



SANEAMIENTO BIOLÓGICO DE SUELOS

Fritz Räuchle y Alfredo Torrico
Pontificia Universidad Católica del Perú
Instituto de Estudios Ambientales (IDEA-PUCP)
Apartado 1761, Lima 100, Perú

RESUMEN

Este trabajo reúne el fondo científico de una tecnología cada vez más usada para descontaminar suelos con compuestos orgánicos mediante la biología aplicada. Este método natural se favorece por las condiciones suaves inherentes a los procesos biológicos. Se describen los procesos de degradación.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos exhibe la particularidad de que habitualmente está fijada a una sola fase sólida, inmóvil y por eso que se puede planificar mejor su tratamiento adecuado, mientras contaminaciones de líquidos (normalmente ríos, lagos o mar) y gases (casi exclusivamente aire) representan sistemas muy móviles lo que dificulta limitar el daño ecológico al área inicialmente afectada y por ende la estimación del riesgo ambiental en general y para la salud humana en particular.

Hoy en día es habitual la clasificación del saneamiento biológico de suelos (SBS) como ecológico y económico. El saneamiento químico, intentado hace muchos años, desapareció a favor de uno microbiológico. Es sorprendente la capacidad de los microorganismos de degradar material orgánico natural y antropogénico.

El SBS abarca las siguientes tareas que confluyen para llegar a un método integral:

- microbiología del suelo
- biotecnología
- ecotoxicología
- analítica química

Como sectores auxiliares mencionamos

- enriquecimiento y
- aislamiento de microorganismos

Separando el SBS en métodos *in situ* y *ex situ* agregamos adicionalmente la utilización de hongos y plantas.

Existe una lista de elementos y compuestos (orgánicos e inorgánicos) que reúne los valores máximos tolerables de un total 72 especies y parámetros sumarios en el caso de suelos y aguas subterráneas.

Queda también establecido que los valores "ideales" de la lista no siempre se pueden conseguir en un SBS, entonces las autoridades vigilantes optan por restringir el uso del área contaminada, por ejemplo, no permitir el cultivo de plantas de panllevar o convertir una zona contaminada de una urbanización en parque o no dar licencia para una construcción.

En la tabla 1 se dan algunos valores orientativos de un suelo no contaminado.

Tabla 1. Valores analíticos promedios de un suelo natural.

Parámetros	Unidades físicas en mg/L o mS/m*
TOC	< 20
As	< 0,04
Pb	< 0,04
Cd	< 0,005
Cr total	< 0,05
Cu	< 0,1
Ni	< 0,001
Hg	< 0,5
Zn	< 0,05
CN ⁻	< 0,01
Fenoles	
Conductividad*	< 300*

(TOC = total organic carbon, micro Siemens/m es una unidad de conductividad)

Estos valores mencionados son los máximos permitidos internacionalmente.

Interesante es mencionar dos hechos:

Hidrocarburos como gasolina ($\approx C_8H_{18}$) se comportan químicamente como un plástico hecho de polietileno (o polipropileno) o ceras.

Los dos citados son permitidos en la fabricación de envolturas para comestibles (leche comercializada en plásticos véase por ejemplo [1]).

Por otro lado, como los hidrocarburos de bajo peso molecular son fácilmente biodegradables [2], accidentes con gasolina y similares no son tan trágicos como, por ejemplo, un accidente con compuestos o derivados de cromo.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO DE CONTAMINACIÓN

La estrategia para poder clasificar un suelo en contaminado o no abarca siete puntos:

- obtención de testigos del suelo con un ϕ de ~ 50 mm (~ 100 testigos por hectárea)
- extracción de una muestra del suelo de 500 mL (cada metro)
- extracción directa de una muestra gaseosa del suelo
- confección de un mapa sobre el flujo de las aguas subterráneas
- extracción de agua subterránea (directamente mediante bombeo)
- determinación del caudal subterráneo (mediante bombeo de hasta 48 horas de duración)
- análisis químico de
 - a) aire del suelo
 - b) extracción acuosa del suelo
 - c) agua subterránea (para determinar el área a ser saneada)

Eventualmente se realizan estudios bacteriológicos.

Las muestras del suelo se deben analizar con pocos días de almacenaje (a temperaturas bajas) por razones evidentes.

Todos los análisis mencionados han de permitir delimitar el área en cuestión, en extensión y profundidad (= masa total del suelo a ser descontaminado).

Hay que conocer muy bien la granulometría del suelo, su compacticidad en lo que equivale a la posible migración de iones y agua en los sentidos vertical y horizontal.

Estos tres parámetros definen a su vez la llegada o no de reactivos necesarios para el SBS. Pueden ser nutrientes para los microorganismos o estos mismos.

El proceso de saneamiento puede durar de 5 – 6 años, dependiendo entre otros factores de la temperatura del terreno. A este proceso lo acompañan análisis continuos para documentar el progreso o no de las medidas tomadas [3]. Naturalmente un proceso *in situ* es mucho mejor que los *off site* porque en los últimos casos el terreno excavado se mezcla involuntariamente y el resultado del control analítico se vuelve dudoso.

Aunque los estudios de contaminación habitualmente desembocan en un SBS con microorganismos implantados se debe resaltar el hecho de que en algunos casos los cultivos bacterianos comerciales específicos pueden contener involuntariamente especies muy riesgosas para la salud humana o sea gérmenes patógenos que causan severos problemas de salud a los involucrados directos en el SBS.

Por otro lado, hay que controlar continuamente si los microorganismos utilizados causan la aparición de productos degradados ya, pero potencialmente tóxicos.

En algunos casos raros se usan para la degradación biológica bacterias que pueden causar enfermedades a los humanos. Vacunación preventiva entre los encargados del SBS es indispensable.

Sin embargo, estos comentarios no deben desanimar a las autoridades que vigilan el saneamiento. La conclusión de “no hacer nada” será la opción más criticable.

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE SUELOS

La caracterización de la población bacteriana en los suelos (sean naturales o contaminados) es un paso previo indispensable para poder proceder correctamente en la cuantificación de la actividad microbiana.

La cuantificación sola de la población es insuficiente porque si la bacteria no degrada, aunque esté presente en cantidades grandes, todo el proceso planificado no servirá de nada.

Como el contenido en agua del suelo influye marcadamente en el metabolismo bacteriano presentamos primero un método para la determinación de la cantidad del agua presente.

Determinación de la capacidad de retención de agua de un suelo

200 g de una mezcla representativa del suelo se dividen en varias porciones que se transfieren a unos cilindros (metálicos, de vidrio o de plástico) de unos tres cm de diámetro; se cierra un extremo con un tejido fino que retiene las partículas del suelo. Se pesa la masa del suelo utilizado (peso neto) y también todo el peso del cilindro con el suelo en su interior (peso bruto). Después se coloca el cilindro en un vaso con agua y se dejan actuar las fuerzas de la adsorción durante dos horas, cuidando que el nivel del agua concuerde con el nivel del suelo.

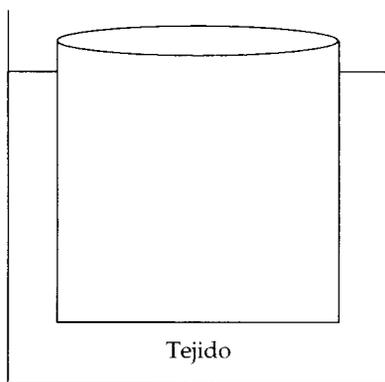


Figura 1. Capacidad de adsorción de humedad por suelo

Después de las dos horas se coloca el cilindro en arena saturada de agua. La granulometría de la arena puede ser de 0,1 – 7 mm de diámetro. Se tapa el recipiente, se esperan tres horas y se pesa el cilindro.

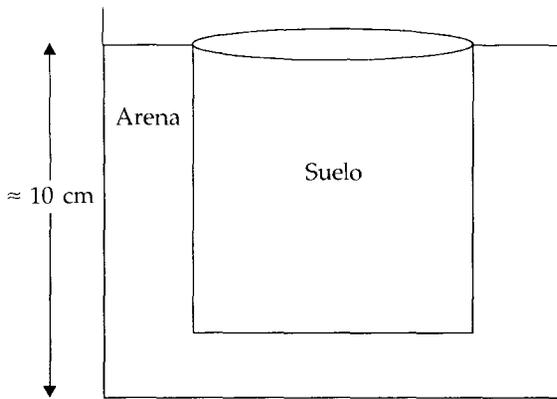


Figura 2. Saturación del suelo en equilibrio

La capacidad máxima de retención de agua está definida como:

$$\text{CRA} \frac{A + B}{C} = \bullet 100 = \text{adsorción de agua} / 100 \text{ g de suelo seco.}$$

Siendo

- CRA = 100% capacidad de retención de agua
- A = adsorción de agua de 100 g de suelo natural
- B = contenido de agua en 100 g de suelo natural
- C = peso del suelo natural seco
- D = capacidad de retención de agua (en %)

La determinación del peso de un suelo seco se efectúa como sigue:

- a) entre 20–100 g de suelo natural (tres muestras) se secan durante 24 h a 105 °C.
- b) En el caso de que el suelo esté contaminado con hidrocarburos se le seca a 45 °C sobre P₂O₅ durante 48 horas.
- c) Si el suelo natural está más que saturado (quiere decir, cuando hay fase líquida visible) se le almacena a temperatura ambiente y se le pesa después de 2 días.

Determinación de la actividad metabólica de las bacterias

Ya se resaltó que la cantidad de bacterias no es necesariamente un indicio de una degradación posible de contaminantes, porque si se vuelven inactivas no habrá consumo de contaminantes. Así es menester determinar su actividad que se manifiesta en el consumo de oxígeno o producción de CO_2 .

Se llama “respiración basal de suelo” la actividad bacteriana en un suelo sin adición de nutrientes. “Respiración potencial” se define como actividad con la presencia de un substrato artificial, por ejemplo, glucosa.

Los aparatos que se usan, llamados “respirómetros”, se conocen ya en la técnica de depuración de aguas residuales. Se basan en lo siguiente:

En un baño termostatzado se coloca una fuente de oxígeno (= celda de electrólisis) . Al “matraz de reacción” (de unos 250 ml y que contiene la muestra de suelo) llega el oxígeno que estimula la actividad bacteriana que a su vez produce la formación de CO_2 que es adsorbido por Natronkalk. Todo este sistema está herméticamente cerrado.

La presión de oxígeno en el matraz de reacción se mide con un sensor que activa la celda electrolítica siempre y cuando la presión haya bajado en un 7 – 10 mm de columna de agua, por el consumo provocado por la respiración bacteriana. El oxígeno producido hace aumentar la presión y el sistema se desactiva.

Una computadora registra el tiempo de la electrólisis versus el tiempo total pasado y de esta forma se documenta la actividad bacteriana, como consumo de oxígeno acumulado.

Una receta típica para la determinación de la actividad bacteriana es:

100 g de suelo secado al ambiente, se mezcla con 1000 mg de glucosa, 150 mg de NH_4Cl y 20 mg de K_2HPO_4 (C:N:P = 100:10:1). La mezcla se coloca en el respirómetro. Durante 24 h y a 22 °C se registra

el consumo de oxígeno. Este valor se compara con una muestra en blanco, sin adición de glucosa.

Ojo: El tiempo de incubación puede ser de hasta 7 días.

La valorización de la respiración es la siguiente:

Si no hay cambio de actividad bacteriana, en presencia de glucosa, se concluye que hay contaminación que impide esta actividad.

Datos referenciales son: 100 g de suelo "respiran" 0,4 mg de O₂ por día o producen 0,5 mg de CO₂. En presencia de glucosa estos valores aumentan a 4,0 mg de O₂ y 5,0 mg de CO₂ respectivamente [4].

Otros métodos para la determinación de la actividad bacteriana se basan en la reducción del DMSO o en la evolución de calor y se describen en [5].

La cuantificación de la población bacteriana requiere una capacitación biológica que los autores no poseen. Prescindimos, por eso, de la descripción de los métodos correspondientes. Se pueden obtener en [5].

DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE PRODUCTOS ORGÁNICOS, ECOLÓGICAMENTE NOCIVOS

Generalidades

El SBS radica en el desarrollo de la capacitación natural de microorganismos de poder degradar compuestos orgánicos nocivos.

Estos compuestos pueden servir como fuente de carbono o de energía para el metabolismo bacteriano, consumiendo (degradando) de estas formas los contaminantes.

La optimación del metabolismo natural bacteriano mediante condiciones vitales óptimas (como temperatura, suministro de nutrientes, aireación, presencia de agua, pH y aceptor de electrones) forma el fundamento del SBS [6].

Las condiciones de crecimiento bacteriano óptimo se desarrollan en el laboratorio y se transfieren después a escala industrial.

La **degradación biológica** se puede definir como suma de todos los procesos bioquímicos que catalizan los microorganismos bajo condiciones aerobias o anaerobias y lleva a una reducción de la concentración de los compuestos nocivos. Se trata de una **mineralización total** de las sustancias en cuestión.

El concepto de la **biotransformación** es un concepto más restringido porque no necesariamente llega a la mineralización total, sino se queda en un estado intermedio que puede representar eventualmente un estado tóxico [7]. A esta categoría pertenecen reacciones del tipo de deshalogenaciones, desaminaciones, descarboxilaciones, metoxilaciones, hidroxilaciones etc.

Algunos compuestos no son biodegradables por falta de enzimas adecuadas, debido a estructuras moleculares particulares. Estos compuestos se llaman persistentes.

Algunos compuestos –de peso molecular bajo o alto– sintetizados por el hombre, no son degradados por su poca solubilidad en agua lo que equivale a su poca **biodisponibilidad** dentro del metabolismo bacteriano. Estos compuestos muestran **carácter xenobiótico**.

La mayor parte de los hidrocarburos relevantes en el sentido ambiental sí son biodegradables bajo condiciones aerobias (en presencia de oxígeno como aceptor de electrones) o anaerobias (sin presencia de aire pero en presencia de aceptores de electrones como nitratos, sulfatos y carbonatos, que se transforman en amoníaco, sulfuro y metano).

Un tercer camino de degradación consiste en la fermentación, durante la cual compuestos orgánicos aceptan electrones.

Algunos productos son más fácilmente degradables bajo condiciones anaerobias, por ejemplo, en los fangos activados de las plantas depuradoras de aguas residuales.

Son 11 los factores que determinan la biodegradabilidad:

- | | |
|-----------------------------|----------------------------|
| * solubilidad en agua | * concentración |
| * estructura molecular | * biodisponibilidad de |
| * número de átomos de C | contaminantes y nutrientes |
| * grado de hidrogenación | * grado de condensación |
| * posición de sustituyentes | * grado de sustitución |
| * valor pH del suelo | * temperatura del suelo |

Los productos de degradación se llaman metabolitos y hace falta saber si los metabolitos producidos por bacterias son tóxicos o no. Una vez contaminado el suelo rápidamente los microorganismos específicos (que pueden aprovechar el contaminante para su ciclo vital) se propagan y pueblan el suelo al 100% [8], siendo los factores colaterales la temperatura del suelo y las propiedades físicas de los contaminantes.

La información genética de las bacterias está localizada en los plásmidos [9]. Es por ello que, en algunos países (USA e Inglaterra), se trabaja en la llamada tecnología genética mientras en otro (Alemania) este tipo de investigación (experimentación) está prohibida bajo pena.

Degradación de hidrocarburos

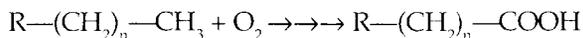
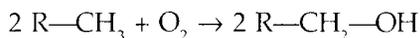
Los hidrocarburos (HC) en cuestión son alifáticos, aromáticos o nafténicos (= asfalto).

Los HC del tipo normal o sea sin ramificación son los que más rápidamente se degradan bajo las condiciones aerobias, hasta 44 carbonos en la cadena. Interesante es que HC con 5 – 10 átomos de carbono pueden actuar como **inhibidores metabólicos**. El arte del SBS radica en la optimización de los 11 factores precitados anteriormente.

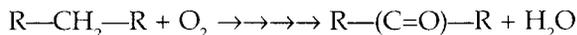
Degradación de hidrocarburos alifáticos (alcanos, iso-alcanos, cicloalcanos)

El petróleo consiste en un 80% de los compuestos citados. La degradación empieza siempre con la oxidación de un grupo terminal metílico formándose grupos alcohólicos o carboxílicos.

El esquema de la oxidación terminal en fórmulas es el siguiente:



Una oxidación subterminal en fórmulas:



(el número de flechas indica las veces que tiene la intervención bacteriana)

Los grupos carbonílicos se oxidan a ácidos carboxílicos (ácidos grasos) y sufren la llamada oxidación b hasta su incorporación en la materia celular bacteriana. El ataque terminal posee una velocidad de reacción bastante más rápida que el subterminal [10].

En la bibliografía especializada [11,12] se puede encontrar la clasificación de las diversas familias bacterianas que son biodegradantes.

Los alcanos de peso molecular bajo se disuelven como lipófilos en la membrana celular de la bacteria y son, por ello, tóxicos para ellos mismos.

Alquenos son más resistentes a la biodegradación que alcanos. La degradación anaerobia de alcanos es rara pero posible.

Cicloalcanos se comportan de forma semejante a los alquenos, no disponemos de datos sobre isoalcanos.

Degradación de compuestos aromáticos

También las sustancias aromáticas son biodegradables. Mediante la ruptura del anillo y la transformación de los compuestos iniciales en ácidos orgánicos los microorganismos pueden abastecerse de átomos de carbono y de sus necesidades energéticas.

Hay una diferencia marcada de la biodegradación entre los compuestos de bajo peso molecular que realizan cultivos bacterianos puros (de una sola especie bacteriana) y la de compuestos aromáticos condensados que efectúan sólo cultivos mixtos.

Casi siempre los derivados bencénicos se degradan vía el difenol-catecol. También el fenol simple se oxida al difenol, antes de ser abierto el anillo [13, 14].

Aquí algunos ejemplos de esta variante de biodegradación:

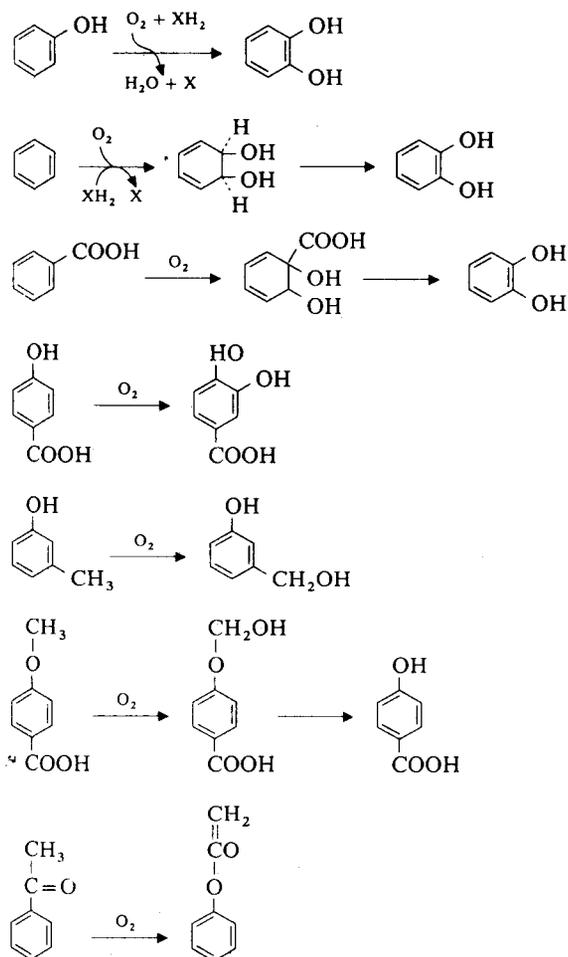


Figura 3. Oxidaciones iniciales de algunos compuestos aromáticos (XH_2 representa la dehidrogenasa bacteriana).

La abertura del anillo sigue el siguiente mecanismo:

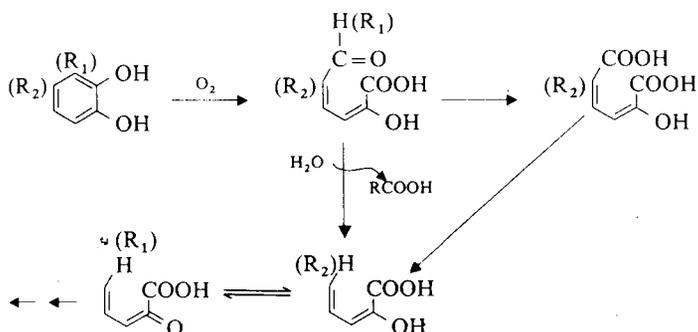


Figura 4. Ruptura meta del anillo bencénico, partiendo del catecol

La ruptura meta es más observada que la orto.

Aquí los mecanismos meta y orto en fórmulas:

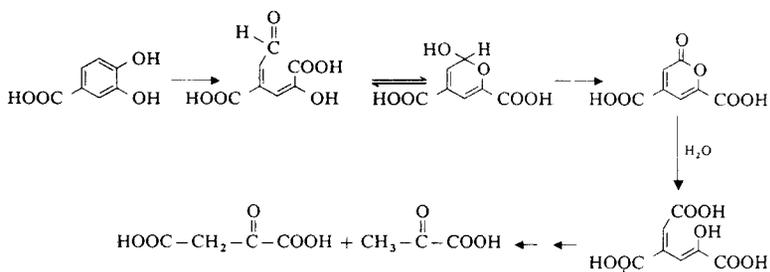


Figura 5. Ruptura meta, partiendo de un ácido aromático

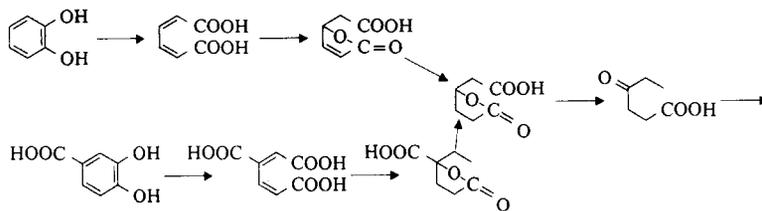


Figura 6. Ruptura orto del anillo bencénico sustituido

No podemos comentar detalles biológicos de estas reacciones químicas por las razones ya expuestas.

También se ha observado la degradación anaerobia de los compuestos aromáticos en presencia de nitratos, sulfatos, carbonatos o sustancias fermentables. Si el anillo lleva sustituyentes halógenos la biodegradación también es factible [10, 15, 16].

Si las bacterias pueden imponer un potencial redox de < -330 mV, los compuestos aromáticos se reducen hasta metano y CO_2 [10]. (El ácido acético como producto intermedio sufre disproporción en metano y CO_2).

En esta situación anaerobia se han detectado dos poblaciones diferentes de bacterias, las que abren el anillo aromático y las de la metanogénesis. [10].

Degradación de hidrocarburos halogenados (HCX)

Los microorganismos pueden degradar HCX, pero cuando se trata de una mezcla de HCX la degradación es lenta y/o incompleta. Algunos de estos hidrocarburos son tóxicos para algunos microorganismos.

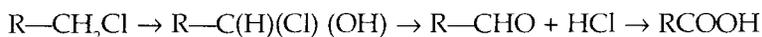
Es justamente por la complejidad de estas reacciones y el conjunto de las poblaciones bacterianas, que intervienen, que se ha investigado mucho sobre los mecanismos de la degradación, la optimización de los parámetros degradantes (relación C:N:P), pH y potencial redox neces-

rios, fuera de las concentraciones máximas (soportables aun) para las bacterias [17, 18].

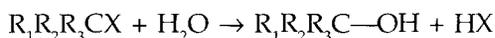
Degradación de componentes alifáticos halogenados

La deshalogenación es enzimática y principalmente se observan 4 caminos de degradación.

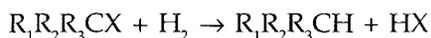
- 1) la deshalogenación oxidante [19]



- 2) la deshalogenación hidrolítica [20]

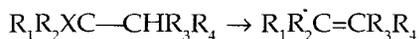


- 3) la deshalogenación reductora [21]



¡Esta variante conduce muchas veces a productos más tóxicos que los eductos!

- 4) la dehidrodehalogenación (remociones simultáneas de hidrógeno y halógeno) [19]



Todos los derivados halogenados del etano usados frecuentemente en la industria pueden degradarlos las bacterias. ¡Hasta el CCl_4 se mineraliza sin problemas dando CO_2 [22]!

Degradación de compuestos aromáticos halogenados

Una gran cantidad de esta familia de sustancias se usa como biocidas, disolventes o para la síntesis de polímeros. Pentaclorofenol, hexaclorobenceno y diclorobenceno contaminan el medio ambiente. Dado que en la síntesis de estos tres compuestos aparecen como subproductos dibenzofuranos y dibenzodioxinas, todos estos productos son sumamente tóxicos [23].

La dificultad en la degradación de estas sustancias parece que radica en la ausencia de posiciones orto libres para el ataque bacteriano (= oxidación inicial enzimática). Sin embargo, eso no significa la imposibilidad de degradación. El producto intermediario de esta degradación es una vez más el catecol, esta vez halogenado, a partir de compuestos intermedios formados anteriormente por la degradación de policloruros de bifenilos.

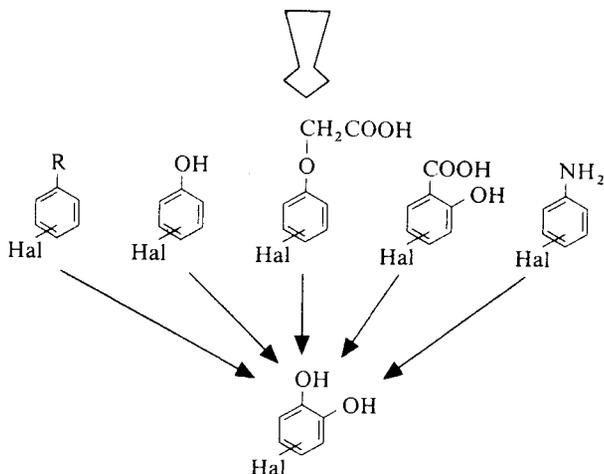


Figura 7. Degradación de precursores hasta el catecol halogenado

Las bacterias pseudomonas –entre otras– pueden crecer utilizando ácidos benzoicos halogenados, del tipo amino, alcoxi, alquilamino y también 1,2 diclorobenceno, anilinas sustituidas y nitrobenzenos.

Enumeramos estos representantes para hacer ver la suma variabilidad de ataque de las pseudomonas [24].

Los peligrosos fenoles policlorados se degradan fácilmente con bacterias (*Rhodococcus*) y la inoculación del suelo contaminado con esta especie ayuda a la acelerada descontaminación respectiva. [25].

Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA)

Esta familia de compuestos condensados de dos o más anillos bencénicos abarca entre otros la naftalina, el fenantreno, el antraceno y el fluoranteno.

Son sustancias poco reactivas y de poca solubilidad en agua lo que lleva consigo poca biodisponibilidad para los microorganismos (solubilidad en agua del fenantreno: 1 mg/l y del benzo(a)pireno: 0,004 mg/l).

Los caminos de degradación son bien conocidos [26].

Mostramos la degradación del antraceno [27]:

Lo fundamental en este camino es la introducción de dos átomos de oxígeno que abre el camino para el aldehído hidroxilado en posición a, el cual es oxidado al ácido carbónico y este a su vez finalmente descarboxilado. De esta forma la degradación de los HPA termina como la de los compuestos aromáticos simples [28]. Existe un camino de degradación adicional en el caso de los HPA. Son hongos que degradan también la lignina y que “comen” de forma inespecífica HPA's [29].

En general, la adsorbilidad de los HPA's en el suelo (ácidos húmicos) es grande y dificulta la descontaminación.

Degradación de los bifenilos clorados

Hace algunos años que escribimos un artículo sobre bifenilos clorados y la contaminación ambiental que causan [30].

Se trata de una familia que posee más de 200 isómeros y que son muy inertes. Sin embargo, bajo condiciones de laboratorio pueden ser mineralizados con facilidad.

Cultivos mixtos son capaces de degradar los bifenilos, pero aparecen dificultades cuando son policlorados y sus posiciones orto están ocupadas [31].

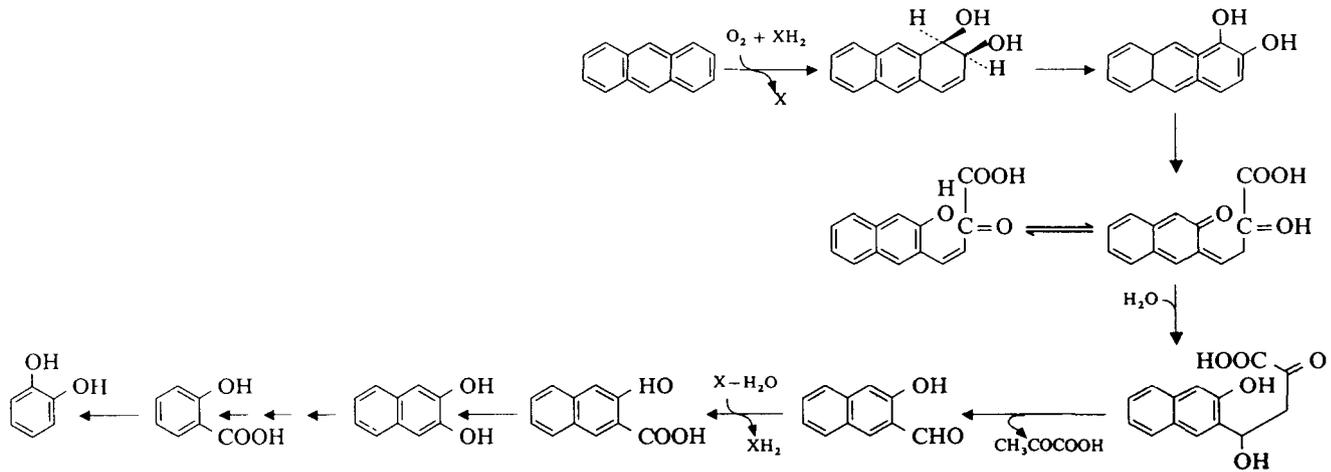


Figura 8. Degradación en fórmulas del antraceno mediante bacterias

El esquema de la degradación es:

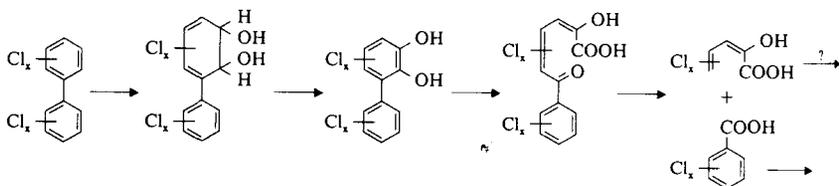


Figura 9. Degradación aerobia bacteriana de los bifenilos policlorados

¡La oxidación hasta del 2,4,5,2',4',5'- hexaclorobifenilo lleva a metabolitos que se enriquecen en el suelo o sea que no se mineralizan más!

Restringiendo el acceso de aire y pasando entonces a condiciones anaerobias sí se los puede degradar efectivamente [32]. Este proceso se puede optimar en biorreactores. Estos reactores representan sistemas de fermentación de los diversos suelos, que, con cantidades reguladas de oxígeno, una cantidad pesada de suelo (≈ 1 kg, no tiene que ser un kg exacto) y una oferta controlada de N y P se someten a la acción bacteriana. Las curvas de degradación son típicas y dejan espacio para interpretar los déficit que sufren las bacterias, según las circunstancias dadas. Estos déficit permiten la optimación de la degradación en el laboratorio.

Interesante es que por mezcla genética de las bacterias se “construyen” los microorganismos aptos para que cubran la degradación completa necesaria para una mineralización total [33].

BIBLIOGRAFÍA

1. Ripper P., Rippen G., Friedrich L., Hollerbach A., *TerraTech*. 1, 35-39, 1993.
2. Hamburger Umweltbericht 32,1991.

3. Heckemanns W., Handbuch Wiedernutzung von Industrie- und Gewerbeflächen mit Altlasten BW: VDO (editor) 43-41-12. Düsseldorf (Alemania) 1993.
4. Laboratory Methods for the Evaluation of Biological Soil Cleaning Processes, 2° Report. DECHEMA (editor) Frankfurt, 1982.
5. Alef K., Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. Editor Ecomed, Landsberg/ Lech (Alemania) 1991.
6. Kappesser S.; Weiss A., International Symposium on Soil Decontamination Using Biological Processes, DECHEMA (editor) Karlsruhe (Alemania) 651-656, 1992.
7. Painter H., A., Organic Micropollutants in the Aquatic Environment. Proceedings of the Fourth European Symposium, 22-24. 10. Viena (Austria). 1985.
8. Slater, J., Lovatt, D., Microbial Degradation of Organic Compounds, Gibson, D., T. (editor) Marcel Dekker Inc., New York, 439-485. 1984.
9. Sayler, G.S. Hooper, S.W., Layton A.C., King J.M.H., *Microb. Ecol.* 1990, 19, 1-20.
10. Rehm, H.J., Reiff, J., Advances in Biochemical Engineering: Fichter, A. (editor) Vol. 19, Editorial Springer Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 175-215.
11. Fäbig, W., Mikrobiologie und Chemie bei der Verunreinigung von Boden- und Grundwasser und Umwelt. Bartz, W., J., Wippler E. (editores) Expert Verlag, Ehningen 1988, 37-64.
12. Cerniglia, C.E., Heitkamp, M.A., en Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment, Varnassi, U. (editor) CRC-Press, Boca Raton 1989, 41-68.
13. Hopper, D.J., Biodegradation. Natural and Synthetic Materials. Betts, W.B. (editor) . Editorial Springer Heidelberg (Alemania).
14. Bayly, R.C., Barbour, M.G., Microbial Degradation of Organic Compounds, Gibson, D.T. (editor) Marcel Dekker Inc., New York, 1984, 253-294.
15. Young, L.Y., en Microbial Degradation of Organic Compounds, Gibson, D.T. (editor) Marcel Dekker Inc. New York, 1984.
16. Häggblom, M., Young, L.Y., *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 3255-3260.
17. Ewers, J., Freier-Schröder, D., Knackmuss, H., *Arch. Microbiol.* 1990, 154, 410-413.
18. Henry, S., Freier-Schröder, D., Gribic-Galic, D., *Microb. Ecol.* 1990, 20, 151-169.

19. Lingens, F., Blecher, H., Blobel, F., Eberspächer J., Fröhner, C., Görisch, H., Layh, G., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988, 35, 26-990.
20. La Roche, S., Leisinger, T. *J. Bacteriol.* 1990, 172, 164-171.
21. Freedman, D.L., Gosett, J.M., *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55, 2144-2151.
22. Cridale, C.S., DeWitt, J.T., Gribic-Galic, Mc Carty, P. L., *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 3240-3246.
23. Hagenmair, H., Fresenius Z. *Anal. Chem.* 1986, 325, 603-606.
24. Springer, W., Rast, H.G., *gwf Wasser/Abwasser* 1987, 129, 70-75.
25. Middeldrop, P.J.M., Briglia M., Salkinoja-Salonen, M. S., *Microb. Ecol.* 1990, 20, 123-139.
26. Weissenfels, W.D., Beyer, M., Klein, J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, 32, 479-484.
27. Mahro B., Kästner, M., *Bio-Engeneering* 1993, 9, 50-58.
28. Weissenfels, W.D., Beyer M., Klein, J., Rehm, H.J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 34, 528-535.
29. Kelly, I., Freeman, J. P., Cerniglia C.E., *Biodegradation* 1990, 1, 283-290.
30. F. Räuchle e I. Díaz Tang, *Rev. Quím. PUCP* 1993, VII, 1, 41-47.
31. Müller, R., Lingens, F., *Angew. Chem.* 1986, 98, 778-787.
32. Vogel, T., M. Nies, L., Anid, P.J., Research and Development Program for Destruction of PCB's: General Electric Compony Corporate Research and Development (editor) Eighth Progress Report, June 1, 1989, 71-80.
33. Rojo, F., Pieper, D., Engesser, H., Knackmuss, H.J., Timmis, K.K., *Science* 1987, 238, 1395-1398.