

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de Tucumán

NÚCLEO DISCIPLINARIO: Ingeniería Agrícola

TÍTULO DEL TRABAJO: **CRECIMIENTO Y CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE LINDANO POR *STREPTOMYCES* M7 EN SUELOS CONTAMINADOS**

AUTOR (ES): María Soledad Fuentes (Directora: Dra. María Julia Amoroso)

CORREO ELECTRÓNICO: soledadfs@hotmail.com

PALABRAS CLAVES: Lindano, *Streptomyces*, remoción, suelo

Introducción

Actualmente ha surgido en el hombre la necesidad imperiosa de volver la mirada hacia el planeta, debido al desgaste creciente que lo ubica en una situación de alerta; a consecuencia de la falta de conciencia en cuanto a cómo evitar y cómo remediar aquellos problemas asociados a la polución.

En el caso del empleo de plaguicidas, el uso intensivo de los organoclorados, se incrementó a partir del final de la segunda guerra mundial; y entre ellos uno de los más utilizados fue el lindano (Zuloaga y col._{ref 1}). A consecuencia del uso intensivo de dichos plaguicidas, se ha detectado un aumento de hasta 10 veces en las concentraciones de lindano y metoxicloro en aguas del Río Salí (Tucumán), en relación a las concentraciones trazas permitidas (Chaile y col._{ref 2}). La baja solubilidad y la naturaleza clorada de estos plaguicidas, contribuye a su persistencia en el medio ambiente y resistencia a la degradación por los microorganismos (Phillips y col._{ref 3}).

La biorremediación es una técnica que puede ser adaptada a áreas muy contaminadas o moderadamente contaminadas, como lo son los suelos agrícolas (Khan y col._{ref 4}) y presenta varias ventajas sobre las tecnologías convencionales de tratamientos físicos y químicos de contaminantes (Ward_{ref 5}).

El uso de microorganismos para remediar ambientes contaminados es un área de la biotecnología ambiental que está en continuo cambio y crecimiento. Las comunidades microbianas no deben ser tratadas como “cajas negras”, sino que se deben estudiar profundamente los procesos biológicos de biorremediación y su impacto sobre el medio ambiente, a fin de lograr una tecnología confiable y segura (Iwamoto y Nasu_{ref 6}).

Los actinomicetes son bacterias fisiológicamente muy diversas, productoras de un gran número de metabolitos que sintetizan y excretan al medio (Goodfellow y col._{ref 7}; Ensign_{ref 8}). Estos microorganismos poseen propiedades únicas relacionadas a su capacidad para sobrevivir y crecer en el suelo, entre ellas se pueden mencionar la capacidad para producir enzimas extracelulares que degradan macromoléculas

complejas comúnmente presentes en el suelo (McCarthy_{ref 9}) y la capacidad de resistencia a la desecación, lo que favorece a su supervivencia en suelos extremadamente secos (McBride y Ensign_{ref 10}; Ensign_{ref 8}). Dentro de los actinomicetes se encuentra el género *Streptomyces* cuyas diferentes especies son utilizadas como productoras de antibióticos, enzimas y otras sustancias bioactivas, y constituyen uno de los taxones más importantes de microorganismos con aplicación industrial. Además desempeñan un papel importante en la biodegradación de sustancias naturales y sintéticas, tales como algodón y fibras vegetales, hidrocarburos, gomas y plásticos (Korn-Wendisch y Kutzner_{ref 11}).

Benimeli y col._{ref 12}, demostraron que ciertas especies acuáticas de *Streptomyces* presentan un gran potencial como agentes para la biorremediación de ambientes contaminados con plaguicidas organoclorados, lo que ratifica el potencial que poseen para biodegradar compuestos tóxicos. Además estos microorganismos son muy apropiados para la inoculación de suelos debido a su diversidad metabólica, velocidad de crecimiento, colonización de sustratos semi-selectivos y su capacidad de ser manipulados genéticamente (Pogell y col._{ref 13}).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el crecimiento y la capacidad de remoción de lindano por *Streptomyces* M7 en suelos contaminados.

Materiales y Métodos

Microorganismo.

Se usó una cepa de actinomicete aislada a partir de sedimentos de un canal de drenaje de una planta de filtros para la obtención de cobre, localizada en un área agrícola, contaminada con plaguicidas, en la provincia de Tucumán, Argentina. Dicha cepa fue identificada como *Streptomyces* M7 (Benimeli_{ref 14}).

Químicos y Medios de Cultivo.

Se empleó una solución patrón de lindano para cromatografía gaseosa (Accustandard) de concentración 1mg mL⁻¹. Los medios de cultivo utilizados fueron medio Caseína Almidón Agar (SC Agar) conteniendo almidón 10 g L⁻¹, caseína 1 g L⁻¹ (disuelta en NaOH 1 M), K₂HPO₄ 0,5 g L⁻¹ y agar 15 g L⁻¹ a pH 7.0 con HCl 2,7 M; y medio Tripteína Soja Caldo (TSB) conteniendo tripteína 15 g L⁻¹, peptona de soja 3 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2,5 g L⁻¹ y glucosa 2,5 g L⁻¹. Se ajustó a pH 7,3 ± 0,2 con HCl 2,7 M. Ambos medios se esterilizaron en autoclave a 1 atm. de sobrepresión (121 °C) durante 15 minutos.

Toma de muestras de suelo.

Se usaron muestras de suelo libres de contaminación con plaguicidas organoclorados, obtenidas a una profundidad entre 5 y 15 cm, liberadas de la cobertura vegetal. Las muestras colectadas se conservaron en recipientes plásticos, a una temperatura de 15 a 20 °C, al resguardo de la luz y la humedad.

Acondicionamiento de muestras de suelo.

Se separaron partículas macroscópicas indeseables (ramas, hojas, rocas, etc.) y se trituró el suelo en un mortero hasta lograr muestras homogéneas. El suelo se distribuyó en bandejas plásticas, con un espesor menor de 3 cm y se dejó secar en estufa, durante 3 días a 30 °C, con el objeto de disminuir la tasa de humedad para luego ajustarla al 20 %.

Preparación de frascos con suelo, ajuste de humedad y esterilización.

El suelo acondicionado y de humedad conocida se fraccionó en frascos de vidrio, colocando 200 g en cada uno de ellos y la cantidad de agua destilada necesaria para alcanzar un 20% humedad. Posteriormente, los frascos se esterilizaron en autoclave, realizando tres ciclos sucesivos de 1 h a 100 °C, con intervalos de 24 h entre cada ciclo. Luego se agregó una cantidad de agua destilada estéril equivalente a la pérdida ocasionada por la esterilización, y se dejaron reposar 36 h a temperatura ambiente, para equilibrar el contenido de agua en el suelo.

Determinación del crecimiento y capacidad de remoción de lindano por *Streptomyces* M7 en muestras de suelo estéril.

Los frascos con suelo estéril fueron adicionados con una cantidad adecuada de solución stock de lindano ($4.000 \mu\text{g L}^{-1}$) para alcanzar una concentración final de $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de suelo. Esta concentración se seleccionó de acuerdo a resultados de Benimeli_{ref 14}, quien determinó la presencia de lindano en sedimentos de la provincia de Tucumán, en concentraciones de 90 a $97 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de suelo. Los frascos con suelo contaminado con lindano se inocularon con una concentración microbiana de $0,5 \text{ g Kg}^{-1}$ de suelo y se incubaron a 30 °C durante 28 días. Para determinar la influencia de la concentración de microorganismo inoculado sobre la capacidad de *Streptomyces* M7 de remover lindano, se repitió el experimento sembrando los suelos con las siguientes concentraciones microbianas: 1,0; 2,0 y $4,0 \text{ g Kg}^{-1}$ de suelo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo controles de crecimiento de *Streptomyces* M7 en suelos no contaminados con el plaguicida. Por otro lado se efectuaron controles de degradación abiótica de lindano en suelos contaminados pero sin inocular con el microorganismo. El crecimiento microbiano se evaluó mediante el desarrollo de *Streptomyces* M7 cada 7 días durante 28 días, en suelos contaminados y no contaminados con lindano, sembrando diluciones apropiadas de los mismos en medio

SC Agar (método de las diluciones decimales sucesivas) para realizar un posterior recuento bacteriano (UFC g⁻¹) y la capacidad de remoción del plaguicida se evaluó determinando la concentración de lindano residual en las muestras de suelo, por cromatografía gaseosa.

Determinación de la capacidad de remoción de lindano por *Streptomyces* M7 en muestras de suelo no estéril.

Con el propósito de determinar la influencia de la población microbiana nativa del suelo sobre la capacidad de biorremediación de lindano por *Streptomyces* M7, se realizaron ensayos de captación del plaguicida en muestras de suelo no estéril. Se procedió de la misma forma que en el punto anterior pero trabajando con suelo sin esterilizar y con la concentración óptima de inóculo determinada previamente (2,0 g Kg⁻¹ de suelo).

Para el estudio de la capacidad de captación del plaguicida se determinó la concentración de lindano residual en las muestras de suelo, empleando un cromatógrafo gaseoso con detector de captura de electrones.

Resultados y Discusión

Determinación del crecimiento y capacidad de degradación de lindano, por *Streptomyces* M7 en muestras de suelo estéril y no estéril.

En base a conocimientos previos relacionados con la capacidad de cepas de *Streptomyces* de transformar sustancias como metolaclo en suelo estéril contaminado (Liu y col.^{ref 15}), y a resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio acerca de la capacidad de *Streptomyces* M7 para remover y degradar lindano a partir de un medio de cultivo acuoso (Benimeli^{ref 14}; Benimeli y col.^{ref 12, ref 16}), se realizaron ensayos para determinar el crecimiento y la remoción de lindano por parte de *Streptomyces* M7, en muestras de suelo estéril y no estéril.

Determinación del crecimiento y capacidad de remoción de lindano, por *Streptomyces* M7 en muestras de suelo estéril.

Los ensayos de crecimiento de *Streptomyces* M7 se llevaron a cabo durante 28 días en muestras de suelo estéril, tanto en presencia como en ausencia de lindano. Cabe destacar que debido a la heterogeneidad del medio con que se trabaja (suelo 20% de humedad), los resultados obtenidos en los recuentos bacterianos (UFC g⁻¹ de suelo) presentan errores independientes del manejo de las muestras. Con el objeto de determinar la concentración óptima de inóculo que permitiera un proceso de

biorremediación más eficiente, las muestras de suelo se inocularon con diferentes concentraciones de *Streptomyces* M7 obteniéndose los resultados observados en las figuras 1, 2, 3 y 4.

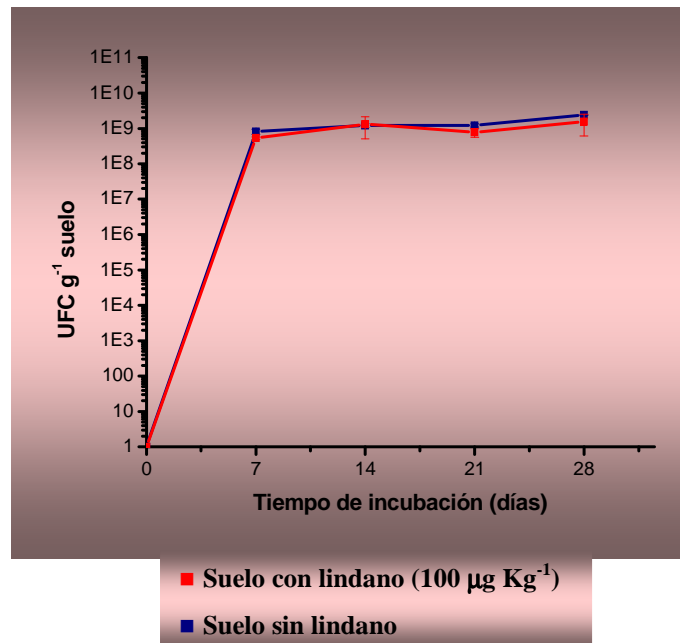


Figura 1. Crecimiento de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 0,5g Kg⁻¹) en muestras de suelo estéril, en presencia y ausencia de lindano (100 µg Kg⁻¹)

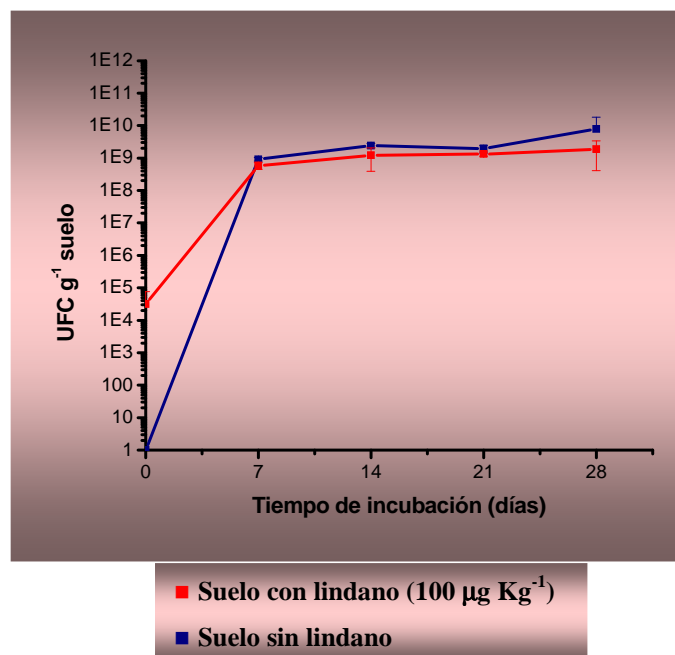


Figura 2. Crecimiento de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 1,0 g Kg⁻¹) en muestras de suelo estéril, en presencia y ausencia de lindano (100 µg Kg⁻¹)

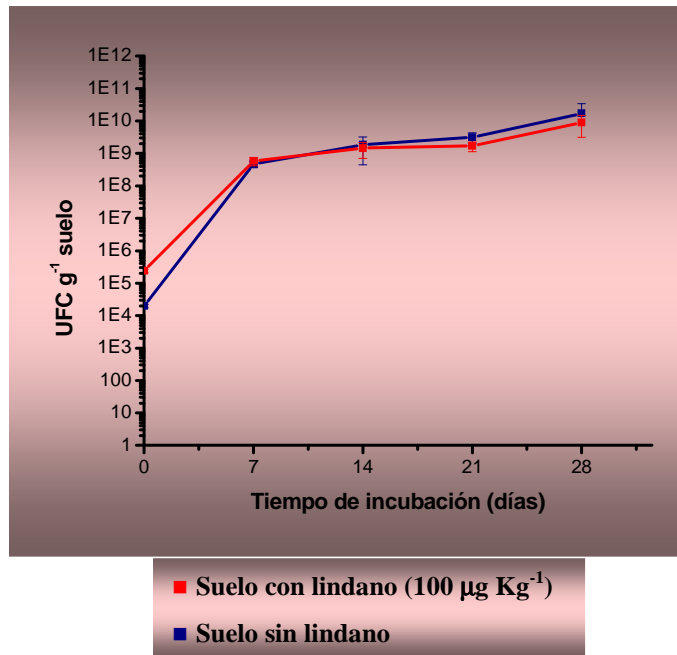


Figura 3. Crecimiento de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 2,0 g Kg⁻¹) en muestras de suelo estéril, en presencia y ausencia de lindano (100 µg Kg⁻¹).

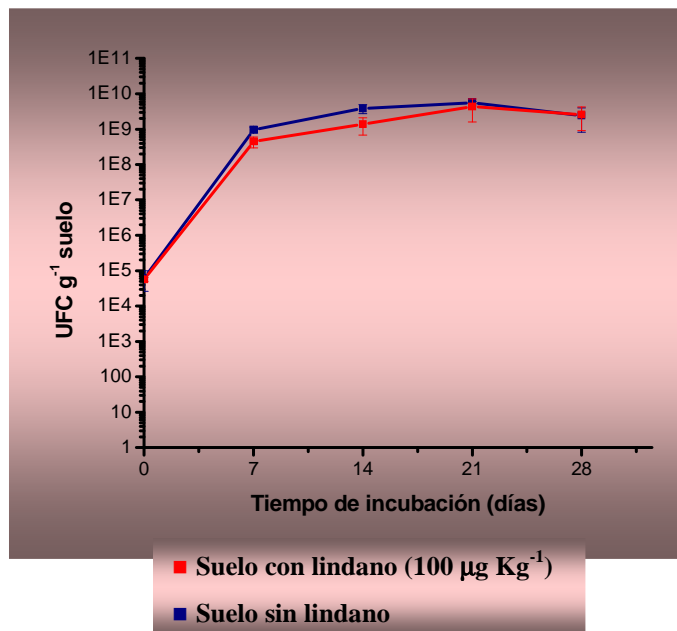


Figura 4. Crecimiento de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 4,0 g Kg⁻¹) en muestras de suelo estéril, en presencia y ausencia de lindano (100 µg Kg⁻¹).

El perfil de crecimiento de *Streptomyces* M7 en suelo estéril contaminado con lindano fue similar al del control sin el agregado del plaguicida, en todos los casos, presentando un marcado crecimiento hasta los 14 días de incubación. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas con respecto al perfil de crecimiento de *Streptomyces* M7 en suelo estéril contaminado, frente a variaciones en la concentración inicial de microorganismo inoculado.

En estudios previos realizados por Ajithkumar y col.^{ref 17}, en los cuales se probaron tres inóculos de *Pseudomona aeruginosa* 3mT (1, 2 y 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de suelo), para degradar los compuestos 3-clorobenzoato y 4-clorobenzoato, se observó que los tres eran efectivos para degradar los químicos correspondientes, aunque la degradación fue más rápida con un mayor tamaño de inóculo.

Liu y col.^{ref 15} estudiaron la transformación de metolaclo en suelo por parte de una cepa de *Streptomyces* sp., y observaron que al inocular suelo estéril con el microorganismo el rendimiento de los productos obtenidos era afectado por el tamaño del inóculo, siendo los porcentajes de transformación del herbicida directamente proporcionales a la cantidad de *Streptomyces* sp. inoculada en los suelos.

Al determinar los tiempos de duplicación (**tabla 1**), se encontró que los menores valores, tanto en los controles como en suelos contaminados, correspondían a un inóculo de 4,0 g Kg^{-1} . Sin embargo cuando el mismo fue de 2,0 g Kg^{-1} , el tiempo de duplicación de *Streptomyces* M7 obtenido en suelos contaminados con lindano fue menor al del control, por lo tanto, se decidió seleccionar a este inóculo como óptimo para los próximos ensayos. Aunque el tiempo de duplicación obtenido al inocular 1,0 g Kg^{-1} en suelo contaminado con plaguicida fue menor, se seleccionó la concentración de 2,0 g Kg^{-1} de suelo para favorecer la colonización del suelo, ya que estudios previos demostraron que la degradación de plaguicidas requiere de un crecimiento eficiente y una competición efectiva con los microorganismos indígenas, que conduzca a una colonización exitosa del ambiente contaminado (Canet y col.^{ref 18}).

Tabla 1- Tiempos de duplicación de *Streptomyces* M7 en suelo estéril contaminado con lindano (100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Concentración de inóculo (g Kg^{-1} suelo)	Tiempo de duplicación (días)	
	Suelo sin lindano	Suelo con lindano
0,5	1,712	2,625
1,0	1,529	2,397
2,0	2,995	2,419
4,0	1,453	1,565

Determinación de lindano residual en muestras de suelo estéril y no estéril.

Determinación de lindano residual en muestras de suelo estéril.

Con el objetivo de estudiar la capacidad de *Streptomyces* M7 de remover lindano de las muestras de suelo, se determinó la concentración de lindano residual biodisponible en las mismas mediante cromatografía gaseosa; obteniéndose los resultados expuestos en las **figuras 5, 6, 7 y 8**.

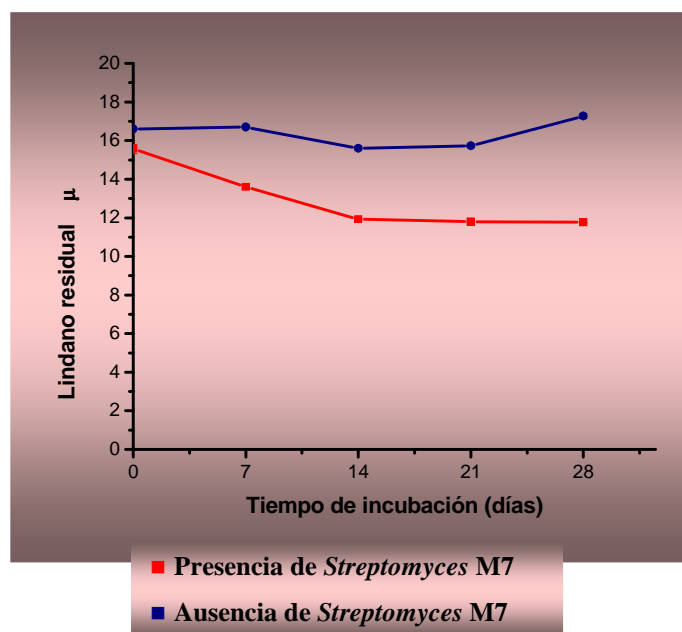


Figura 5. Variación de la concentración de lindano residual (concentración inicial $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$) en muestras de suelo estéril, en presencia y ausencia de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial $0,5 \text{ g Kg}^{-1}$).

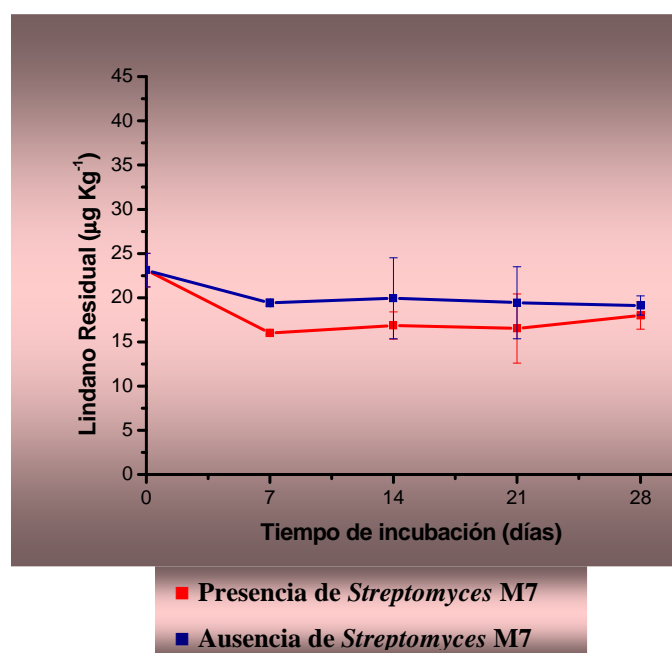


Figura 6. Variación de la concentración de lindano residual (concentración inicial $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$) en muestras de suelo estéril, en presencia y ausencia de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 1 g Kg^{-1}).

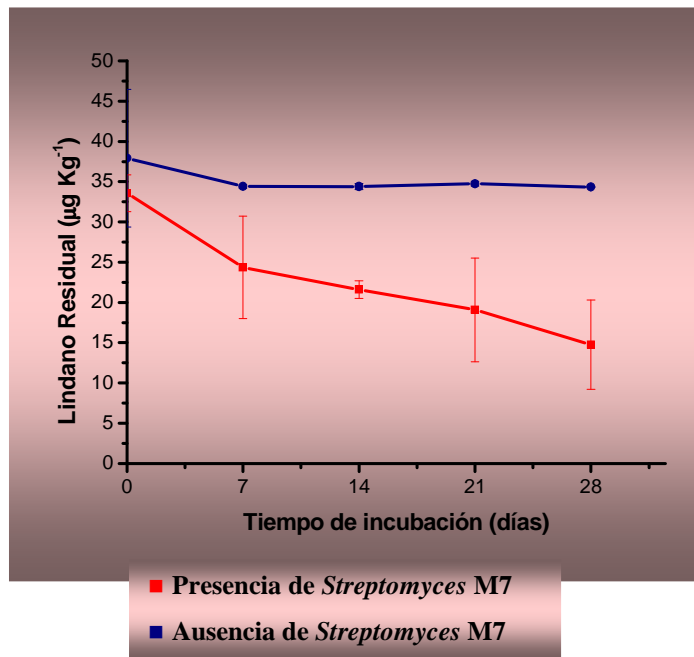


Figura 7. Variación de la concentración de lindano residual (concentración inicial 100 µg Kg⁻¹) en muestras de suelo estéril en presencia y ausencia de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 2 g Kg⁻¹).

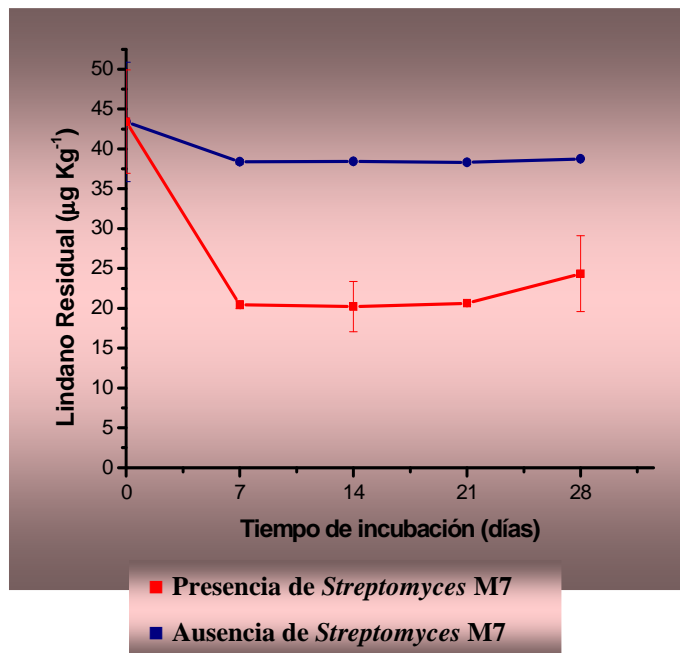


Figura 8. Variación de la concentración de lindano residual (concentración inicial 100 µg Kg⁻¹) en muestras de suelo estéril, en presencia y ausencia de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 4 g Kg⁻¹).

Si bien las muestras de suelo se contaminaron con $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de lindano, las concentraciones de plaguicida obtenidas por cromatografía gaseosa fueron inferiores. Esto se debe a la formación de agregados y a la adsorción del plaguicida a las partículas del suelo, lo cual dificulta la extracción del lindano, obteniéndose resultados experimentales diferentes a la concentración teórica inicial (Quintero y col.^{ref 19}). La cepa *Streptomyces* M7 fue capaz de remover el plaguicida del suelo en todos los casos, en relación a los controles. Al comparar la disminución de lindano durante el tiempo, en las muestras de suelo, con los diferentes inóculos iniciales de *Streptomyces* M7 se observó que la máxima capacidad de remoción se obtuvo cuando el suelo fue inoculado con una concentración del microorganismo de 2 g Kg^{-1} de suelo (**tabla 2**). Cabe destacar que en este caso, *Streptomyces* M7 mantuvo su actividad de remoción del plaguicida hasta los 28 días de incubación, mientras que para las otras concentraciones de microorganismo inoculadas, la concentración de lindano residual en el suelo se mantuvo prácticamente constante a partir de los 14 días.

En trabajos previos, Shelton y col.^{ref 20} observaron, al inocular con la cepa *Streptomyces* PS1/5 un suelo contaminado con atrazina, que la máxima remoción del herbicida en el suelo se producía entre los días 7 y 14 de incubación, alcanzando un porcentaje de remoción del 78% a los 28 días. En el caso de *Streptomyces* M7, este período coincide con un incremento en el recuento microbiano en las muestras de suelo, el cual presentó un valor máximo en ese momento (ver resultados expuestos anteriormente).

Tabla 2- Remoción de lindano por *Streptomyces* M7 para las diferentes concentraciones bacterianas inoculadas en las muestras de suelo estériles.

Concentración microbiana (g Kg^{-1} suelo)	Remoción de lindano (%)
0,5	24,4
1,0	30,8
2,0	56,0
4,0	53,6

Por otra parte, en la bibliografía consultada se encontraron trabajos realizados con diferentes especies bacterianas que sostienen que, en condiciones aeróbicas, los isómeros α - y γ -HCH se degradan durante los primeros 12-14 días de incubación (Johri y col.^{ref 21}; Datta y col.^{ref 22}; Manonmani y col.^{ref 23}).

Determinación de lindano residual en muestras de suelo no estéril.

A fin de conocer la influencia de la población microbiana nativa del suelo sobre la capacidad de remoción de lindano por *Streptomyces* M7, se determinó lindano residual en las muestras de suelo no estéril (figura 9).

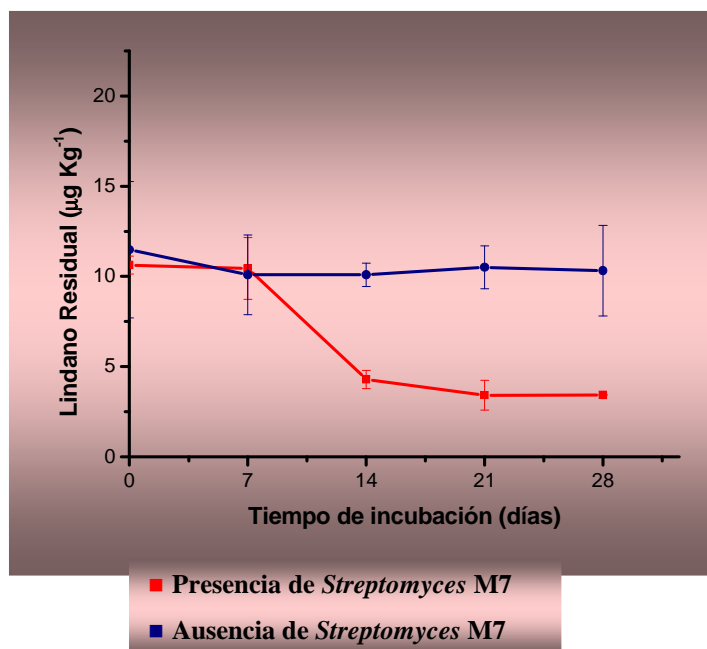


Figura 9. Lindano residual (concentración inicial 100 µg Kg⁻¹) en suelo no estéril en presencia y ausencia de *Streptomyces* M7 (inóculo inicial 2,0 g Kg⁻¹).

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer que la microflora nativa no está involucrada en la remoción de lindano, ya que la concentración residual del plaguicida en los suelos sin inocular permaneció prácticamente constante a través del tiempo. Por el contrario, en presencia de *Streptomyces* M7, se observó un descenso en la concentración de lindano residual entre los días 7 y 14 de incubación, lográndose en ese tiempo un porcentaje de remoción aproximado del 60%. Al final del ensayo *Streptomyces* M7 produjo una remoción del 68% de lindano presente en las muestras de suelo.

En trabajos previos, Bidlan y col.^{ref 24} estudiaron la biorremediación de suelos contaminados con HCH-técnico, empleando un consorcio bacteriano capaz de degradar HCH, y observaron que la degradación del plaguicida por parte de microflora indígena fue muy limitada.

En contrapartida a lo expuesto, Quintero y col.^{ref 25} al estudiar la degradación anaeróbica de los isómeros del HCH en sistemas líquidos y fangosos, observaron que

la microflora del suelo tenía capacidad para degradar parcialmente los isómeros de HCH.

Estudios previos demostraron que el potencial de degradación de plaguicidas por parte de la microflora anaeróbica del suelo depende principalmente del grado de exposición de los microorganismos a los contaminantes, es decir del grado de adaptación (Van Eekert y col.^{ref 26}).

Conclusiones

- Se determinó que el perfil de crecimiento de *Streptomyces* M7 en muestras de suelo estéril contaminado con lindano 100 µg Kg⁻¹ fue similar al del control sin contaminar, para todas las concentraciones de inóculo ensayadas.
- Se seleccionó el inóculo de *Streptomyces* M7 de 2,0 g Kg⁻¹ de suelo (peso húmedo), porque fue el que presentó menor tiempo de duplicación en suelos contaminados con lindano que los controles sin contaminar.
- *Streptomyces* M7 fue capaz de remover lindano 100 µg Kg⁻¹ en muestras de suelo estéril, para todas las concentraciones microbianas inoculadas, en relación a los controles. La máxima capacidad de remoción (56,0%) del plaguicida se obtuvo cuando el suelo fue inoculado con una concentración del microorganismo de 2 g Kg⁻¹ de suelo
- La microflora nativa del suelo no estuvo involucrada en la remoción de lindano, no observándose variaciones en la concentración del plaguicida durante el tiempo de incubación. Por el contrario, en los suelos inoculados con *Streptomyces* M7 se observó una remoción aproximada del 68% de lindano a los 28 días de incubación.

Referencias Bibliográficas

- 1 Zuloaga, O.; Etxebarria, N.; Fernandez, L .A. & Madariaga, J.L. (2000).** Optimization and comparison of MAE, ASE and Soxhlet extraction for the determination of HCH isomers in soil samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367: 733-737.
- 2 Chaile, A.P; Romero, N.; Amoroso, M.J.; Hidalgo, M. del V. & Apella, M.C. (1999).** Organochlorine pesticides in Sali River. Tucumán – Argentina (In Spanish). *Rev Bol Ecol.* 6: 203-209.
- 3 Phillips, T. M., Seech, A.G., Lee, H. & Trevors, J.T. (2001).** Colorimetric assay for lindane dechlorination by bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 47: 181-188.

- 4 Khan, F.I.; Husain, T., Hejazi, R. (2004).** An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* **71**: 95–122.
- 5 Ward, O. (2004).** The industrial sustainability of bioremediation processes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 1-4.
- 6 Iwamoto, T. & Nasu, M. (2001).** Current bioremediation practice and perspective. *J. Biosci. Bioeng.* **92** (1): 1-8.
- 7 Goodfellow, M.; Williams, S.T. & Mordarski, M. (1988).** Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, San Diego. USA.
- 8 Ensign, J.C (1990).** Introduction to the Actinomycetes. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder, W and Schleifer K, eds.), pp. 811 – 815, Springer, New York. USA.
- 9 McCarthy, A.J. (1989).** Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 145-163.
- 10 McBride, M.J. & Ensign, J.C. (1987).** Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.* **169**: 4995-5001.
- 11 Korn-Wendisch F. y Kutzner H.J. (1992).** The Family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder, W and Schleifer K), pp. 921 – 995, Springer, New York. USA.
- 12 Benimeli, C.S.; Castro, R.G; Chaile, A.P. y Amoroso, M.J. (2006).** Lindane removal induction by *Streptomyces* sp. M7. *J. Basic. Microbiol.* **46**: 5, 348-357.
- 13 Pogell, B.M.; Zhang, H-L. & Feng, Y-M (1991).** Expression of veratryl alcohol oxidase activity and cloned fungal lignin peroxidase in *Streptomyces lividans*. International Symposium on Biology of Actinomycetes. Madison, WI. USA.
- 14 Benimeli, C.S., (2004).** Biodegradación de plaguicidas organoclorados por actinomycetes acuáticos. Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.
- 15 Liu, S.Y.; Lu, M.H & Bollag, J.M. (1990).** Transformation of metolachlor in soil inoculated with a *Streptomyces* sp. Kluwer Academia Published, Biodegradation **1**: 9-17.
- 16 Benimeli, C.S.; Castro, G.R.; Chaile, A.P. and Amoroso, M.J. (2007).** Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. Strain M7. *International Biodegradation and Biodeterioration.* **59** (2): 148-155.
- 17 Ajithkumar P.V.; Gangadhara, K.P.; Manilal P. y Kunhi (1998).** Soil inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* 3MT eliminates the inhibitory effect of 3-chloro- and 4-chlorobenzoate on tomato seed germination. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1053-1059.
- 18 Canet, R.; Birnstingl, J.; Malcolm, D.; Lopez Real, J. and Beck, A. (2001).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combination of white rot fungi in a coal tar contaminated soil. *Bioresource Technol.* **76**: 113-117.
- 19 Quintero, J.C.; Moreira, M.T.; Lema, J.M. y Feijoo, G. (2006).** An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. *Chemosphere.* **63**: 1005-1013.
- 20 Shelton, D.R.; Khader, S.; Karns, J.S. & Pogell, B.M. (1996).** Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Biodegradation.* **7**: 129-136.
- 21 Johri, A.K.; Dua, M.; Tuteja, D.; Saxena, R.; Saxena, D.M. & Lal, R. (1998).** Degradation of alpha, beta, gamma and delta-hexachlorocyclohexanes by *Sphingomonas paucimobilis*. *Biotechnol. Lett.* **20**: 885-887.
- 22 Datta, J.; Maiti, A.K.; Modak, D.P.; Chakrabartty, P.K.; Bhattacharyya, P. y Ray, P.K. (2000).** Metabolism of gamma-hexachlorocyclohexane by *Arthrobacter citreus* strain BI-100: Identification of metabolites. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**(2): 59-67.
- 23 Manonmani, H.K.; Chandrashekariah, D.H.; Sreedhar Reddy, N.; Elecy, C.D. and Kunhi, A.A.M. (2000).** Isolation and acclimation of a microbial consortium for

improved aerobic degradation of α -hexachlorocyclohexane. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 4341-4351.

24 Bidlan, R.; Afsar, M. y Manonmani, H.K. (2004). Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere.* **56**: 803-811.

25 Quintero, J.C.; Moreira, M.T.; Feijoo, G. y Lema, J.M. (2005). Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere.* **61**: 528-536.

26 Van Eekert, M.H.; Van Ras, N.J.P.; Mentink, G.H.; Rijnaarts, H.H.M.; Stams, A.J.M; Field, J.A. & Schraa, G. (1998). Anaerobic transformation of β -hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 3299-3304.