

# Crecimiento a diferentes concentraciones de fósforo y nitrógeno de un cultivo puro de bacterias degradadoras de fenantreno

Liliana P. Cantini-Reyes<sup>1</sup>, Laugeny Díaz-Borrego<sup>1</sup>, Samy Dávila<sup>2</sup> y Luz Marina Soto-Quintana<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Acuática, Departamento de Biología.

<sup>2</sup>Laboratorio de Espectroscopía Molecular y Atómica, Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 15-02-00 Aceptado: 13-03-01

## Resumen

En el presente estudio se aisló una bacteria capaz de utilizar fenantreno como fuente de carbono. Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo como fuentes de nutrientes. Se utilizó espectroscopía infrarroja para determinar la biodegradación y el diseño factorial  $2^k$  para determinar el efecto del fósforo y el nitrógeno en el desarrollo del microorganismo. Se aisló a *Bacillus* sp y se encontró que el 98,72% de las variaciones observadas en la densidad bacteriana era debida a cambios en las concentraciones de fósforo y nitrógeno o a la interacción de ambos nutrientes. Los espectros infrarrojos muestran la aparición de bandas que corresponden a los metabolitos formados durante el catabolismo del fenantreno, así como también la desaparición de bandas características del grupo aromático.

**Palabras clave:** Bacterias; biodegradación; fenantreno.

## Growth on different concentrations of phosphorus and nitrogen of a pure culture of bacteria biodegradator of phenantrene

### Abstract

In this study a strain able to use phenanthrene as carbon source was isolated. The effect of different concentrations of nitrogen and phosphorous as nutrient source was determined. Infrared spectroscopy was used in order to follow the biodegradation, and a  $2^k$  factorial design was employed in order to determine the effect of phosphorous and nitrogen on the development of the microorganism. A *Bacillus* sp. was isolated, and it was observed that the 98.72% of the variations in its density was due to changes in the concentrations of phosphorous and nitrogen or by the interaction of both nutrients. The infrared spectra show the rising of bands that correspond to the metabolites formed during the catabolism of the phenanthrene, and also the disappearing of bands characteristic of the aromatic group.

**Key words:** Bacteria; biodegradation; phenanthrene.

\* Autor para la correspondencia. E-mail: carluz@luz.ve

## Introducción

El fenantreno ( $C_{14}H_{10}$ ), es un hidrocarburo aromático policíclico con tres anillos fusionados, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente. Su presencia en el medio está relacionada con los procesos pirolíticos. Se encuentra como contaminante menor en efluentes de aguas residuales, gasificación del carbón, procesos de licuefacción, en el alquitrán de hulla y el petróleo (1-3). Este hidrocarburo es utilizado como sustrato modelo en estudios de biodegradación ambiental de hidrocarburos poliaromáticos, ya que forma parte de compuestos policondensados que son nocivos y que representan un peligro inminente para los seres vivos (4-9).

Los compuestos poliaromáticos como el fenantreno, pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía por diversos grupos bacterianos. El proceso biodegradación de los hidrocarburos es afectado por los niveles de nutrientes tales como nitrógeno y fósforo, los cuales en algunos casos pueden actuar como limitantes en el medio de cultivo (10-14).

Diferentes investigadores han señalado que el aporte de nutrientes estimula la tasa de transformación de los compuestos orgánicos por los microorganismos (13, 15, 16); no obstante, concluyen que no existe una relación entre los nutrientes que pueda ser utilizada universalmente para todos los ambientes, sino que ésta varía de acuerdo a las características ambientales (13) y a los metabolismos involucrados.

Una herramienta particularmente útil para evaluar el efecto conjunto de varios factores sobre una respuesta, son los diseños factoriales (17). En este trabajo se utilizó esta herramienta para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fósforo y nitrógeno sobre el crecimiento de una cepa bacteriana que tenía la capacidad de utilizar fenantreno como fuente de carbono.

Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en experimentos en los que intervienen varios factores para estudiar el efecto conjunto de éstos sobre una respuesta. El diseño  $2^k$  es particularmente útil en las primeras fases del trabajo experimental, conlleva un menor número de corridas con las cuales pueden estudiarse  $k$  factores en un diseño factorial completo. Debido a que sólo hay 2 niveles de cada factor, debe suponerse que la respuesta es aproximadamente lineal en el intervalo de los niveles elegidos de los factores (17).

## Materiales y Métodos

### Análisis microbiológico

**Descripción del área de estudio y toma de la muestra:** Las muestras de suelo fueron tomadas en la Impulsora 2 de MARAVEN, ubicada en el Corredor A, Patio Tanque "La Salina", de la ciudad de Cabimas, capital del Municipio Bolívar en el Estado Zulia.

El suelo había sido contaminado accidentalmente con crudo liviano y crudo mediano-pesado procedente del Lago de Maracaibo.

Las muestras se colectaron en la superficie del suelo y a cinco centímetros de profundidad aproximadamente. Posteriormente se colocaron en bolsas plásticas y se transportaron en una cava con hielo, donde fueron conservadas hasta su procesamiento.

**Enriquecimiento de los microorganismos en medio mínimo mineral con fenantreno como única fuente de carbono:** Se tomó 1 g de suelo, y se suspendió en solución salina estéril. A partir de esta suspensión, se inocularon fiolas con 100 ml de medio mínimo mineral con fenantreno al 0,3% p/v (Caldo Fenantreno, CF). El medio mínimo mineral fue preparado de acuerdo a lo establecido por Aranha y Brown (18) y contiene: 1,0 g  $NH_4Cl$ ; 0,05 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ; y 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  por litro de agua destilada.

da. El fenantreno, previamente se esterilizó en una estufa a 80°C por 24 horas (19), y fue disuelto en acetona y adicionado asépticamente al medio mineral estéril (autoclavado a 15 Lb de presión y 121°C por 15 minutos). Las fiolas se incubaron en agitación constante a 25°C hasta observar turbidez.

**Aislamiento e identificación del microorganismo:** Las bacterias fueron aisladas en agar mínimo mineral con fenantreno (AF), cuya composición química es la misma que la del CF, pero con 2% p/v de agar. Se seleccionó una de las colonias bacterianas. La bacteria aislada, fue identificada a través de pruebas bioquímicas convencionales, de acuerdo a los esquemas propuestos por Koneman *et al.* (20) y las pruebas de identificación del Manual de Bergey's (21).

#### Análisis químicos

**Espectroscopía de infrarrojo:** Para determinar la degradación del fenantreno por la bacteria aislada, se realizó un análisis químico por espectroscopía de absorción en el infrarrojo. El análisis fue realizado en un Espectrometro Perkin Elmer, modelo 1725X con Transformada de Fourier.

**Preparación de las muestras líquidas:** Para el análisis espectroscópico de las muestras líquidas se realizaron extracciones, en un embudo de separación, con 2 mL de hexano a partir de 4 mL del caldo mineral con la cepa pura enriquecida con fenantreno (22). La capa orgánica fue decantada y centrifugada a 7500 rpm por 20 minutos en una centrifugadora CENTRA MP4 (International Equipment Company). Posteriormente, se tomó una muestra del sobrenadante la cual fue comprimida entre dos celdas de NaCl del espectrofotómetro para ser analizada.

**Preparación de las muestras sólidas:** En una Prensa Carver con una capacidad de 2400 libras, fueron preparadas las pastillas para cada compuesto orgánico patrón y para el fenantreno. El ácido 1-hidroxi-2-naftoico, el ácido salicílico y el fenantreno, fueron triturados individualmente en un mor-

tero con bromuro de potasio desecado. Luego, la mezcla fue comprimida en un troquel a una presión de 1500 libras por 90 segundos.

#### Diseño experimental

Para determinar el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno y de fósforo sobre el crecimiento de la bacteria, se aplicó el diseño factorial  $2^k$  el cual tuvo dos factores A y B los cuales correspondieron a las concentraciones de fósforo y nitrógeno respectivamente.

El experimento se realizó por duplicado. El promedio del número de microorganismos viables, se determinó por el método de conteo en placas.

#### Interacción de concentraciones altas y bajas de fósforo y nitrógeno

Se utilizaron dos concentraciones de fósforo (P) y nitrógeno (N), una alta (+) y otra baja (-), se consideró como concentración base para ambos nutrientes, la del medio de cultivo sin modificación (18).

El nitrógeno presente en el medio mineral fue suministrado como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y el fósforo fué suministrado como  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Para el ensayo, las concentraciones de N y P en el nivel alto fueron de 0,6744 g/L de nitrógeno y 0,4144 g/L de Fósforo. Esta concentración se consideró como el nivel superior. Para el nivel inferior, las concentraciones de Nitrógeno y fósforo fueron de 0,1686 g/L y 0,1036 g/L respectivamente (nivel bajo). El pH inicial de los medios fue de 7,0.

#### Cuantificación del desarrollo bacteriano:

Las fiolas con los cuatro tratamientos fueron mantenidas en agitación constante a 69 oscilaciones por minuto a una temperatura de 25°C durante catorce días. La toma de la muestra se realizó cada dos días. Para la determinación del incremento en el número de microorganismos, se aplicó la técnica de recuento en placas. El AF para las placas fue preparado suministrando la fuente de fósforo y nitrógeno de acuerdo con el tipo de tratamiento evaluado (18).

### Análisis estadístico

El Análisis de Varianza aplicado al modelo factorial 2k fue empleado para determinar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento bacteriano.

Se empleó el programa Design Ease versión 2.08.

Antes de la aplicación del análisis de varianza, los datos obtenidos fueron analizados para comprobar si cumplían los supuestos como normalidad y homogeneidad de varianza. Para establecer comparaciones entre los tratamientos con respecto a un control dentro de los tratamientos, se aplicó el procedimiento de Dunnett (17).

## Resultados y Discusión

### Análisis microbiológico

El microorganismo aislado fue identificado como *Bacillus* sp., bastón gram positivo esporulado capaz de crecer en CF, de metabolismo oxidativo, mótil, catalasa positivo y oxidasa negativo.

**Crecimiento de *Bacillus* sp. en caldo fenantreno:** En la curva de crecimiento de *Bacillus* sp, los valores determinados de la constante de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) para el control y el tratamiento NAPA, están muy cercanos (1,197 días<sup>-1</sup> y 1,183 días<sup>-1</sup> respectivamente), mientras que los valores de  $\mu$  para los tratamientos NAPB, NBPA y

NBPB, están ubicados entre 1,157 y 1,303 días<sup>-1</sup>. El mayor tiempo de generación ( $g$ ), fue para el tratamiento NAPB (14,381 h), seguido luego por el tratamiento NAPA, el control y los tratamientos NBPB y NBPA (Tabla 1).

El efecto de los diversos tratamientos con nitrógeno y fósforo sobre el crecimiento del bacilo aislado, es evidenciado en el acortamiento del tiempo de generación; por lo que se considera que el mejor tratamiento aplicado en este trabajo es el del NBPA, puesto que con éste hubo un incremento en la constante de velocidad de crecimiento de la bacteria, en comparación con el control y los tratamientos restantes. El tiempo de generación obtenido con este tratamiento (12,768 horas) es comparable al tiempo de generación señalado por Weissenfels *et al.* (23) para *Pseudomonas paucimobilis* (12 horas).

Las constantes de velocidades de crecimiento observadas para el control y los tratamientos, en comparación con las constantes de velocidades de crecimiento observadas en los medios de cultivos convencionales, son menores. Esta diferencia se debe a que el fenantreno (utilizado como fuente de carbono) no es fácilmente degradado debido a sus propiedades fisico-químicas, como por ejemplo su baja solubilidad en agua, lo cual lo convierte en un compuesto termodinámicamente estable (19, 23, 24, 25).

Tabla 1  
Constantes de Velocidad de Crecimiento para el Control y los Tratamientos

Control y Tratamientos	Constante de Velocidad de Crecimiento ( $\mu$ días <sup>-1</sup> )	Tiempo de Generación	
		( $g$ , días)	( $g$ , horas)
Control	1,197	0,579	13,900
NBPB	1,244	0,557	13,371
NAPB	1,157	0,599	14,381
NBPA	1,303	0,532	12,768
NAPA	1,183	0,586	14,064

Tabla 2  
Análisis de Varianza para las UFC/ml en el Experimento 1

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F <sub>0</sub>
N	4,9455.10 <sup>12</sup>	1	4,9455.10 <sup>12</sup>	155,0519*
P	3,3583.10 <sup>12</sup>	1	3,3583.10 <sup>12</sup>	105,2917*
NP	1,5517.10 <sup>12</sup>	1	1,5517.10 <sup>12</sup>	48,6500*
Error	1,2758.10 <sup>11</sup>	4	3,1895.10 <sup>10</sup>	
TOTAL	9,9832.10 <sup>12</sup>	7		

\*Significativo al 95%.

Se ha señalado la existencia de una relación directamente proporcional entre la solubilidad que presentan los hidrocarburos poliaromáticos en el agua y la tasa de crecimiento de las bacterias que los utilizan como fuente de carbono y energía (22, 26). En 1974, Wodzinsky y Coyle indicaron que las bacterias que utilizan el fenantreno presentan un tiempo de generación de 10,5 horas (26). Indudablemente, una de las explicaciones para la baja tasa de crecimiento de las bacterias, es la baja solubilidad del fenantreno en el agua. No obstante, Wodzinsky y Coyle (26) señalan que la tasa de crecimiento de una bacteria no puede ser predicha exactamente tomando como base la solubilidad del hidrocarburo aromático, puesto que los cultivos difieren en las tasas a las cuales pueden utilizar un compuesto aromático como sustrato para el crecimiento. A este respecto, es importante destacar que compuestos aromáticos como el fenantreno son sustratos estables en condiciones aeróbicas, por lo que su biodegradabilidad en estas condiciones dependerá también de la eficacia de los sistemas de oxigenasas presentes en los grupos microbianos (4, 8, 24).

### Diseño factorial 2<sup>2</sup>

El MANOVA aplicado a este estudio, muestra que los efectos principales y la interacción son significativos al 95% (Tabla 2). El efecto principal del nitrógeno es mayor que el efecto principal del fósforo (1,47 veces

mayor), y el efecto de ambos factores es mayor que el de la interacción (3,19 y 2,16 veces mayor para el nitrógeno y el fósforo respectivamente). El efecto promedio del nitrógeno es negativo (N= -1572500), y sugiere que al elevar la concentración de la fuente nitrógeno en el medio de cultivo disminuirá la densidad bacteriana. El efecto promedio del fósforo es positivo (P= 1295833,33) y significa que al elevar la concentración del fósforo del nivel bajo (0,1036 g/L) al alto (0,4144 g/L), aumentará la densidad bacteriana. El efecto de la interacción es significativo, y por ello, los efectos principales pierden significancia.

La Figura 1 muestra la relación que existe entre el tipo de tratamiento y la biomasa. En la gráfica se observa que la densi-

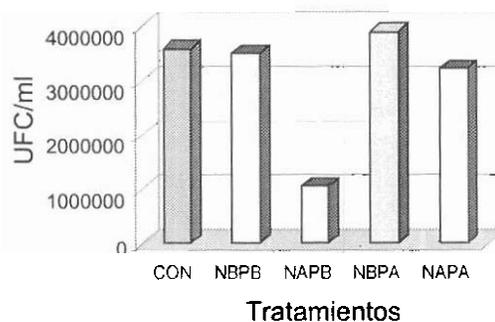


Figura 1. Densidad Bacteriana bajo los diferentes tratamientos

dad bacteriana es mayor con el tratamiento NBPA lo cual indica que hay una mayor eficiencia en la biodegradación del fenantreno con la aplicación de este tratamiento. La menor efectividad de los niveles de nutrientes sobre el crecimiento bacteriano se observa con el tratamiento NAPB, lo cual señala claramente el efecto negativo del nitrógeno cuando está en el nivel alto.

La Figura 2a muestra el efecto de la interacción de las concentraciones de Nitrógeno y Fósforo sobre la densidad bacteriana. A bajos niveles de nitrógeno, la densidad bacteriana es similar en presencia de niveles altos o bajos de fósforo ( $3,91 \cdot 10^6$  UFC/ml y  $3,50 \cdot 10^6$  UFC/ml respectivamente). Sin embargo, a altos niveles de Nitrógeno la densidad bacteriana es diferente, y cambia de  $1,04 \cdot 10^6$  UFC/ml (en presencia de bajos niveles de fósforo) a  $3,22 \cdot 10^6$  UFC/ml (cuando el Fósforo está en su nivel alto) (Figura 2b).

Con la aplicación de la prueba de intervalos múltiples de Duncan, se observaron diferencias significativas entre todas las parejas de medias excepto para los contrastes NBPB – NAPA. Esto sugiere que existen diferencias en la densidad entre los distintos tratamientos, pero que la densidad promedio en el tratamiento NBPB es igual a la densidad promedio del tratamiento NAPA (Tabla 3).

Se encontró que la velocidad de crecimiento obtenidas a partir de las fiolas control y el tratamiento NAPA no mostraban diferencias estadísticamente significativas, por ello fue posible considerar el tratamiento NAPA igual que el control para establecer comparaciones entre los tratamientos restantes dentro del diseño aplicado, utilizando para ello la prueba desarrollada por Dunnett (17). Con la aplicación de esta prueba, se observaron diferencias significativas entre el control NAPA y los tratamientos NAPB y NBPA, mientras que para el tratamiento NBPB no hubo diferencias significativas con respecto a NAPA (Tabla 4).

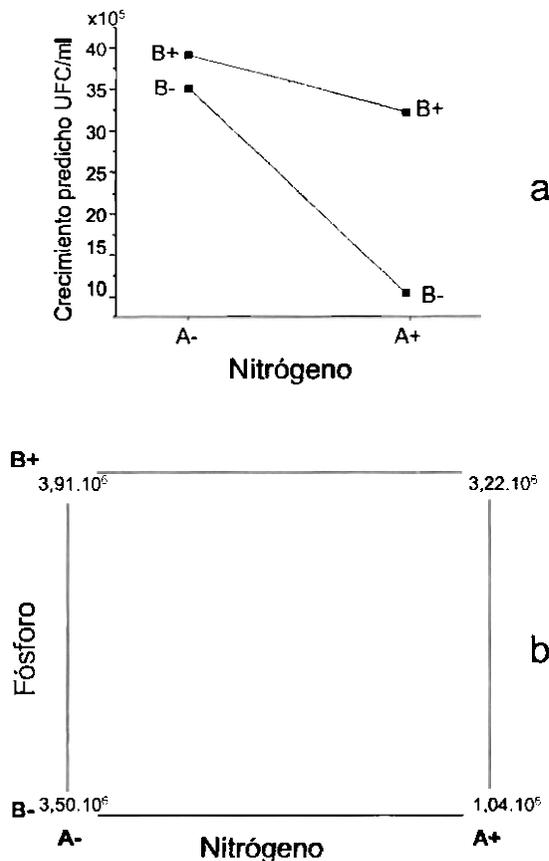


Figura 2. Efecto de la interacción del nitrógeno y fósforo sobre la densidad bacteriana (a). Representación cuadrada de los valores predichos de la interacción de Nitrógeno y Fósforo sobre la densidad bacteriana.

En las rutas catabólicas del fenantreno propuestas por Cerniglia (1984) y por Gibson y Subramanian (1994) (Figura 3), se reporta la formación de compuestos ácidos que son los responsables de las fluctuaciones en el pH. Dado que los metabolitos producidos acidifican el medio de cultivo, la sal que es disociada es el fosfato dibásico de potasio ( $K_2HPO_4$ ) por ser débilmente alcalina. En este experimento, el  $K_2HPO_4$  se encuentra disponible en altas concentraciones, por lo que la capacidad buffer del medio de culti-

Tabla 3  
Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las UFC/ml

Tratamiento	Réplicas	Media	Grupo Homogéneos
NAPB	2	1043333,3	X
NAPA	2	3220000,0	X
NBPB	2	3496666,6	X
NBPA	2	3911666,6	X
Contraste		Diferencias	
NBPB - NAPB		2453333,3*	
NBPB - NBPA		- 415000*	
NBPB - NAPA		276666,6	
NAPB - NBPA		- 2868333,3*	
NAPB - NAPA		- 2176666,6*	
NBPA - NAPA		691666,6*	

\* Estadísticamente significativo al 95%

vo es alta al poseer un amortiguador alcalino que evitar la acidificación, como consecuencia de esto el pH no se convertiría en un parámetro limitante del desarrollo bacteriano (27, 28).

#### Análisis químico

En el espectro infrarrojo del cultivo *Bacillus* sp. (Figura 4), se observó la aparición de una banda amplia del grupo funcional alcohol enlazado con hidrógeno a  $3420\text{ cm}^{-1}$  ( $2,92\mu\text{ m}$ ) y una banda de alargamiento C=C la cual podría corresponder a una olefina monosustituída. El espectro muestra la desaparición de ciertas bandas en la región de la huella dactilar ubicada entre los  $1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  ( $8,33\text{-}16,67\mu\text{ m}$ ), así como también la desaparición de las bandas de vibración de flexión C-H fuera del plano, ubicadas por debajo de los  $900\text{ cm}^{-1}$  ( $11,11\mu\text{ m}$ ) (Figura 5). Fue observada la desaparición del pico de insaturación a  $3066\text{ cm}^{-1}$  ( $3,26\mu\text{ m}$ ) y la banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$  ( $6,25\mu\text{ m}$ ).

Otros picos que pueden ser observados en el espectro (Figura 5), corresponden a las bandas contribuyentes del solvente utilizado, el hexano, las cuales son la banda de

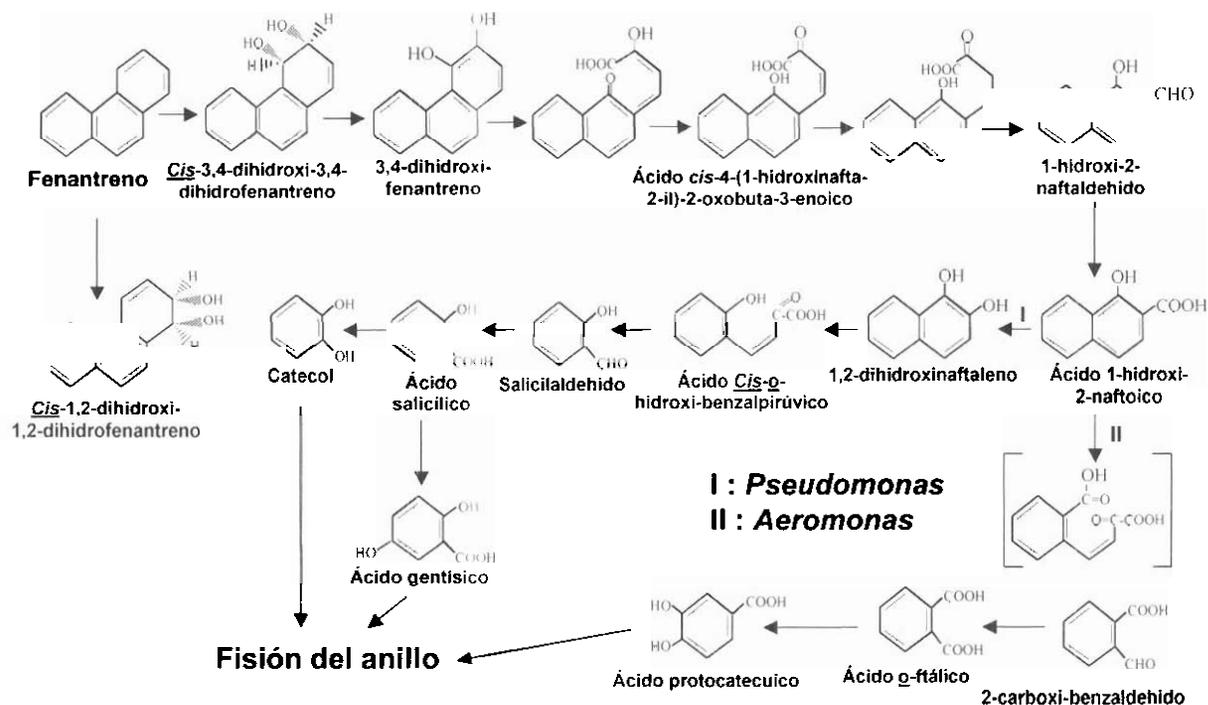
Tabla 4  
Prueba de Dunnett

Tratam.	Medias	Diferencia de Medias
NAPA	3220000	-
NBPB	3496666,667	276666,6
NAPB	1043333,333	-2176666,6*
NBPA	3911666,667	691666,6*

Significativo al 95% Valor Límite: 357188,0933.

alargamiento C-H asimétrico del grupo metilo a  $2959\text{ cm}^{-1}$  ( $3,38\mu\text{ m}$ ) y la del grupo metileno a  $2927\text{ cm}^{-1}$  ( $3,42\mu\text{ m}$ ) y el alargamiento simétrico C-H a  $2874\text{ cm}^{-1}$  ( $3,48\mu\text{ m}$ ). Se registran las vibraciones de flexión C-H a  $1466\text{ cm}^{-1}$  ( $6,82\mu\text{ m}$ ) y la flexión del grupo  $\text{CH}_3\text{CH}_2$  a  $1379\text{ cm}^{-1}$  ( $7,25\mu\text{ m}$ ).

De acuerdo con los resultados anteriores, puede inferirse que el microorganismo aislado degradó el fenantreno a juzgar por la desaparición de bandas características de este anillo aromático, así como también por la aparición de nuevas bandas (Figura 5). Los análisis comparativos realizados con los



Cerniglia, 1984  
 Gibson y Subramanian, 1994

Figura 3. Rutas catabólicas propuestas para la oxidación bacteriana del Fenantreno (Tomado de Cerniglia, 1984 ; Gibson y Subramanian, 1994).

espectros de absorción de los compuestos intermedios claves reportados en el catabolismo bacteriano del fenantreno, muestran que en la fase orgánica de la muestra estudiada, no están presentes ninguno de los compuestos patrones utilizados en el análisis.

### Conclusiones

El 98,72% de la variabilidad observada en la densidad de *Bacillus* sp. Frente a los cuatro tratamientos, tiene su explicación en las diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo suministrados al medio de cultivo enriquecido con fenantreno. Por lo tanto, el suministro de fósforo y nitrógeno afecta la velocidad de crecimiento y probablemente en la

eficacia con la cual el microorganismo utiliza el fenantreno como fuente de carbono y energía.

Para obtener un desarrollo óptimo de *Bacillus* sp. en los tratamientos aplicados, debe ser suministrado al medio de cultivo un amortiguador ligeramente alcalino para contrarrestar la acidificación resultante de catabolismo del fenantreno.

Con la espectroscopía de absorción en el infrarrojo se observa la aparición de bandas que corresponden a los metabolitos formados durante el catabolismo del fenantreno, así como también la desaparición de bandas características del compuesto poliaromático; sin embargo, no es un método químico eficaz para la identificación de los com-

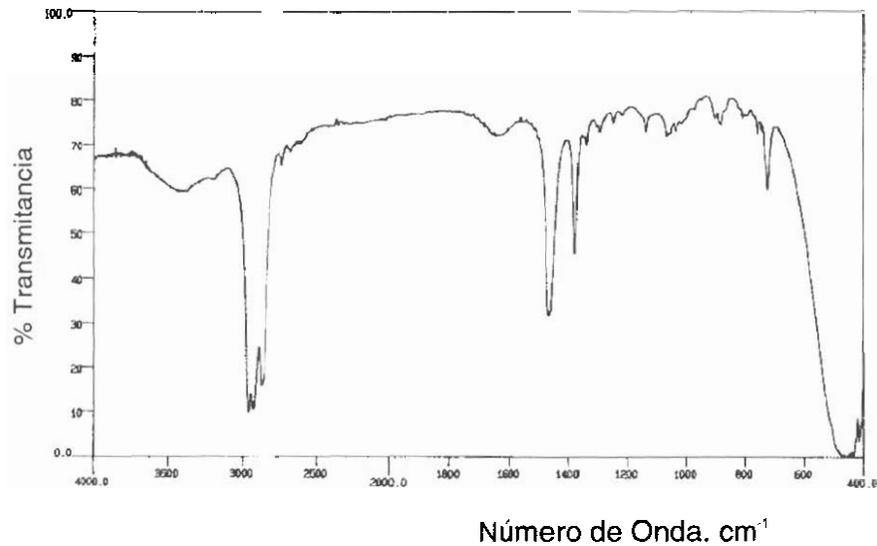


Figura 4 Espectro infrarrojo del cultivo puro de *Bacillus* sp.

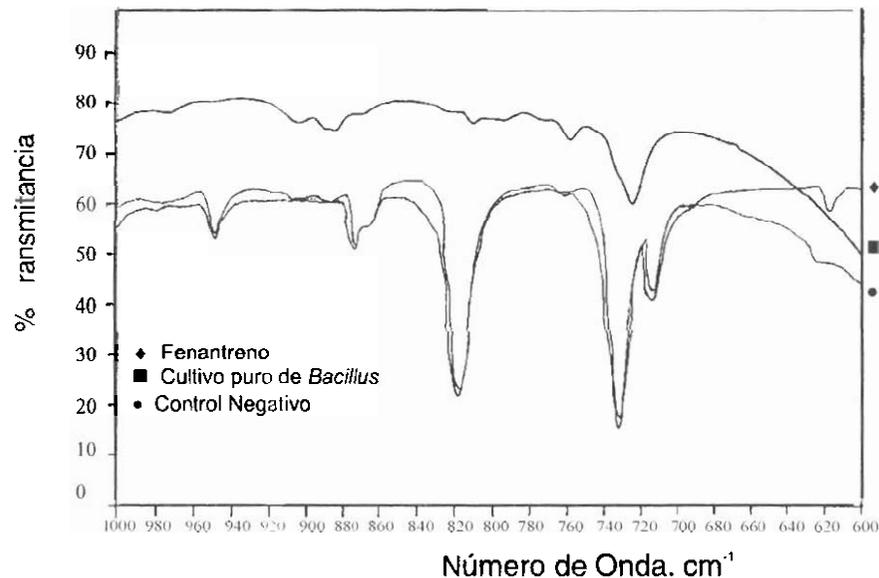


Figura 5. Espectro infrarrojo del Fenantreno, el control y del cultivo puro de *Bacillus* sp

puestos intermediarios, cuando es utilizado como única herramienta en el análisis químico, principalmente porque sólo puede ser analizada la fase orgánica. Por lo tanto se deben efectuar análisis químicos de la fase acuosa, con la finalidad de detectar compuestos intermediarios polares.

### Agradecimientos

Los autores dan un especial agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia por el financiamiento de esta investigación (Proyecto 1924-97). Agradecimiento muy

especial a Xiomara Montiel y Rodolfo Salas-Auvert por sus invaluable observaciones.

### Referencias Bibliográficas

1. ERNIGLIA C.E., YANG S.K. *Appl Environ Microbiol* 47 (1):119-124, 1984.
2. GUERIN W.F. *Microb Ecol* 17:89-104, 1989.
3. NARRO M.L., CERNIGLIA C.E., VAN BAALEN C., GIBSON D. T. *Appl Environ Microbiol* 58 (4):1351-1359, 1992.
4. BRUICE P.Y., BRUICE T.C., YAGI H., JERINA D.M. *J American Chem Soc* 98 (10):2973-2981, 1976.
5. BRUICE P.Y., BRUICE T.C., DANSETTE P.M., SELANDER H.G., YAGI H., JERINA D.M. *J American Chem Soc* 98 (10):2965- 2972, 1976.
6. JERINA D.M., SELANDER H., YAGI H., WELLS M.C., DAVEY J.F., MAHADEVAN V., GIBSON D.T. *J American Chem Soc* 98 (19):5988-5996, 1976.
7. KOREEDA M., NASEEM M.A., BOYD D.R., NEILL J.D., GIBSON D.T., JERINA D.M. *J Organ Chem* 43 (6):1023-1027, 1978.
8. CERNIGLIA C.E. *In Adv Appl Microbiol* Academic Press, INC. Vol 30. (USA), pp. 31-71, 1984.
9. BOUCHEZ M., BLANCHET D., HAESLER F., VANDECASTEELE J.P. *Revue de L'institut Français du Pétrole* 51 (6):797-828, 1996.
10. SIRVINS A., TRAMIER B. *Mundo Científico* 6(54):46-54, 1987.
11. LEAHY J.G., COLWELL R.R. *Microbiol Reviews* 54 (3):305-315, 1990.
12. FIELD J.A., STAMS A.J., KATO M., SCHRAA G. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67:47-77, 1995.
13. ZHOU E., CRAWFORD RONALD L. *Biodegradation* 6:127-140, 1995.
14. SWANNELL R.P.J., LEE K., McDONAGH M. *Appl Environ Microbiol* 60(2):342-365, 1996.
15. WILSON S.C., JONES K.C. *Environ Poll* 81:229-249, 1993.
16. WRIGHT A.L., WEAVER R.V., WEBB J.W. *Wate Air Soil Poll* 95:179-191, 1997.
17. MONTGOMERY D.C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A de C.V., pp. 589, 1991.
18. ARANHA H.G., BROWN L.R. *Appl Environ Microbiol* 42 (1):74-78, 1981.
19. GUERIN W.F., JONES G.E. *Appl Environ Microbiol* 55 (4):929-936, 1988.
20. KONEMAN E.W., ALLEN S.D., DOWELL V.R., JANDA W.M., SOMMERS H.M., WINN W.C. *Diagnóstico Microbiológico*. Tercera Edición, Editorial Médica Panamericana, S.A., Argentina, pp. 909, 1992.
21. HOLT J.G. ed. *The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company, Baltimore (USA), pp 836, 1984.
22. STUCKI G., ALEXANDER M. *Appl Environ Microbiol* 53 (2):292-297, 1987.
23. WEISSENFELS W.D., BEYER M. KLEIN J. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:479-484, 1990.
24. GIBSON D.T., SUBRAMANIAN, VENKITESWARAN. *In Microbial Degradation of Organic Compound*. Gibson, David T. ed. Marcel Dekker, INC. New York (USA), pp. 535, 1994.
25. BOUCHEZ M., BLANCHET D., HAESLER F., VANDECASTEELE J.P. *Revue de L'institut Français du Pétrole* 51(3):407-419, 1996.
26. WODZINSKI R.S., COYLE J.E. *Appl Microbiol* 27 (6): 1081-1084, 1974.
27. STANIER R.Y., ADELBERG E.A., INGRAHAM J.L. *Microbiología* Cuarta Edición, Editorial Reverté, S.A., España, pp. 836, 1987.
28. ERIKSSON H.M., BERDEN M., KAJ R., INGVAR N. *Water, Air and Soil Poll* 92:451-467, 1996.