

Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación

E. Cortón¹, A. Viale²

(1) Lab. de Biosensores y Bioanálisis, Dpto. de Qca. Biológica. Facultad de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón 2, (C1428EGA) Capital Federal
CONICET, Rivadavia 1917, (C1033AAJ) Capital Federal, Argentina.

(2) Lab. de Biosensores y Bioanálisis, Dpto. de Qca. Biológica. Facultad de Cs Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón 2, (C1428EGA) Capital Federal, Argentina.

➤ Recibido el 19 de enero de 2006, aceptado el 19 de mayo de 2006.

Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. Podemos definir biorremediación como la utilización de seres vivos para solucionar un problema ambiental, tales como suelo o agua subterránea contaminados. En un ambiente no contaminado, las bacterias, los hongos, los protistas, y otros microorganismos heterotróficos degradan constantemente la materia orgánica disponible, para obtener energía. Cuando un agente contaminante orgánico, combustible, petróleo u otro es accidentalmente liberado en un ambiente dado, algunos de los microorganismos indígenas morirán, mientras que sobrevivirán algunos otros capaces de degradar estos compuestos orgánicos. La biorremediación trabaja proveyendo a estos organismos de nutrientes, oxígeno, y otras condiciones que favorezcan su rápido crecimiento y reproducción. Estos organismos entonces podrán degradar el agente contaminante orgánico a una velocidad mayor, proporcionando una técnica para limpiar la contaminación, realizando los mismos procesos de biodegradación que ocurren naturalmente en el medio ambiente. Dependiendo del sitio y de sus contaminantes, la biorremediación puede ser más segura y menos costosa que soluciones alternativas tales como la incineración o el enterramiento de los materiales contaminados.

Palabras clave: Hidrocarburos, Trinitrotolueno, Contaminación, Biodegradación, Remediación

Bioremediation aims at using organisms to solve environmental problems such as soil and groundwater contamination. In a non-polluted environment, bacteria, fungi, protists, and other heterotrophic microorganisms are constantly degrading organic matter to obtain energy. When organic pollutants such as fuel or oil accidentally spill, some of the indigenous microorganisms may die, while those capable of degrading the fuel may survive. Bioremediation enhances the activity of the later by providing fertilizers, oxygen, and by creating optimum conditions for rapid growth. These organisms may then be able to degrade the organic pollutant at a faster rate. Cleaning up pollution is thus performed by enhancing natural biodegradation processes. Depending on the site and the contaminants, bioremediation may be safer and less expensive than alternative solutions such as incineration and landfilling of contaminated materials.

Key words: Hydrocarbons, Trinitrotoluene, Pollution, Biodegradation, Remediation

Introducción

El uso de microorganismos por el hombre, para los más diversos fines y objetivos, se remonta a tiempos antiguos (Madigan *et al.*, 2003). Productos fermentados como el yogurt, quesos, kéfir, salsa de soja, cerveza, vino y cientos de otros productos han sido preparados con la ayuda de bacterias y hongos, aún en el completo desconocimiento de su existencia. Algo más modernamente, los arquitectos romanos diseñaron y utilizaron durante siglos intrincados sistemas para recoger el agua residual: sabemos que 600 años antes de Cristo ya los romanos utilizaban estos sistemas que podríamos llamar "cloacales", si el lector disculpa el anacronismo. Los historiadores actuales suponen que los romanos sabían que la depuración de las aguas servidas dependía directamente de su tiempo de retención en el sistema de canales y lagunas. Hoy en día los

microorganismos continúan utilizándose en la elaboración de una gran variedad de alimentos, a lo cual debe agregarse el uso en la producción de antibióticos, vacunas, productos químicos (ácido cítrico, ácido láctico, diversos aminoácidos, plásticos, y otros) (Madigan *et al.*, 2003).

Los sistemas de depuración de aguas actuales comparten los principios de funcionamiento utilizados por sus antiguos predecesores romanos. Los sistemas de depuración basados en lagunas de lodos activados (barros cargados de microorganismos) provocan la disminución de la carga orgánica (originada en los efluentes de complejos industriales y de municipios) mediante la degradación microbiana. Estos procesos además reducen la carga tóxica presente en los efluentes (Atlas y Bartha, 1998; Henry y Heinke, 1997). A escala domiciliaria los pozos ciegos y cámaras sépticas cumplen una tarea similar, aunque generalmente en ambiente anaeróbico, por lo cual son menos eficientes que los anteriormente mencionados (depende esto último, naturalmente, del criterio de eficiencia elegido).

Biorremediación puede definirse como *la respuesta biológica al abuso ambiental* (Levin y Gealt, 1997). Esta definición permite distinguir entre el uso de microorganismos para recuperar áreas contaminadas y para tratamientos de residuos tanto industriales como domiciliarios (Madigan *et al.*, 2003; Eweis *et al.*, 1999; Nemerov y Dasgupta, 1998). Distintas situaciones de abuso ambiental pueden observarse en las **Figuras 1, 2 y 3**.



Figura 1. Típico aspecto del Riachuelo. Las aguas oscuras cargadas de residuos orgánicos, derivados del petróleo, cientos de tóxicos y escasas en oxígeno no permiten el desarrollo de una fauna y flora normal. Foto gentileza de Eduardo Fernández y Daniel Forcelli.



Figura 2. Descarga directa, sin pre-tratamiento, de los residuos orgánicos originados en una empresa cárnica (frigorífico). Foto gentileza de Eduardo Fernández y Daniel Forcelli.



Figura 3. Arroyo Bonaerense. Se observa la acumulación de basura luego de una crecida; la espuma indica la presencia de detergentes en el agua.
Foto gentileza de Eduardo Fernández y Daniel Forcelli.

Es necesario establecer previamente cuáles son los niveles de contaminación que pueden ser admitidos en un ecosistema sin que por ello se provoquen daños a los seres vivos que viven en él (Moreno, 2003; Collie y Donnely, 1997). En este sentido debe tenerse en cuenta el destino del área que desea descontaminarse. Por ejemplo, en el caso de un ecosistema acuático, deberá definirse cuáles serán los usos que tendrán esas aguas: pueden ser destinadas a producir agua potable, para usos de recreación (balnearios), empleadas en agricultura o ganadería, como reserva biológica u otros usos. El objetivo de la biorremediación es eliminar, o al menos disminuir la concentración de sustancias potencialmente tóxicas, dispersadas accidentalmente o no en suelos y/o cuerpos de agua superficial o subterránea, utilizando como parte fundamental del proceso a los microorganismos (Alexander, 1994).

Los microorganismos utilizados en biorremediación son generalmente no-fotosintéticos; ecológicamente ocupan el nivel trófico (de alimentación) denominado de los descomponedores, en el que los hongos y bacterias son componentes principales. Estos organismos están presentes en prácticamente todos los lugares del planeta, inclusive a profundidades y temperaturas que se creía libres de ellos, como los pozos petrolíferos profundos (Atlas y Bartha, 1998; Leadbetter, 2002).

¿Cómo Obtienen Energía los Microorganismos?

Hay diversas formas por las cuales los organismos son capaces de producir la energía necesaria para su crecimiento y reproducción (White, 1995):

1. Fotosíntesis
2. Oxidación de compuestos inorgánicos
3. Oxidación de compuestos orgánicos

En este artículo nos referiremos específicamente a la tercera categoría, formada por organismos heterotróficos, capaces de degradar materia orgánica y tóxicos orgánicos. Los caminos metabólicos que pueden emplear los microorganismos presentes en esta categoría se pueden clasificar en tres grupos; el primero de ellos depende del oxígeno (aeróbico) comoceptor final de electrones, mientras que los otros dos se realizan en ausencia de oxígeno (anaeróbico).

La acción de los microorganismos anaeróbicos es más lenta, pero en contrapartida son capaces de degradar compuestos más tóxicos o con escasos lugares atacables enzimáticamente en sus moléculas, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, solventes clorados y pesticidas (Berry, 1999). Este grupo de organismos goza de "mala prensa" debido a que están asociados a la producción de olores nauseabundos y gases inflamables, y también debido a que muchos de ellos son patógenos. El más simple sistema anaeróbico es el de los *digestores*, que utilizan un tanque mezclador que puede operar de modo continuo o discontinuo (batch); como subproducto de su operación puede obtenerse metano.

a) Respiración aeróbica. Este es el proceso más eficiente de los tres (en cuanto a la producción de energía o ATPs), por lo que es el elegido por los microorganismos siempre que esté presente el oxígeno (que es el aceptor final de los electrones) y, por supuesto, que tenga la maquinaria enzimática para realizar el proceso (Fig. 4).

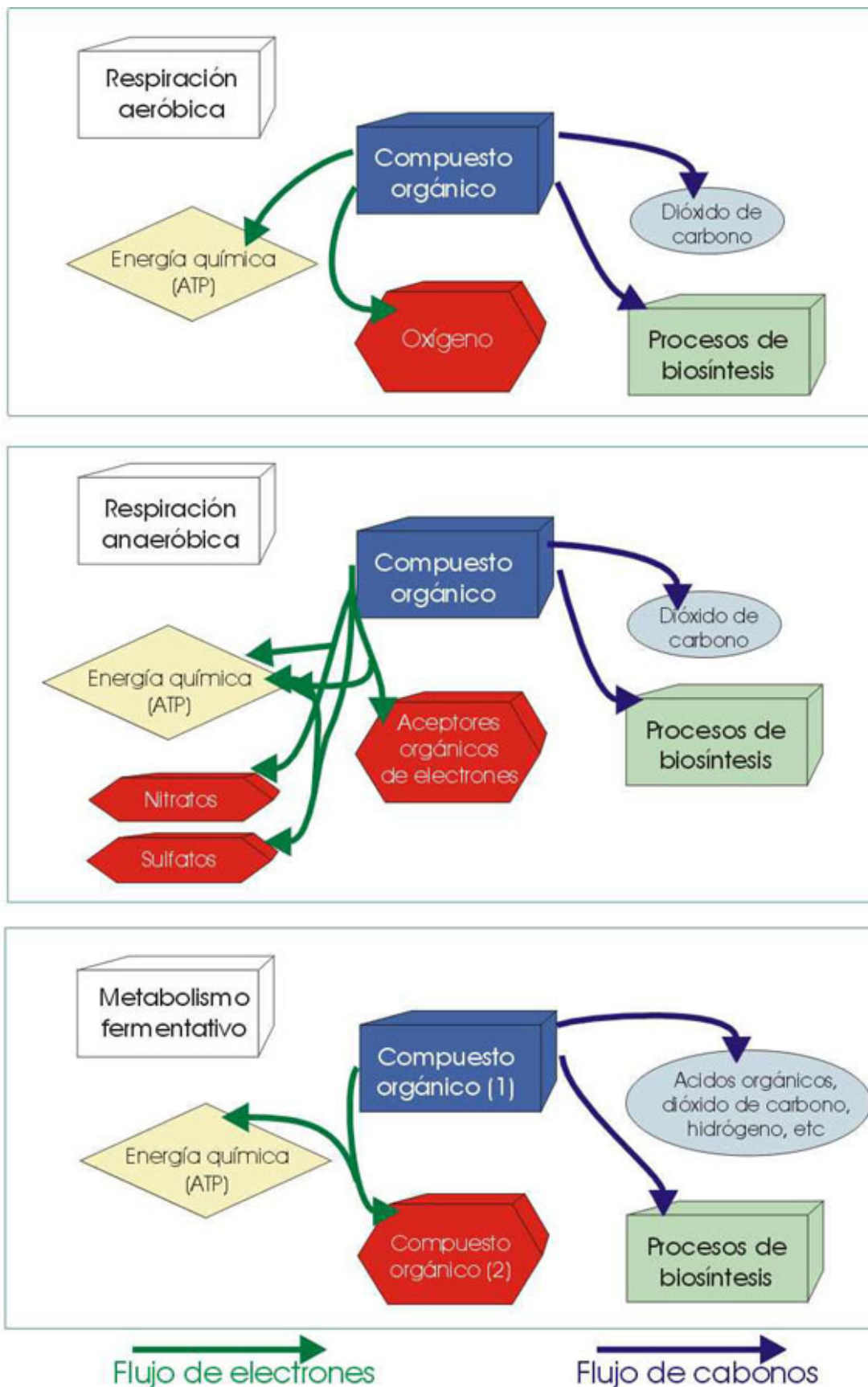


Figura 4. Esquemas de diferentes tipos de metabolismo microbiano

La reacción general puede ser escrita así:

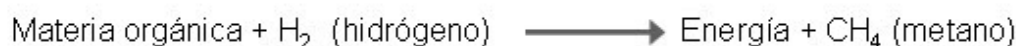


Pudiendo ser utilizados como sustratos, compuestos orgánicos como azúcares, proteínas, lípidos e inclusive petróleo.

Estos organismos son utilizados en las plantas de tratamiento de aguas cloacales e industriales. Su función básicamente se lleva a cabo poniendo en contacto las aguas residuales con una población microbiana aclimatada, y controlando cuidadosamente las condiciones ambientales (nutrientes, concentración de gases, concentración de tóxicos, etc.). Los organismos aeróbicos degradan la materia orgánica más rápidamente y eficientemente que los anaeróbicos, por lo que generalmente son los utilizados en los procesos de depuración de aguas, o lodos.

En una planta estándar de tratamiento, la biomasa está suspendida en "flóculos" o grumos. Es fundamental mantener elevada la concentración de oxígeno disuelto y se monitorean los nutrientes y la DBO, a la entrada y a la salida de la planta. Normalmente la entrada de aguas residuales al sistema debe ser más o menos constante. Se denomina DBO (demanda bioquímica de oxígeno) a la cantidad de oxígeno necesaria para que los microorganismos presentes en una muestra de agua oxiden la materia orgánica, y es un indicador de contaminación por materia orgánica, debido a vertidos cloacales, industrias u otras fuentes ((Atlas y Bartha, 1998; Henry y Heinke, 1997).

b) Respiración anaeróbica. Es similar a la respiración aeróbica, con la diferencia de que el último aceptor de los electrones no es el oxígeno (sino nitratos, sulfatos, hidrógeno, etc.). Normalmente estos organismos son anaerobios estrictos, o sea que sólo pueden crecer en ausencia total de oxígeno (el oxígeno es tóxico para ellos). Es un grupo pequeño (pocas especies) de organismos, formado sólo por bacterias (**Fig. 4**). Importantes representantes son las bacterias metanogénicas y las bacterias sulfatorreductoras. Por ejemplo:



c) Fermentación: Algunos organismos obtienen energía de la degradación de compuestos orgánicos, degradándolos sólo parcialmente (**Fig. 4**). Tanto el donador como el aceptor de los electrones es una molécula orgánica. Dependiendo de los organismos involucrados, tanto los productos como los sustratos utilizados pueden ser muy variables.

Se entiende por biorremediación *in situ* a aquellos procesos que utilizan microorganismos para degradar sustancias peligrosas en el suelo y agua con mínima alteración de la estructura del suelo. Usualmente el objetivo es realizarlo en forma aeróbica (Leahy y Colwell, 1990; Prince y Drake, 1999; Tabak, *et al.*, 1997; Swannel y McDonagh, 1996).

Ejemplo 1. Derrame de hidrocarburos

Consideremos un caso frecuente de contaminación: El derrame de hidrocarburos sobre el suelo. Normalmente, en este tipo de derrames, el petróleo se mueve hacia las capas subyacentes del suelo, pudiendo alcanzar el nivel de las aguas subterráneas, y moverse en la dirección de éstas alcanzando zonas algunos kilómetros "aguas abajo" en la dirección de flujo de las aguas freáticas, formando lo que se denomina una "pluma", como puede verse en la **Figura 5**.

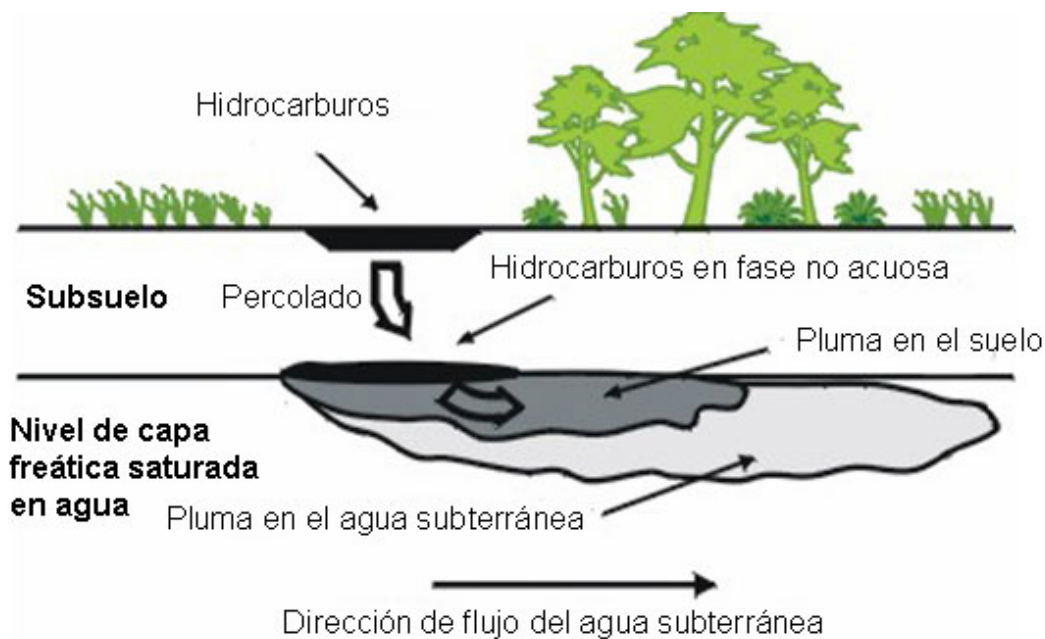


Figura 5. Típica pluma de hidrocarburos. El hidrocarburo percola a través del suelo, y se acumula sobre el agua subterránea, ya que flota sobre ella.

La implementación del proceso de biorremediación (luego de una limpieza por métodos físicos, si esto fuera necesario) en una situación de este tipo podría involucrar los siguientes pasos: (Figuerelo y Marino, 2004; Orozco *et al.*, 2003))

1) Retirada de la fase líquida no acuosa (NALP). Si existe una fase no acuosa de hidrocarburo (NALP en la terminología anglosajona), debe procederse a su remoción, ya que es una fuente concentrada del material peligroso. Difícilmente pueda degradarse *in situ*, debido a su elevada toxicidad; la manera más económica de realizar este proceso es bombeando este líquido, y separando en la superficie el petróleo del agua.

2) Estudios hidrogeológicos. El agua subterránea transporta los contaminantes, y si se considera necesario eliminarlos de ella, será necesario realizar estudios hidrogeológicos que permitan establecer el tamaño de la "pluma", la dirección y la velocidad de flujo de las aguas subterráneas en esa zona. Para esto deben perforarse pozos de inspección, que permitan muestrear el grado y extensión de la contaminación. Estudios sobre las características y composición del suelo también son necesarios para calcular el volumen de "agua de poro" (el agua contenida en los intersticios del material sólido por el que circulan las aguas subterráneas) y estimar la cantidad de líquido que deberá ser tratado. Debemos considerar que para una contaminación del orden de varios cientos de ppm (una ppm es una parte por millón, equivalente a, por ejemplo, un gramo en una tonelada) de hidrocarburos en el agua, deberán ser tratadas entre 3 y 20 volúmenes de agua de poro. El tratamiento involucra bombear a la superficie grandes volúmenes de agua, proceder a la separación de los hidrocarburos, y reinyectar el agua, si esto es posible. Información importante que debe ser producida por estos estudios son una estimación de la velocidad de bombeo necesario para contener la pluma; una estimación de la capacidad del área para absorber el agua reinyectada; datos acerca del tiempo requerido para la biorremediación, basado en las restricciones de flujo y otras limitaciones; y por último, La geometría del sistema (bombas de extracción, sistema de reinyección, etc.) necesaria.

3) Estudios microbiológicos. Es necesario estudiar el comportamiento de los microorganismos indígenas (los que se encuentran normalmente en el área contaminada), a los fines de evaluar la velocidad con la que degradan los contaminantes, la respuesta a los tóxicos y el efecto del agregado de nutrientes, oxígeno u otros factores que pueden favorecer el crecimiento y metabolismo de los organismos (Tabak, *et al.*, 1997; Swannel y McDonagh, 1996; Roberts, 2002; Cerniglia y Shuttleworth, 2002), lo que permite establecer si es necesario o no la aplicación (siembra) de otros microorganismos (provenientes de cultivos industriales) (Atlas, 1997; Edgehill, 1999). Algunos de estos estudios involucran realizar mezclas del suelo contaminado con materia orgánica (compost) y estudiar el grado de degradación conseguido por bacterias y hongos. Debe caracterizarse la actividad biológica en muestras de agua, y el efecto del agregado de nutrientes y oxígeno. Es importante destacar que normalmente estos ensayos se realizan en condiciones ideales (temperatura controlada, agitación enérgica, mezcla homogénea de suelo y agua) y por ello es de esperar que la degradación en una situación real ocurra más lentamente; se puede estimar, groseramente, que esto ocurrirá a una velocidad entre 2 y 6 veces menor *in situ*. Es también importante realizar ensayos de toxicidad, como por ejemplo con ensayos microbiológicos (Microtox[®]). El Microtox es un ensayo comercial basado en bacterias luminiscentes; estas bacterias, de origen marino, emiten normalmente cierta cantidad

de luz. Cuando las bacterias luminiscentes se encuentran en presencia de un tóxico, la emisión de luz disminuye en proporción a la toxicidad del medio ensayado.

4) Elección de la ingeniería. Una vez realizados los estudios anteriores, debe diseñarse un sistema tal que permita optimizar el proceso de degradación microbiológica, realizando las instalaciones y perforaciones que permitan la inyección de oxígeno y de nutrientes. También deberán seleccionarse los puntos de extracción de agua para ser tratada por métodos físicos o químicos de eliminación de hidrocarburos, cuando esto sea necesario. Durante las primeras etapas de degradación biológica ocurre un efecto paradójico: El contenido de hidrocarburo en las aguas subterráneas se eleva a un máximo, debido a la desorción de los contaminantes de las arcillas u otros materiales por la acción de los tensioactivos producidos por la actividad microbiológica; el sistema de superficie de bombeo y separación debe estar diseñado para poder superar esta situación. Otro punto interesante es que, dependiendo de la estructura y composición de suelos y aguas, el agregado de fosfatos puede formar fosfato de calcio, que al precipitar puede taponar las perforaciones realizadas, e inclusive parte de la formación geológica involucrada. (Nemerov y Dasgupta, 1998; LaGrega *et al.*, 1996).

5) Instalación y comienzo de las operaciones. En primer lugar se comienza la extracción de agua, y se pone en marcha el sistema de purificación de ésta (químico, físico o biológico); si la calidad del agua tratada es la esperada, se comienza a reinyectarla. Luego se prepara el envío de nutrientes y se inyecta junto con el agua de reinyección; la cantidad de nutrientes debe ser mínima en un primer momento, luego es aumentada paulatinamente hasta el óptimo calculado. Por último, cuando el sistema de inyección de nutrientes funciona adecuadamente, se comienza con la inyección de oxígeno (se utiliza oxígeno gaseoso o bien peróxido de hidrógeno).

6) Operación y monitoreo. Debe medirse con elevada frecuencia, diariamente, los valores de temperatura, nutrientes, concentración de oxígeno, pH, potenciales de oxidación/reducción, entre otros posibles parámetros, a lo largo de pozos seleccionados. Con menor frecuencia deben medirse la cantidad de hidrocarburo, la toxicidad, conteos microbianos y otros parámetros seleccionados por su relevancia. Empíricamente se ha sugerido que una carga microbiana de 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de agua es óptima. Valores mayores pueden ocasionar el taponamiento de los pozos más o menos rápidamente.

7) Fin de las operaciones. Cuando los niveles de los contaminantes alcanzan el nivel permitido por la legislación vigente o bien los valores seleccionados para el proyecto, se realiza normalmente un muestreo final para preparar los informes exigidos por los organismos de control en los distintos niveles gubernamentales. Es adecuado seguir las operaciones hasta que el nivel de oxígeno, nutrientes y carga bacteriana regrese a los niveles previos a las operaciones, asegurándose de esa manera que no sea posible la desorción de más hidrocarburo, que contamine el agua subterránea.

Ejemplo 2. Suelos contaminados con TNT

La Biorremediación de suelos contaminados con nitrotoluenos es muy importante por dos motivos; en primer lugar los dinitro- y trinitrotoluenos son considerados carcinógenos, y en segundo lugar, los emplazamientos con esta contaminación son muy importantes, tanto en número como en tamaño. En muchos casos, la contaminación se concentra en la parte superior del suelo de fortificaciones que fueron usadas para producir o depositar TNT, en instalaciones militares (Nishino y Spain, 2002; Ramos *et al.*, 1997; Major, 1999).

En ambientes estrictamente anaeróbicos, el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) es totalmente reducido a triaminotolueno (TAT), el cual puede ser destoxificado por polimerización en medio aeróbico o por unión irreversible a arcillas. La transformación de los nitrotoluenos por los microorganismos es cometabólico (es decir, que no pueden degradarlo si están en contacto con sólo, por ejemplo, TNT; pero si el organismo está creciendo y alimentándose de otros sustratos, también atacará al TNT), por esto se requiere el agregado de una fuente de carbono, así como nutrientes. En algunas ocasiones no es necesaria la reducción total del TNT, sino que algunos metabolitos pueden ser incorporados a una matriz orgánica (humificación) quedando de esta manera inmovilizados.

Esta técnica es de tipo *landfarming*, y las operaciones principales son, en primer lugar, la promoción de la humificación de manera controlada, mediante la adición de materia orgánica al suelo, y en segundo lugar, el incremento del metabolismo de los microorganismos mediante el agregado de fuentes de carbono de pequeño peso molecular, fácilmente asimilables por los microorganismos, así como otros nutrientes. Se trata de proporcionar poco nitrógeno como nutriente, ya que de esta forma los microorganismos se verán obligados a degradar el TNT, utilizándolo como fuente de nitrógeno (Martin *et al.*, 1997; Vorbeck *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 1995).

Actualmente la técnica está siendo ensayada a escala piloto (contenedores de 100 litros) con buenos resultados. El objetivo es poder tratar suelos con más de 2 gramos de TNT por cada kilogramo de suelo. Ha demostrado ser útil el uso de hongos ligninolíticos para la degradación de compuestos nitrados (Levin, *et al.*, 2003).

Futuro de las Técnicas de Biorremediación

Las aplicaciones más importantes de la biorremediación han sido aquellas que modifican el ambiente para estimular la actividad de los organismos que allí se encuentran. El empleo de cultivos de microorganismos (muchas compañías venden preparados de éstos, ya sea como esporas, liofilizados u otros formulados, para favorecer la degradación de distintos contaminantes) parece no producir ninguna ayuda o ventaja en el proceso.

El uso de microorganismos mejorados genéticamente, que pueden ser protegidos bajo patente, puede optimizar algunos procesos de degradación de moléculas especialmente resistentes (como los PAHs o compuestos muy clorados), pero debido a que las legislaciones aún no establecen el procedimiento a seguir o bien prohíben la liberación masiva de microorganismos recombinantes al medio ambiente, las compañías no han desarrollado estrategias para su uso en biorremediación *in situ* (Ensley y Zylstra, 1997).

Comparada con los métodos físicos de limpieza, la biorremediación es más económica y causa menos perturbación en el medio ambiente, como se demostró en una de las más exitosas aplicaciones de la técnica, el tratamiento de la línea de costa afectada por el derrame de crudo del *Exxon Valdez*, basada en la acción de microorganismos indígenas y modificaciones ambientales de gran sencillez, como la aplicación de nutrientes y la aireación (Swannel y McDonagh, 1996).

Pero como era de esperar, las técnicas de biorremediación son una buena estrategia de limpieza para ciertos tipos de contaminación, como la producida por el petróleo y otros compuestos orgánicos no demasiado tóxicos. Cuando existe una acumulación de sustancias tóxicas o no biodegradables la biorremediación no funciona, ya que la colonización y crecimiento de los microorganismos se encuentra inhibida. Ejemplos de estos últimos son metales pesados, como el cadmio, mercurio o plomo.

Dependiendo del lugar contaminado, sus características climáticas, físico-químicas y ecológicas, así como de la composición y concentración de los contaminantes, la biorremediación puede ser una opción más segura y de menor costo que otras soluciones alternativas, como la incineración o el enterramiento de los materiales contaminados. Además tiene la ventaja de que la contaminación es tratada en el lugar donde se encuentra (*in situ*), por lo que se evitan grandes movimientos de suelos o sedimentos hacia el lugar donde estos puedan ser tratados para la remoción del agente contaminante, o bien hacia su lugar de disposición final como residuos peligrosos.

El modelado matemático es una herramienta de gran ayuda para la predicción de los procesos de biorremediación (Rittmann y Sáez, 1997; Stevens, 1997). Existe en la actualidad una gran variedad de software, tanto de libre distribución como comerciales. Cabe mencionar entre los programas de libre distribución a [Bioplume III](#) y [Bioscreen v. 1.4](#), que han demostrado su valor en muchas situaciones en las que los [procesos de biorremediación](#) han sido utilizados.

Otro aspecto sumamente importante a desarrollar en el futuro próximo es el uso de reacciones fotoquímicas para la eliminación de contaminantes (Oller do Nascimento, 2004; Núñez *et al.*, 2004).

Referencias

Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego, California,

Alvarez, M.A., Kitts C.L., Botsford J.L. y Unkefer P.J.1995. *Pseudomonas aeruginosa* strain MA01 aerobically metabolizes the aminodinitrotoluenes produced by 2,4,6-trinitrotoluene nitro group reduction. *Can J Microbiol.* 41: 984 - 991.

Atlas, R.M. 1997. Bioestimulación para mejorar la biorrecuperación microbiana. En: Levin M. A., Gealt M. A. (Ed) *Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos*. McGraw Hill / Interamericana, Madrid, España. Pags. 21 – 40.

Atlas, R. M. y Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology*. Fundamentals and applications. Editorial Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, U.S.A.

Berry , D.F. 1999. Anaerobic Bioremediation: Microbiology, Principles and Applications. En: Adriano D. C., Bollag, J.M., Frankenberger, W.T. y Sims, R.C. (Eds). *Bioremediation of Contaminated Soils*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Pags 339 – 396.

Bollag, J.M., Frankenberger, W. T., Sims, R.C. (Eds). *Bioremediation of Contaminated Soils*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Pags. 631 – 664.

Cerniglia, C.E. y Shuttleworth, K.L. 2002. Methods for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons PAH.-degrading

microorganisms and procedures for determination of biodegradation intermediates and environmental monitoring of PAHs. En: Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach, L.D. *Manual of Environmental Microbiology* 2nd. Edition. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., Pags. 972 – 986.

Collie, S.L. y Donnelly, K.C. 1997. Measurement of mutagenic activity in contaminated soils. En: Sheehan D Editor. *Bioremediation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, Pags. 127 – 151.

Edgehill, R.U. 1999. Bioremediation by Inoculation with Microorganisms. En: Adriano D. C., Bollag J. M., Frankenberger W. T., Sims R. C. (Eds). *Bioremediation of Contaminated Soils*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Pags. 289 –314.

Ensley, B.D. y Zylstra, G.J. 1997. Principios y prácticas de biotratamiento utilizando microorganismos modificados. En: Levin, M.A., Gealt, M.A. (Eds). *Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos*. McGraw Hill / Interamericana, Madrid, España. Pags. 41 – 66.

Eweis, J.B., Ergas, S. J., Chang, D.P.Y. y Schroeder, E.D. 1999. *Principios de Biorrecuperación*. McGraw Hill / Interamericana, Madrid, España.

Figuerelo, J.E. y Marino Dávila, M. 2004. *Química Física del Ambiente y de los Procesos Medioambientales*. Editorial Reverté S. A., Barcelona, España.

Henry, J.G. y Heinke G.W 1999. *Ingeniería Ambiental* Segunda Edición. Prentice Hall Hispanoamericana, México.

LaGrega, M.D., Buckingham, P.L. y Evans, J. C. 1996. *Gestión de Residuos Tóxicos: Tratamiento, Eliminación y Recuperación de Suelos*. McGraw Hill / Interamericana, Madrid , España.

Leadbetter, E.D. 2002. Prokaryotic diversity: form, ecophysiology and habitat5. En: Hurst C. J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney M.J., Stetzenbach, L.D. *Manual of Environmental Microbiology* 2nd. Edition. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., Pags. 19 – 31.

Leahy, J.G., Colwell R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* (54): 3 September, p. 305 – 315. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C.,

Levin, M. A. y Gealt M. A. 1997. Visión general del biotratamiento y su futuro En: Levin M. A., Gealt M. A. Editors. *Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos*. McGraw Hill / Interamericana, Madrid, España. pp. 1 – 19.

Levín, L., Viale, A.A. y Forchiassin F. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Int. Biodeter. Biodeg.* 52: 1 - 5.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education Inc., New Jersey,

Major, M.A. 1999. Biological Degradation of Explosives. En: Adriano, D.C., Bollag, J.M., Frankenberger W.T., Sims, R.C. (Eds). *Bioremediation of Contaminated Soils*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Pags 111 – 132.

Martin, J.L., Comfort, S.D., Shea, P.J., Kokjohn, T.A. y Drijber, R.A. 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Can J Microbiol.* 43: 447 - 455.

Moreno, Grau, M.D. 2003. Toxicología Ambiental. *Evaluación de riesgo para la salud humana*. Editorial McGraw-Hill / Interamericana de España, Madrid , España.

Orozco Barrenetxea, C., Pérez Serrano, A., González Delgado, M.N., Rodríguez Vidal, F.J. y Alfayate Blanco, J.M. 2003. *Contaminación Ambiental. Una visión desde la Química*. Editorial Thomson, México D.F. México.

Nemerov, N.L. y Dasgupta ,A. 1998. *Tratamiento de Vertidos Industriales y Peligrosos*. Ediciones Días de Santos S.A., Madrid, España.

Nishino, S.F. y Spain, J.C. 2002. Biodegradation, transformtion and bioremediation of nitroaromatic compounds. En: Hurst , C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. *Manual of Environmental Microbiology* 2nd. Edition. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., Pags. 987 – 996.

Núñez, A., Pardo, G. y Núñez, O. 2004. Tratamiento de desechos líquidos de la industria petrolera. Nuestra experiencia en laboratorio. Degradación fotoquímica de compuestos orgánicos de origen industrial. En: Nudelman N. Editor. *Química Sustentable*. Ediciones UNL, Santa Fé, Argentina. Pags. 177 – 204.

Oller do Nascimento, C.A., Teixeira, A.C., Guardan, R., Quina, F. H. y López-Gejo, J. 2004. Degradación fotoquímica de compuestos orgánicos de origen industrial. En: Nudelman N. Editor. *Química Sustentable*. Ediciones UNL, Santa Fé, Argentina. Pags. 205 – 220.

Prince, R.C. y Drake, E.N. 1999. Transformations and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. En: Adriano, D.C. , Bollag, J. M., Frankenberger, W.T., Sims R.C. (Eds). *Bioremediation of Contaminated Soils*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Pags 89 – 110.

Ramos, J.L., Delgado, A., Duque, E., Fandila, M.D., Gil, M., Haïdour, A., Luchéis, G., Michán, C. y Salto, R. 1997. Biodegradation of nitroaromatics by microbes. En: Sheehan D Editor. *Bioremediation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, Pags. 187 – 200.

Roberts, D.J. 2002. Methods for assessing anaerobic biodegradation potential. En: Hurst C. J., Crawford R. L., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach, L. D. *Manual of Environmental Microbiology* 2nd. Edition. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., Pags. 1008 – 1017.

Rittmann, B.E. y Sáez, P.B. 1997. Modelación de los procesos biológicos implicados en la depuración de los sustratos orgánicos peligrosos. En: Levin, M.A., Gealt, M.A. (Eds). *Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos*. McGraw Hill / Interamericana, Madrid , España. Pags. 117 – 140.

Stevens, D.K. 1999. Mathematical Modeling in Bioremediation of Hazardous Wastes. En: Adriano D. C.,

Swannell, R.P.J., Lee, K. y McDonagh, M. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews* Vol. 60, No 2 June., p. 342 – 365.

Tabak, H.H., Govind, R., Fu , Gao, 1997. Application of bioavailability and biokinetics protocol to phenol and polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants in soil and development of bioavailability and biokinetics models for soil systems. En: Sheehan, D. (Ed). *Bioremediation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, Pags. 297 – 323.

Vorbeck, C., Lenhe, H., Fischer, P., , J.C. y Knackmuss, H.J. 1998. Initial Reductive Reactions in Aerobic Microbial Metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Appl Environ Microbiol*, 64: 246 - 252.

White, D. 1995. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, Oxford,