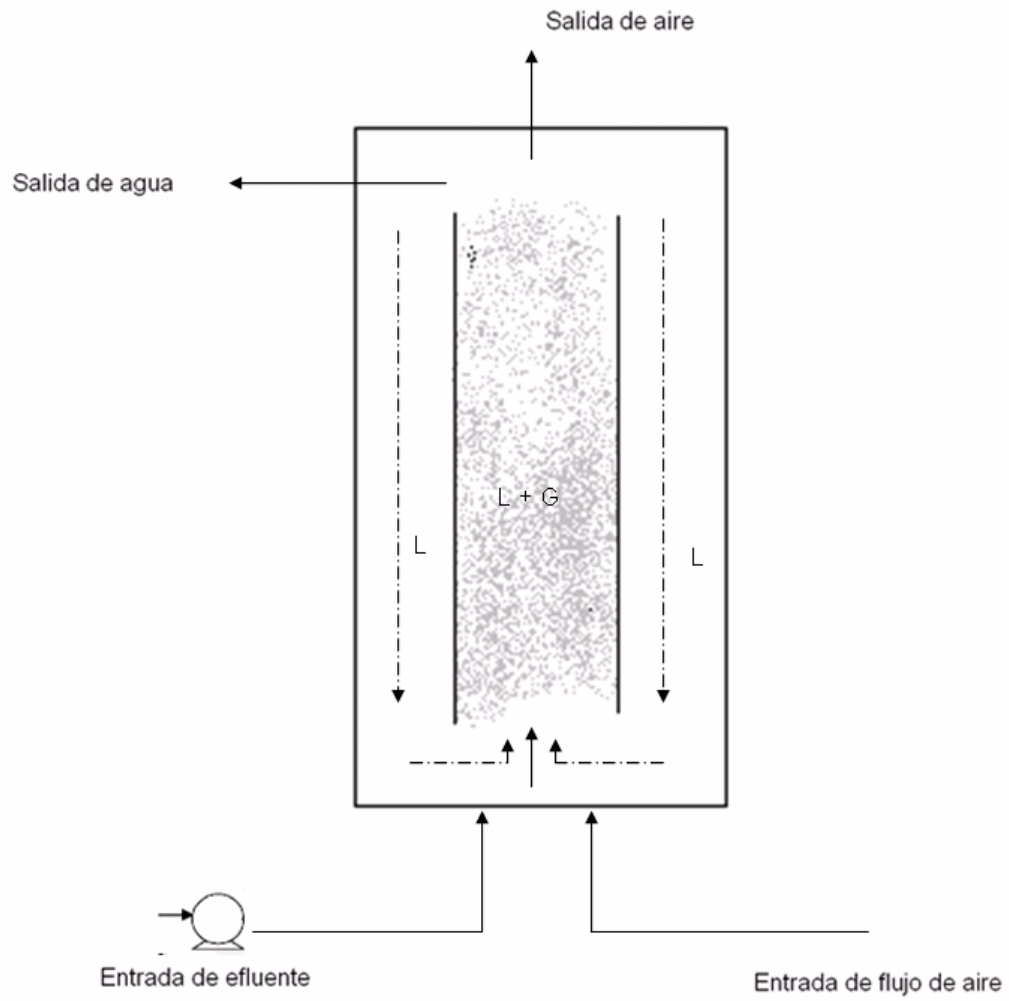


Figura 1. Reactor con membrana inmovilizada. L: líquido, G: gas.

Figure 1. Reactor with immobilized membrane. L: liquid, G: gas.

Fuente: Rajeswari *et al.* (2000)

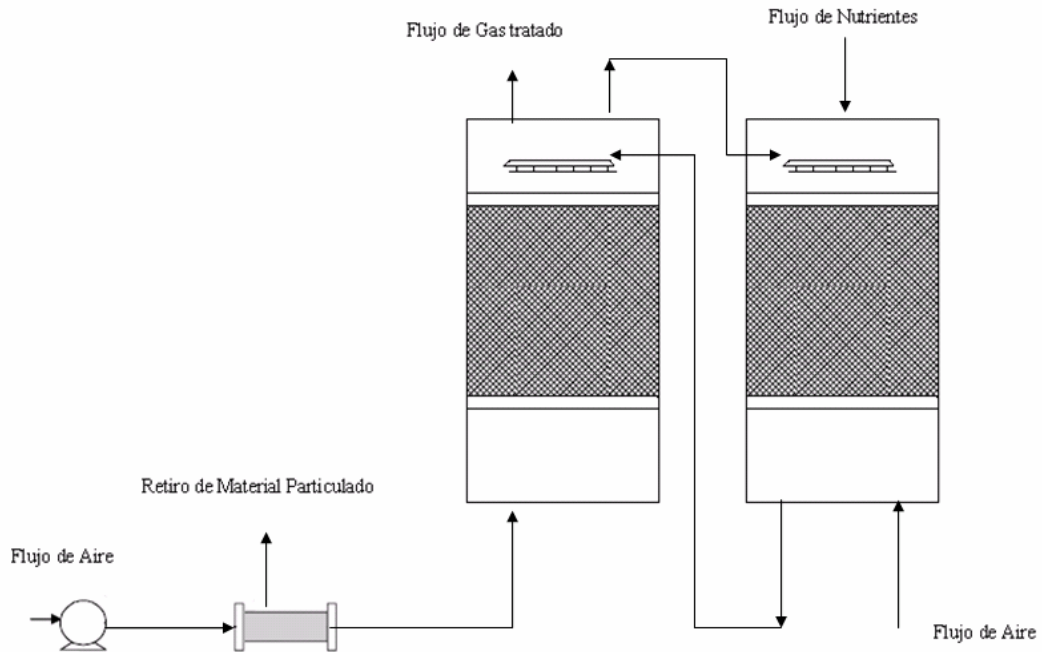


Figura 2. Sistema de biolimpiador con recirculación de flujos en los módulos de filtro convencional y reactor.

Figure 3. Bioscrubber system with recirculation of flows in the modules of conventional filter and reactor.

Fuente: adaptado de Freitas dos Santos *et al.* (1997).

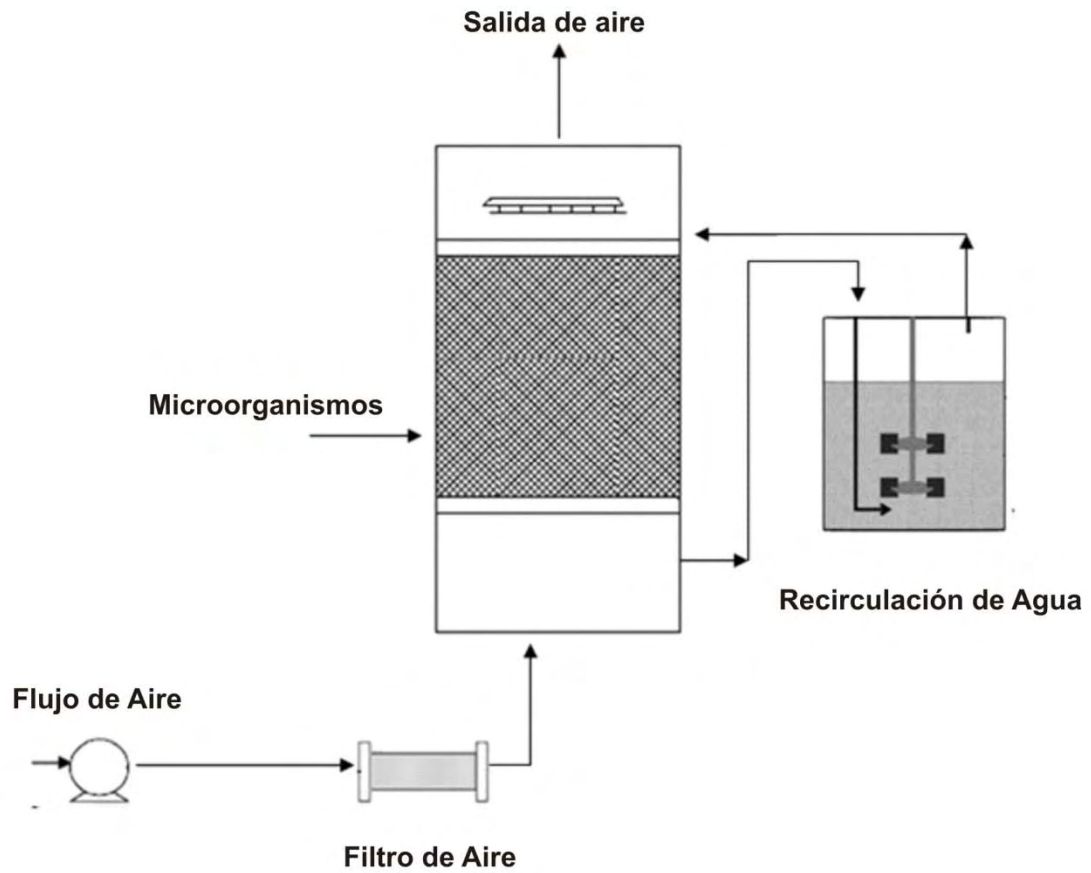


Figura 3. Biodosificador con una recirculación de agua para procesos de humidificación.

Figures 3. Biotrickling (biodispenser) with a recycling of water for humidification processes

Fuente: Adaptado de Soccol *et al.* (2003)