



Programa de la asignatura:

Biorremediación

U2

Organismos implicados en procesos de Biorremediación



DCSBA



BIOTECNOLOGÍA



Organismos implicados en procesos de Biorremediación



TRENDS in Biotechnology

Roles de los diferentes microorganismos involucrados en la biorremediación.

Tomado de:

[http://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799\(08\)00023-](http://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(08)00023-)



Índice

Presentación.....	4
Propósitos de la unidad.....	4
Competencia específica de la unidad.....	4
2.1 Bacterias	5
2.1.1 Importancia de la diversidad microbiana en la biorremediación.....	5
2.1.2 Metabolismo aerobio	9
2.1.3 Metabolismo anaerobio	23
2.2 Hongos y levaduras.....	31
2.2.1 Importancia de los hongos y levaduras en la biorremediación	31
2.2.2 Metabolismo y mecanismos degradación de contaminantes.....	32
2.3 Plantas.....	41
2.3.1 Las plantas y su aplicación en la biorremediación	41
Actividades.....	51
Autorreflexiones	51
Cierre de Unidad	51
Fuentes de consulta	52



Presentación

A nivel mundial la contaminación ha ido incrementado debido al avance de las actividades industriales y el crecimiento poblacional. Cada año los países generan toneladas de desperdicios no biodegradables, lo que provoca su acumulación en el ambiente. En las últimas décadas, una de las técnicas que se ha empleado para eliminar a los contaminantes es la **biorremediación**.

Como vimos en la unidad 1, la biorremediación es una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente.

En esta unidad estudiaremos aquellos seres vivos (microorganismos y plantas) que se utilizan en los procesos de biorremediación; identificaremos y comprenderemos las características metabólicas que justifican su aplicación en esta rama de la biotecnología, que ofrece ser económica y amigable para los diferentes ecosistemas. Además, conoceremos los diferentes mecanismos que poseen estos seres vivos para tolerar y detoxificar diversos contaminantes.

Propósitos de la unidad

- Identificar los microorganismos involucrados en procesos de biorremediación
- Identificar los principales mecanismos de detoxificación que poseen microorganismos y plantas
- Distinguir las características de las plantas utilizadas en la fitorremediación

Competencia específica de la unidad

Diferenciar las características metabólicas de microorganismos y plantas, para seleccionar aquellos que pueden ser empleados en la recuperación de un ambiente contaminado, mediante la identificación de los mecanismos de detoxificación.



2.1 Bacterias

Las bacterias son los actores principales en la biorremediación; son organismos microscópicos que pueden vivir prácticamente en todas partes. Las bacterias pueden destruir contaminantes peligrosos o transformarlos a formas menos perjudiciales. Las bacterias utilizan a los contaminantes como fuente de energía y nutrientes para crecer y desarrollarse. Las bacterias tienen ciertas ventajas sobre otros organismos para ser empleadas en procesos de biorremediación como son: su alta velocidad de replicación y crecimiento, su amplia variabilidad genética y son los únicos organismos que pueden trabajar en condiciones anaerobias para degradar gran cantidad de contaminantes.

Enlaces

Recuerda que en la asignatura de “Microbiología” ya estudiaste las necesidades nutricionales de los microorganismos, y en la asignatura de la “Bioquímica” revisaste las diferentes rutas metabólicas que hay en los seres vivos, de tal manera que ahora te será más fácil comprender los mecanismos de degradación de contaminantes.

A continuación, revisaremos cómo las bacterias destruyen los contaminantes y qué tipos de bacterias participan en la biorremediación.

2.1.1 Importancia de la diversidad microbiana en la biorremediación

Los microorganismos se pueden aislar en cualquier ambiente; pueden adaptarse y crecer a temperaturas bajo cero, así como en calor extremo, en condiciones desérticas, en agua, con un exceso de oxígeno y en condiciones anaeróbicas, en presencia de compuestos peligrosos o en cualquier tipo de residuos (Figura 1). Los principales requisitos para que los microorganismos crezcan son una fuente de energía y una fuente de carbono (Vidali 2001).



Figura 1. *Los microorganismos viven en todas partes, incluso en lugares en los que pensamos que son incompatibles con la vida.*

Tomado de:
<http://learn.genetics.utah.edu/content/gsl/diversity/>

Debido a la capacidad de adaptación de los microorganismos, estos son utilizados para degradar o limpiar contaminantes ambientales. Los microorganismos que se emplean varían, dependiendo de la naturaleza química de contaminantes, y se deben seleccionar cuidadosamente, ya que sólo sobreviven dentro de un rango limitado de contaminantes.

Hasta ahora, se ha demostrado que numerosos contaminantes liberados al medio ambiente, son biodegradados tanto en ambientes normales como extremos. Esto enfatiza las capacidades metabólicas que tienen los microorganismos. Además, aquellos adaptados a más de una condición, y de forma especial a más de una condición extrema, ofrecen un potencial especial para la descontaminación biológica en hábitats donde diferentes condiciones, incluso extremas, están presentes o prevalecen simultáneamente (Margesin & Schinner, 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que existen numerosas ventajas al emplear cultivos mixtos de microorganismos en comparación con cultivos puros durante el proceso de biorremediación (Sathishkumar et al., 2008). Debido a los efectos de interacciones sinérgicas entre los miembros de una asociación o también llamado consorcio de microorganismos. Es posible que en estas interacciones sinérgicas una especie remueva los metabolitos tóxicos, que de otra manera dificultaría la actividad microbiana de otras especies posteriores a esta. Es también posible que la segunda especie sea capaz de degradar compuestos que la primera especie sólo es capaz de degradarla parcialmente (Deppe et al., 2005).



Consorcio microbiano

Es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales.

(Brenner y col., 2008).

Lo anterior muestra la importancia de la diversidad microbiana en la biorremediación y en cómo se ha avanzado en años recientes para entender cómo funciona y así poder aprovechar esta diversidad en favor de la limpieza de los ambientes contaminados.

En este sentido, los consorcios bacterianos que son ubicuos en la naturaleza, pueden llevar a cabo tareas mucho más complicadas y difíciles en ambientes cambiantes que lo que puede hacer un cultivo puro. Esto debido a que son más robustos, en primer lugar, los miembros del consorcio se comunican unos con otros a través de un intercambio de metabolitos implicados en mecanismos de señalización, por lo que un miembro del consorcio le responde a otro. Esta comunicación activa el siguiente factor importante que es la división de labores, ya que todos los productos del consorcio son resultado de las tareas conjuntas de los individuos pertenecientes al consorcio. Otra característica importante de los consorcios microbianos es la habilidad para llevar a cabo funciones que requieren múltiples pasos, es decir, un individuo sintetiza un producto que a su vez es sustrato de otro y así sucesivamente (Figura 2).

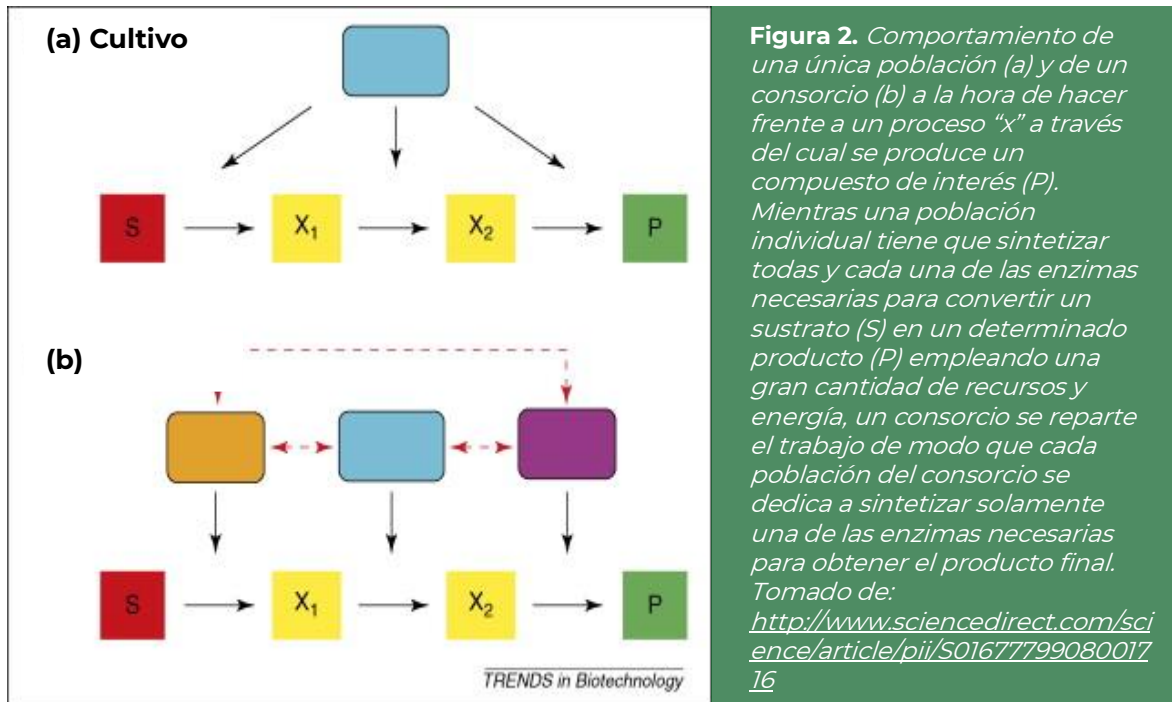


Figura 2. Comportamiento de una única población (a) y de un consorcio (b) a la hora de hacer frente a un proceso "x" a través del cual se produce un compuesto de interés (P).

Mientras una población individual tiene que sintetizar todas y cada una de las enzimas necesarias para convertir un sustrato (S) en un determinado producto (P) empleando una gran cantidad de recursos y energía, un consorcio se reparte el trabajo de modo que cada población del consorcio se dedica a sintetizar solamente una de las enzimas necesarias para obtener el producto final.

Tomado de:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779908001716>

Así en biorremediación, es posible que en estas interacciones sinérgicas una especie remueva los metabolitos tóxicos, que de otra manera dificultaría la actividad microbiana de otras especies. Es también posible que la segunda especie sea capaz de degradar compuestos que la primera especie sólo es capaz de degradar parcialmente (Deppe et al., 2005).

En general, las bacterias empleadas en la biorremediación se pueden subdividir dentro de los siguientes grupos:

- **Aeróbicos.** Son aquellos microorganismos que **necesitan oxígeno para crecer**. Algunos ejemplos de géneros bacterianos aeróbicos reconocidas por su potencial biorremediador son *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium*. Estos microorganismos han sido reportados como degradadores de pesticidas e hidrocarburos, tanto alcanos como como compuestos poliaromáticos. Muchas de estas bacterias usan a los contaminantes como única fuente de carbono y energía.
- **Anaeróbicos.** Son aquellos organismos que son **capaces de crecer en ausencia de oxígeno**. Las bacterias anaeróbicas no son usadas tan frecuentemente como las bacterias aeróbicas en la biorremediación.



Actualmente, se ha encontrado que muchas bacterias anaeróbicas son capaces de degradar bifenilos policlorados en sedimentos de ríos, así como participar en la eliminación del cloro del tricloroetileno y cloroformo.

- *Metilotrofos*. Son un grupo de bacterias aeróbicas que **crecen utilizando el metano como fuente de carbono y energía**. La enzima inicial en la ruta metabólica para la degradación aerobia, la monooxigenasa de metano, tiene una amplia gama de sustratos y es activa contra una amplia gama de compuestos, incluyendo los compuestos alifáticos clorados como el tricloroetileno y el 1,2-diclorometano.

A continuación, revisaremos con más detalle el metabolismo de cada uno de estos tipos de microorganismos empleados en la degradación de contaminantes.

2.1.2 Metabolismo aerobio

Los contaminantes orgánicos más comunes en el ambiente son componentes de aceites minerales y productos halogenados derivados de los productos petroquímicos. La degradación más rápida y completa de la mayoría de los contaminantes es provocada en condiciones aerobias. Por lo que, la capacidad de los microorganismos aerobios es de gran relevancia para la biodegradación de dichos compuestos.

Las características esenciales de los microorganismos aerobios que degradan los contaminantes orgánicos son (Figura 3):

1. Los productos químicos deben ser accesibles a los organismos que tienen capacidad de biodegradación. Por ejemplo, los hidrocarburos son insolubles en agua y su degradación requiere la producción de biosurfactantes.
2. El ataque intracelular inicial de contaminantes orgánicos es un proceso oxidativo, la activación y la incorporación de oxígeno es la reacción enzimática catalizada clave por **oxigenasas** y **peroxidases**.
3. Las degradaciones en las vías periféricas convierten los contaminantes orgánicos en sustratos intermedios del metabolismo



intermediario central, por ejemplo, el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT).

- La biosíntesis de la biomasa celular a partir de los metabolitos centrales, por ejemplo, acetil-CoA, succinato, piruvato.

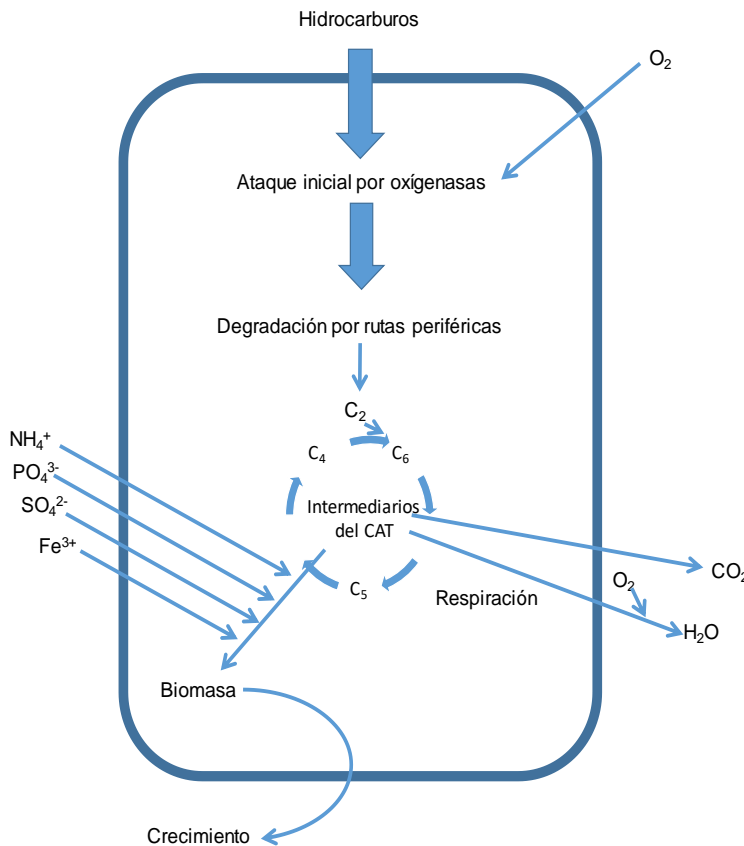


Figura 3. Principio fundamental de la degradación aeróbica de los hidrocarburos: procesos de crecimiento asociados.

Tomado de:
http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

Un gran número de géneros de bacterias y hongos poseen la capacidad de biodegradar los contaminantes orgánicos. La biodegradación se basa en dos procesos: el **crecimiento** y **cometabolismo**. En el caso de crecimiento, los contaminantes orgánicos se utilizan como única fuente de carbono y energía. Este proceso da lugar a una degradación completa (mineralización) de los contaminantes orgánicos. En el cometabolismo la degradación de un compuesto orgánico es en presencia de un sustrato que se utiliza como fuente de carbono y energía. Las reacciones enzimáticas clave en la biodegradación aeróbica son oxidaciones catalizadas por **oxigenasas** y **peroxidasas**.



Oxidoreductasas

Son las enzimas encargadas de catalizar las reacciones celulares donde se pierden y se ganan electrones.

Dentro de esta clasificación de enzimas se encuentran las siguientes óxidoreductasas: deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas, peroxidasas y reductasas.

(http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf)

A continuación, revisaremos los principios de degradación de algunos contaminantes por bacterias aerobias.

Principios de degradación aerobia bacteriana.

En las zonas aerobias de los sitios contaminados con compuestos orgánicos, las principales bacterias degradadoras son las especies quimio-organotróficas capaces de utilizar un gran número de compuestos naturales y xenobióticos como fuentes de carbono y donadores de electrones para la generación de energía.

Aunque muchas bacterias son capaces de metabolizar los contaminantes orgánicos, una sola bacteria no posee la capacidad enzimática para degradar todos o incluso la mayoría de los compuestos orgánicos en un suelo contaminado. Sin embargo, comunidades microbianas mixtas tienen mayor potencial biodegradativo debido a que es necesario la información genética de más de un organismo para degradar las mezclas complejas de compuestos orgánicos presentes en los sitios contaminados.

Las bacterias predominantes de suelos contaminados pertenecen a un espectro de géneros y especies que se presentan en la Tabla 1. Debemos tener en cuenta que la mayoría de las bacterias presentes en los suelos no pueden ser cultivadas en el laboratorio todavía.



Tabla 1. Bacterias predominantes en suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos y aromáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos clorados.

Bacterias Gram Negativas	Bacterias Gram Positivas
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Nocardia spp.</i>
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>
<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Corynebacterium spp.</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Arthrobacter spp.</i>
<i>Cytophaga group</i>	
<i>Xanthomonas spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>

(Fritsche y Hofrichter, 2000)

Dentro del grupo de bacterias Gram negativas, el género *Pseudomonas* parece tener el mayor potencial de degradación, por ejemplo, *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens*. Otros microorganismos importantes capaces de degradar contaminantes orgánicos se pueden encontrar dentro de los géneros *Comamonas*, *Burkholderia*, y *Xanthomonas*. Algunas especies utilizan más de 100 compuestos orgánicos diferentes como fuentes de carbono. El inmenso potencial de las *Pseudomonas* no depende únicamente de las enzimas catabólicas, sino también en su capacidad de regulación metabólica. Un segundo grupo importante de bacterias capaces de degradar contaminantes son los *Rhodococcus* y los *Corineformes* son bacterias Gram positivas.

Enlaces

Recuerda que en la asignatura de “Microbiología” ya estudiaste en que consiste la tinción de Gram, de tal manera que ahora te será más fácil comprender como se clasifican las bacterias para de degradación de contaminantes.



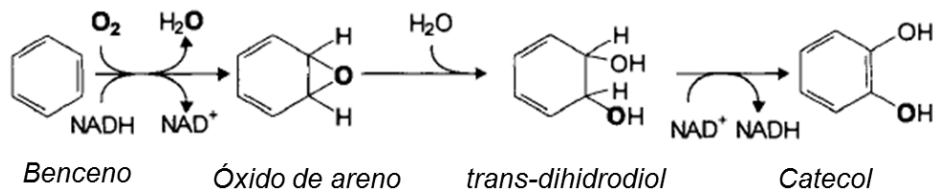
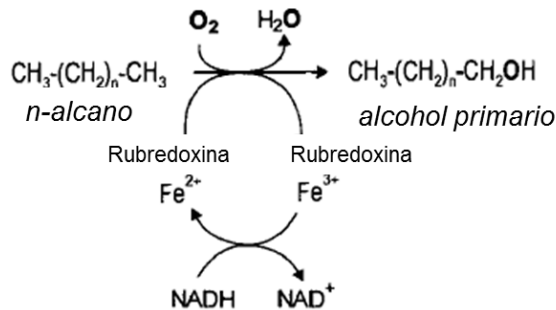
A continuación, revisaremos las estrategias que emplean las bacterias para degradar diferentes tipos de contaminantes.

Degradación de compuestos alifáticos.

La degradación aeróbica de hidrocarburos alifáticos y ciclo-alifáticos requiere de oxígeno molecular. En la Figura 4, se pueden observar los tipos de reacciones enzimáticas implicadas en este proceso.



Reacciones monooxigenasa



Reacciones dioxigenasa

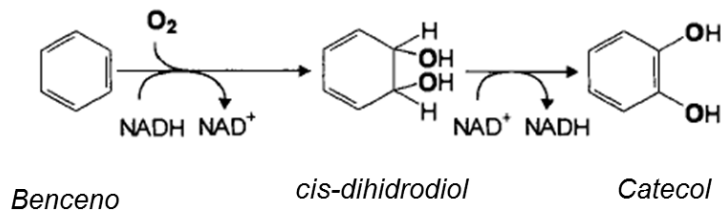


Figura 4. Ataque inicial sobre xenobióticos por oxigenasas. Monooxigenasas incorporan un átomo de oxígeno del O_2 dentro del sustrato, el segundo átomo es reducido a H_2O .

Dioxigenasas incorporan ambos átomos del O_2 en el sustrato.

Tomado de: http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

Dependiendo de la naturaleza del sustrato y de la maquinaria enzimática de los microorganismos implicados, es el tipo de reacción enzimática que se realiza.

Los *n*-alcanos son los principales constituyentes de derrames de aceites minerales (Hinchee y col., 1994). Los *n*-alcanos de cadena larga (C_{10} - C_{24}) son degradados más rápidamente mediante los mecanismos presentados en la Figura 5. Los alcanos de cadena corta (menos de C_9) son tóxicos para



muchos microorganismos, sin embargo, se evaporan rápidamente de los sitios contaminados con petróleo.

La **oxidación de alcanos** se clasifica como **terminal** (si ocurre en un solo lado de la cadena hidrocarbonada) o **diterminal** (si ocurre en ambos lados de la cadena hidrocarbonada). La oxidación monoterminal es la vía principal de degradación de alcanos. Esta se lleva a cabo a través de la formación del alcohol, aldehído, y el ácido graso correspondientes. La β -oxidación de los ácidos grasos resulta en la formación de acetil-CoA.

Los *n*-alcanos con un número impar de átomos de carbono se degradan hasta la propionil-CoA, que es a su vez carboxilado a metilmalonil-CoA y posteriormente se convierte en succinil-CoA. Los ácidos grasos de una longitud de cadena fisiológica se pueden incorporar directamente en los lípidos de membrana de las bacterias, pero la mayoría de los productos de degradación entran al ciclo del ácido tricarboxílico.

En alcanos inferiores (C_3 - C_6) y alcanos de cadena más larga se lleva a cabo una **oxidación subterminal**, en la que ocurre la formación de un alcohol secundario y su cetona correspondiente.

Los 1-alquenos se oxidan en el extremo saturado de la cadena. Existe una vía poco común de degradación, mediante la formación del epóxido que posteriormente se convierte en un ácido graso.

En general, el grado de ramificación disminuye la velocidad de biodegradación de los alcanos. Los grupos laterales metilo no disminuyen drásticamente la biodegradabilidad, mientras que las cadenas de ramificación complejas, por ejemplo, el grupo butilo terciario, impide la acción de las enzimas degradadoras.

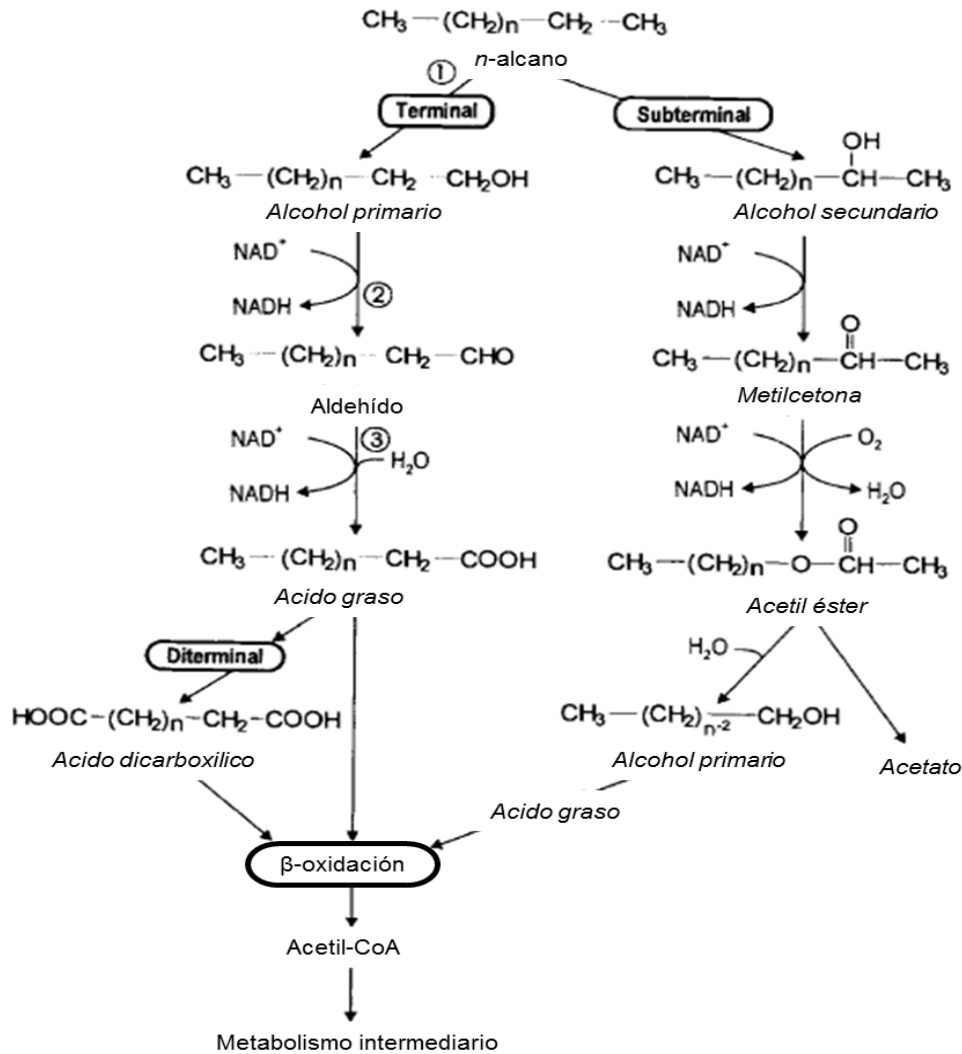


Figura 5. *Rutas periféricas de degradación de alcanos. La ruta principal es la oxidación de ácidos grasos catalizadas por (1) n-alcano monooxigenasa, (2) alcohol deshidrogenasa y (3) aldehído deshidrogenasa.*

Tomado de: http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

Los alcanos cíclicos que representan componentes menores del aceite mineral son relativamente resistentes al ataque microbiano. La ausencia de



un grupo metilo terminal expuesto complica el ataque primario. Unas pocas especies son capaces de utilizar ciclohexano como única fuente de carbono: más frecuente es su cometabolismo por cultivos mixtos.

El mecanismo de la degradación de ciclohexano se muestra en la Fig. 6. En general, las cadenas laterales de alquilo de cicloalcanos facilitan su degradación.

Los hidrocarburos alifáticos se hacen menos solubles en agua conforme se incrementa la longitud de su cadena. Los hidrocarburos con una longitud de cadena de C_{12} , y por encima son prácticamente insolubles en agua. Existen dos mecanismos implicados en la absorción de estos sustratos lipofílicos: la unión de las células microbianas en las gotas de aceite y la producción de biosurfactantes (Hommel, 1990). Hasta ahora se desconoce cómo es que los microorganismos absorben los alcanos; mientras que el efecto de los biosurfactantes se ha estudiado bien (Fig. 7).

Biosurfactantes

Son moléculas anfifílicas que tienen propiedades tensoactivas, emulsificantes y dispersantes. Estos compuestos están clasificados por su alto y bajo peso molecular (glucolípidos de ramnosa y trehalosa).

Los microorganismos sintetizan biosurfactantes cuando la fuente de carbono es parcialmente soluble o insoluble en agua.

(Supaphol y col., 2011).

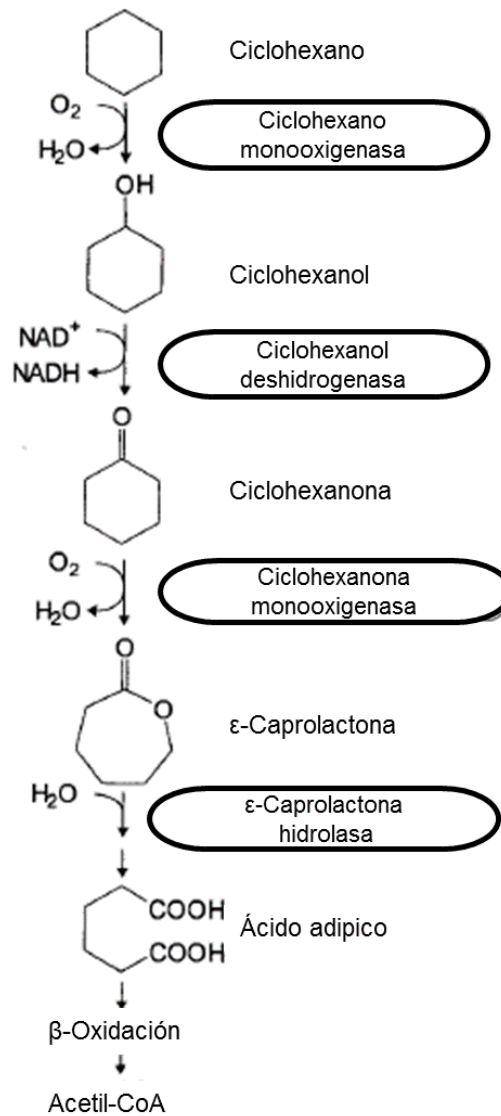


Figura 6. Ruta periférica del metabolismo de compuestos cicloalifáticos.

Tomado de:
http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

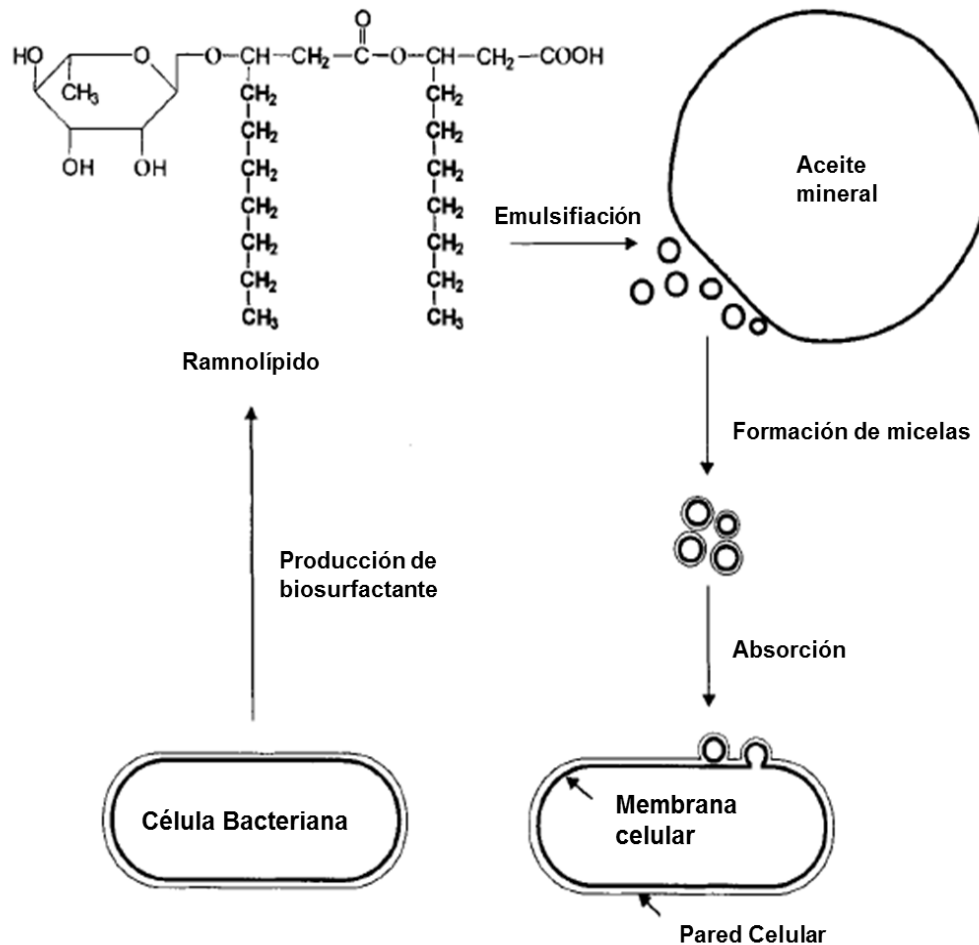


Figura 7. Participación de los biosurfactantes en la absorción de los hidrocarburos. La figura demuestra el efecto emulsificante de un ramnolípido producido por *Pseudomonas ssp.* en la interfase aceite-agua y la formación de micelas.

Tomado de:

http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

Los productos de degradación de hidrocarburos, son introducidos en el ciclo del ácido tricarboxílico, estos tienen una doble función. Son sustratos del metabolismo de energético y son los bloques de construcción para la biosíntesis de la biomasa y el crecimiento celular (Figura 3). La síntesis de aminoácidos y proteínas necesita una fuente de nitrógeno y azufre, la de



nucleótidos y ácidos nucleicos de una fuente de fósforo. La biosíntesis de la pared celular bacteriana requiere azúcares activados sintetizados en la gluconeogénesis.

Los productos de degradación asociada al crecimiento son CO_2 , H_2O , y la biomasa celular. Los microorganismos actúan como un complejo biocatalizador de degradación. Además, la biomasa celular puede ser mineralizada después del agotamiento de los contaminantes degradables en un sitio contaminado.

Degradación de compuestos aromáticos.

Los hidrocarburos aromáticos, como el benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), naftaleno se derivan de los productos petroquímicos, que son ampliamente utilizados como combustibles y disolventes industriales. Los fenoles y clorofenoles son liberados en el medio ambiente como productos y materiales de desecho de la industria.

Los compuestos aromáticos se forman en todos los organismos, por ejemplo, como aminoácidos aromáticos, fenoles, o quinonas. Por lo tanto, no es sorprendente que muchos microorganismos han evolucionado las vías catabólicas para degradar compuestos aromáticos. En general, los productos químicos orgánicos artificiales (xenobióticos) pueden ser degradados por microorganismos, cuando las moléculas respectivas son similares a los compuestos naturales.

La diversidad de compuestos aromáticos artificiales que se muestran en la Figura 8 pueden ser transformados enzimáticamente a intermediarios naturales de la degradación de compuestos aromáticos: catecol y protocatecuato.

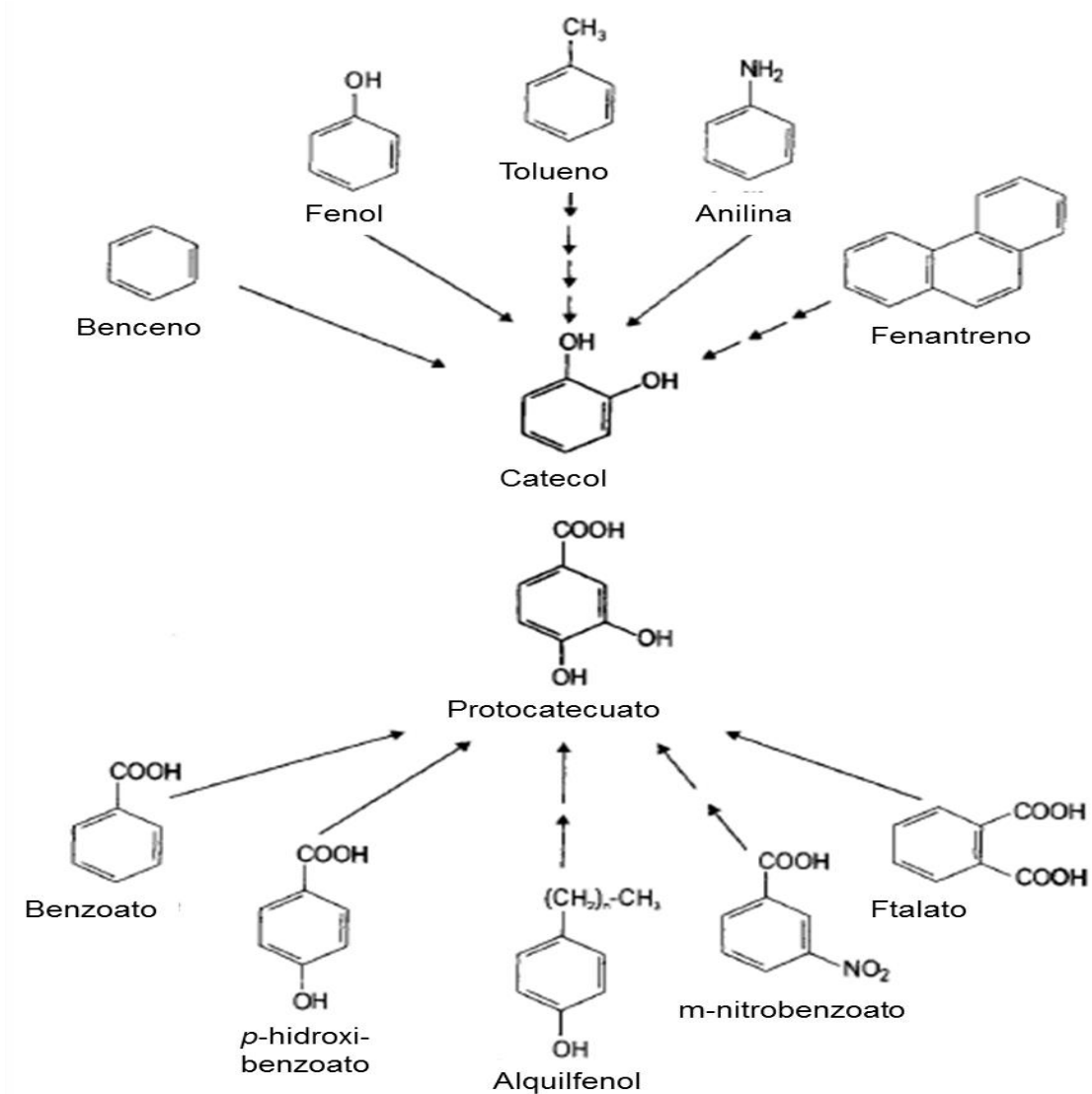


Figura 8. Degradación de un amplio espectro de compuestos aromáticos en dos intermediarios: Catecol y Protocatecuato

Tomado de:
http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

En general, el benceno y los compuestos relacionados se caracterizan por una estabilidad termodinámica más alta que los compuestos alifáticos.



Hasta ahora existen pocos informes sobre la degradación bacteriana del benceno (Smith, 1990). La primera etapa de la oxidación de benceno es una hidroxilación catalizada por una dioxigenasa (Figura 4). El producto, un diol, se convierte entonces en catecol por una deshidrogenasa. Estas reacciones iniciales, hidroxilación y deshidrogenación, también son comunes a las vías de degradación de otros hidrocarburos aromáticos. La introducción de un grupo sustituyente en el anillo de benceno hace posibles mecanismos alternativos para atacar las cadenas laterales o para oxidar el anillo aromático.

La versatilidad y adaptabilidad de las bacterias para degradar una diversidad de compuestos se basa en la existencia de plásmidos catabólicos. Los plásmidos catabólicos que se han encontrado codifican para las enzimas de degradación de compuestos aromáticos presentes en la naturaleza tales como el alcanfor, naftaleno, y salicilato. La mayoría de los plásmidos catabólicos son auto-transmisibles y tienen un amplio rango de hospederos. La mayoría de las bacterias Gram negativas aisladas de sitios contaminados poseen plásmidos de degradación, principalmente los denominados plásmidos TOL. Estos microorganismos son capaces de crecer en tolueno, *m*- y *p*-xileno, y *m*-etiltolueno.

La reacción principal implicada en la oxidación de tolueno y arenos es la hidroxilación del grupo metilo. El grupo metilo de tolueno se oxida en el alcohol, aldehído, y grupo carboxílico correspondiente. El benzoato formado o sus alquil-derivados se oxidan por la toluato dioxigenasa y catecol descarboxila a catecol (Smith, 1990).

El metabolismo de un amplio espectro de compuestos aromáticos por una especie requiere el aislamiento de intermediarios metabólicos en distintas vías. Este tipo de compartimentación metabólica parece ser realizado por la regulación metabólica. Las enzimas clave de la degradación de sustratos aromáticos son inducidas y se sintetizan en cantidades apreciables sólo cuando el sustrato o compuestos estructuralmente relacionados están presentes. La inducción de la enzima depende de la concentración de las moléculas que inducen. Las concentraciones específicas de sustrato representan el umbral de utilización y el crecimiento y están en la magnitud de μM .



En general, una gran cantidad de sustratos aromáticos son degradados por un número limitado de reacciones: hidroxilación, escisión oxigenolítica del anillo aromático, isomerización, e hidrólisis. La naturaleza inducible de las enzimas y su especificidad de sustrato permiten a las bacterias adaptar su metabolismo a la utilización eficaz de mezclas de sustratos en los suelos contaminados y crecer a un ritmo elevado, ejemplos de estas bacterias son: *Pseudomonas* y *Rhodococcus*.

Hasta ahora hemos revisado los mecanismos de degradación de algunos contaminantes comunes en los suelos por bacterias aerobias. A continuación, revisaremos los mecanismos de degradación de contaminantes por bacterias anaerobias.

2.1.3 Metabolismo anaerobio

Nuestra atmósfera contiene alrededor del 21% de oxígeno, y esta gran cantidad de un agente oxidante biodisponible permite que la mayoría de los compuestos orgánicos producidos en la naturaleza o a través de fabricación humana sean degradados aeróbicamente, con oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones. El aceptor de electrones preferido para los procesos de degradación microbiana en la naturaleza es el oxígeno, siempre y cuando esté disponible.

Por otro lado, los procesos de degradación anaeróbica generalmente son considerados como inferiores, en cuanto a cinéticas y capacidades, en comparación con la degradación aeróbica. Sin embargo, existen ciertos ambientes anóxicos, como el rumen de la vaca en el que la celulosa se degrada mucho más rápido que en presencia de oxígeno.

También en el tratamiento de residuos, especialmente con altas cargas de materia orgánica (aguas residuales de la industria azucarera, mataderos, industria alimentaria, industria del papel, etc.), los procesos anaeróbicos han demostrado ser eficaces y mucho menos costosos que el tratamiento aeróbico; ya que requieren pequeñas cantidades de energía y producen una mezcla de metano y CO_2 ("biogás"), que puede ser empleado en la generación de energía. Esto es cierto para la mayoría de los materiales de desecho que son fácilmente accesibles a la degradación sin la participación de oxígeno, tales como polisacáridos, proteínas, grasas, ácidos nucleicos, etc. Estos polímeros son hidrolizados a través de enzimas extracelulares específicas, y los oligo- y monómeros se pueden degradar en el interior



celular a través de reacciones enzimáticas similares a los conocidos a partir del metabolismo aeróbico. Las actividades de estas enzimas en cultivos anaeróbicos están en el mismo rango (0.1 a 1 μmol de sustrato por min y mg de proteína celular) que las de bacterias aeróbicas, y por lo tanto las tasas de transformación por unidad de biomasa deben ser equivalentes.

Sin embargo, las bacterias anaerobias obtienen por lo general mucho menos energía del sustrato que sus contrapartes aeróbicas. Considerando que la oxidación aeróbica de hexosa a 6 CO_2 , produce 2,870 kJ por mol, la degradación anaeróbica de hexosa produce 3 CH_4 , y 3 CO_2 , solamente produce 390 kJ por mol; aproximadamente el 15% del proceso aeróbico, y esta pequeña cantidad de energía tiene que ser compartido por al menos tres grupos metabólicos bacterias (Schink, 1997).

En resumen, la degradación anaeróbica produce menos biomasa por molécula de sustrato y a menudo el crecimiento es también más lento que el de los microorganismos aerobios. Este problema de baja producción de biomasa y crecimiento lento se ha superado gracias al desarrollo de reactores biológicos, por ejemplo, los reactores metanogénicos para el tratamiento de aguas residuales.

En la naturaleza, así como en los reactores biológicos, la degradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno puede estar acoplado a la reducción de receptores de electrones alternativos. Estos procesos alternativos siguen una cierta secuencia que parece estar determinada aproximadamente por el potencial redox de los respectivos sistemas aceptores.

Los límites de la degradación anaerobia se hacen evidentes si observamos a los compuestos orgánicos que se acumulan en sedimentos anóxicos, o que persisten en los compartimentos anóxicos del suelo que han sido contaminados con derrames de petróleo u otros compuestos más recalcitrantes. El petróleo se compone principalmente de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, que en presencia de oxígeno molecular son atacadas bioquímicamente a través de las enzimas oxigenasas que introducen oxígeno molecular en la molécula respectiva. Las reacciones oxigenasa no se pueden emplear en la ausencia de oxígeno, y especialmente los compuestos que requieren oxigenasas para la descomposición aeróbica pueden resistir la degradación en condiciones anóxicas. A continuación, revisaremos que, en la mayoría de los casos existen alternativas que permiten la degradación de dichos compuestos bajo condiciones anóxicas.



Debemos mencionar que el oxígeno no siempre es bueno en los procesos de degradación pues las oxigenasas al introducir grupos hidroxilo en compuestos aromáticos, y en presencia de oxígeno pueden ocasionar la formación de radicales libres derivados del fenol que inician la polimerización descontrolada y condensación de derivados poliméricos, similar a los compuestos húmicos en el suelo, que son muy difíciles de degradar, ya sea anaeróbicamente o aeróbicamente. Los procesos de degradación anaeróbicos se pueden aplicar en el tratamiento de aguas residuales ricas en compuestos fenólicos, por ejemplo, los de la industria química, con el fin de evitar la formación de productos secundarios no deseados, como los polifenoles condensados. En otros casos, el tratamiento aeróbico puede causar problemas técnicos, por ejemplo, mediante la formación de espuma durante la degradación aeróbica de compuestos tensioactivos, etc. Por lo tanto, el conocimiento de los límites y principios de los procesos de degradación anaerobia en las diferentes condiciones que prevalecen en los hábitats naturales podría ayudar a diseñar técnicas alternativas adecuadas para la limpieza de suelos contaminados o para el tratamiento de las aguas residuales específicos que hasta el momento se han aplicado en grado insuficiente.

A continuación, revisaremos los principios de la degradación anaerobia de compuestos orgánicos; nos centraremos en aquellos compuestos que durante mucho tiempo fueron considerados estables en ausencia de oxígeno.

Degradación de hidrocarburos

Se sabe que los **hidrocarburos alifáticos saturados** pueden ser degradados lentamente bajo condiciones anaeróbicas, esto se demostró hace algunos años cuando se hicieron crecer bacterias reductoras de sulfato en presencia de hexadecano, el crecimiento de este cultivo fue muy lento, con tiempos de más de una semana de duplicación en condiciones óptimas. Posteriormente, se aislaron varias cepas de anaerobios alcano-oxidantes (Aeckersber y col., 1998; Rueter y col., 1994), que están especializados ya sea en alcanos de cadena larga (C_{12} - C_{20}) o en alcanos de cadena media (C_6 - C_{16}) empleando sulfato o nitrato como aceptor de electrones.

Hasta ahora no se ha observado que la degradación de alcanos de cadena corta ($<C_6$) bajo condiciones anaerobias sea llevada a cabo.

La bioquímica de la degradación de los alcanos en ausencia de oxígeno sigue siendo enigmática por lo que requiere más investigación. El estudio



de la composición de ácidos grasos de los lípidos de ciertas bacterias reductoras de sulfato después de ser cultivadas con alcanos de cadena par o impar sugiere que una unidad de carbono se añade a la molécula del sustrato en el ataque inicial, tal vez debido a una reacción de carbonilación; sin embargo, otras bacterias reductoras de sulfato o nitrato no presentan ningún indicio de estos alargamientos de cadena (Aeckersber y col., 1998). Por lo tanto, la activación de los alcanos en ausencia de oxígeno se puede llevar de más de una manera. En cualquier caso, la degradación de hidrocarburos anaeróbica es muy lenta y difícilmente puede ser aplicada en un suelo contaminado con hidrocarburos.

Los hidrocarburos insaturados de cadena larga con dobles enlaces terminales pueden ser hidratados, a su alcohol primario correspondiente y completamente degradado a través de la β -oxidación (Schink, 1988). La degradación del escualeno se ha reportado en cultivos de bacterias metanogénicas (Schink, 1988), aunque la degradación fue incompleta, debido a la formación de derivados saturados ramificados. Otros derivados insaturados del isopreno, como terpenos son degradados completamente por bacterias que emplean al nitrato como aceptor de electrones (Zehnder y Brock, 1980; Harder, 1997).

Degradación de éteres.

Los enlaces éter son bastante estables, y la escisión química requiere de condiciones extremas, por ejemplo, hervir a pH alcalino o ácido. La ruptura biológica del enlace éter en presencia de oxígeno se lleva a cabo por una enzima oxigenasa que emplea al oxígeno como aceptor de electrones transformando al éter en un compuesto hemiacetal inestable (Bernhardt et al., 1970). Los grupos metilo de los monómeros de lignina son liberados como formaldehído y no como metanol.

La desmetilación anaeróbica de los monómeros de lignina por la bacteria homoacetogénica *Acetobacterium woodii* fue descrita por primera vez por Bache y Pfenning (1981) y posteriormente se observó en otras bacterias homoacetogénicas. El mecanismo de esta ruptura del éter fenil-metil se ha dilucidado recientemente; en *Holophaga foetida* donde se demostró que el grupo metilo se transfiere primero como un catión de metilo a transportador Cob(I)alamin (vitamina B12) totalmente reducido que posteriormente metila a la coenzima tetrahidrofolato (Figura 9).

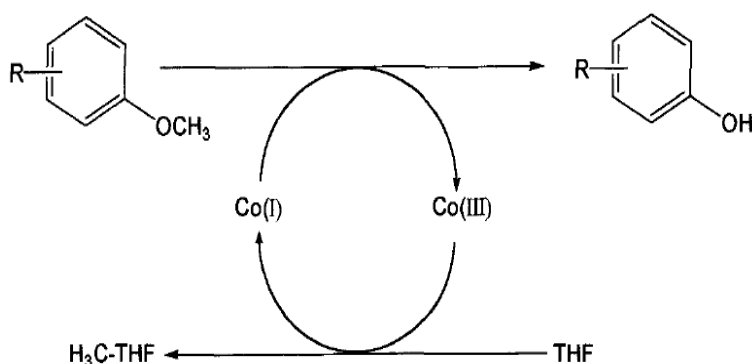


Figura 9. Degradación anaerobia de fenil-metil.éteres. *Co(I)*, *Co(II)*, cobalamina con diferentes estados de oxidación; THF, tetrahidrofolato.

Tomado de:
http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

Degradación de compuestos N-alquilo.

Entre los compuestos N-alquilo naturales, además de los aminoácidos se encuentran varias aminas metiladas tales como la trimetilamina. En condiciones estrictamente anóxicas, se ha observado que las Archeas metanogénicas desmetilan de manera eficiente la trimetilamina a dimetilamina y monometilamina, los metilos generados se dismutan a metano y CO₂.

Los compuestos N-alquilo de interés medioambiental son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido nitrilotriacético (NTA); este último ha sustituido en gran medida polifosfatos como quelante de calcio en la mayoría de los detergentes comerciales. El problema principal en la degradación de EDTA es la formación de fuertes complejos de EDTA con iones metálicos que hacen que este sustrato sea muy difícil de degradar. No obstante, la degradación microbiana EDTA en presencia de oxígeno ha sido documentada (Nortemann, 1992), pero no existen informes sobre una posible degradación anaerobia de EDTA.

El NTA se degrada aeróbicamente a través de una hidroxilación de un carbono de metileno dependiente de oxigenasa. El compuesto hidroxil resultante es inestable y libera el ácido glioxílico. La eliminación de un residuo de carboximetileno produce glicina como coproducto. La degradación anaerobia de NTA es posible con nitrato como aceptor de electrones. La primera etapa de degradación es una deshidrogenación a un derivado de iminio insaturado que, tras la hidratación, podría liberar ácido glioxílico o para formar el derivado iminodiacetato (Egli y col., 1990).



Degradación de compuestos aromáticos.

Los compuestos aromáticos también pueden ser degradados anaeróbicamente, una amplia variedad de compuestos aromáticos mononucleares, tales como benzoato, fenoles, y varios monómeros de lignina, se convierten estequiométricamente a metano y CO₂. Durante la década de 1970, Evans (1977) desarrolló el concepto de que la desestabilización del núcleo aromático en ausencia de oxígeno puede proceder a través de un reductor en lugar de una reacción oxidativa. Hoy se conocen al menos tres vías diferentes para la degradación anaerobia de compuestos aromáticos; vía de benzoil-CoA, la vía de resorcinol, y la vía de floroglucinol.

En todos estos casos, una estructura de 1,3-dioxo se forma a través de una etapa de reducción, ya sea en el interior del anillo o en combinación con una carboxil coenzima A. Esta estructura permite un ataque nucleófilo sobre el carbono cetónico del anillo, y su posterior fusión al anillo. Dependiendo del sustrato aromático se forma un ácido pimérico (C₇ dicarboxílico) o un ácido caproico parcialmente oxidado (C₆, monocarboxílico) se une a la Coenzima A y posteriormente se somete a la β-oxidación.

La vía del benzoil-CoA parece ser la más importante en la degradación anaerobia de compuestos aromáticos pues una amplia variedad de compuestos aromáticos son capaces de entrar en esta ruta; por ejemplo; fenol, diversos hidroxibenzoatos, fenilacetato, anilina, ciertos cresoles, e incluso el tolueno (Figura 10) Una vez que se forma el benzoil-CoA, la estabilidad de la estructura de anillo aromático es superada por una etapa reductora, que introduce dos electrones individuales y protones, probablemente a través de un intermediario de radicales, para formar carboxil-CoA ciclohexadieno como el primer producto identificable.

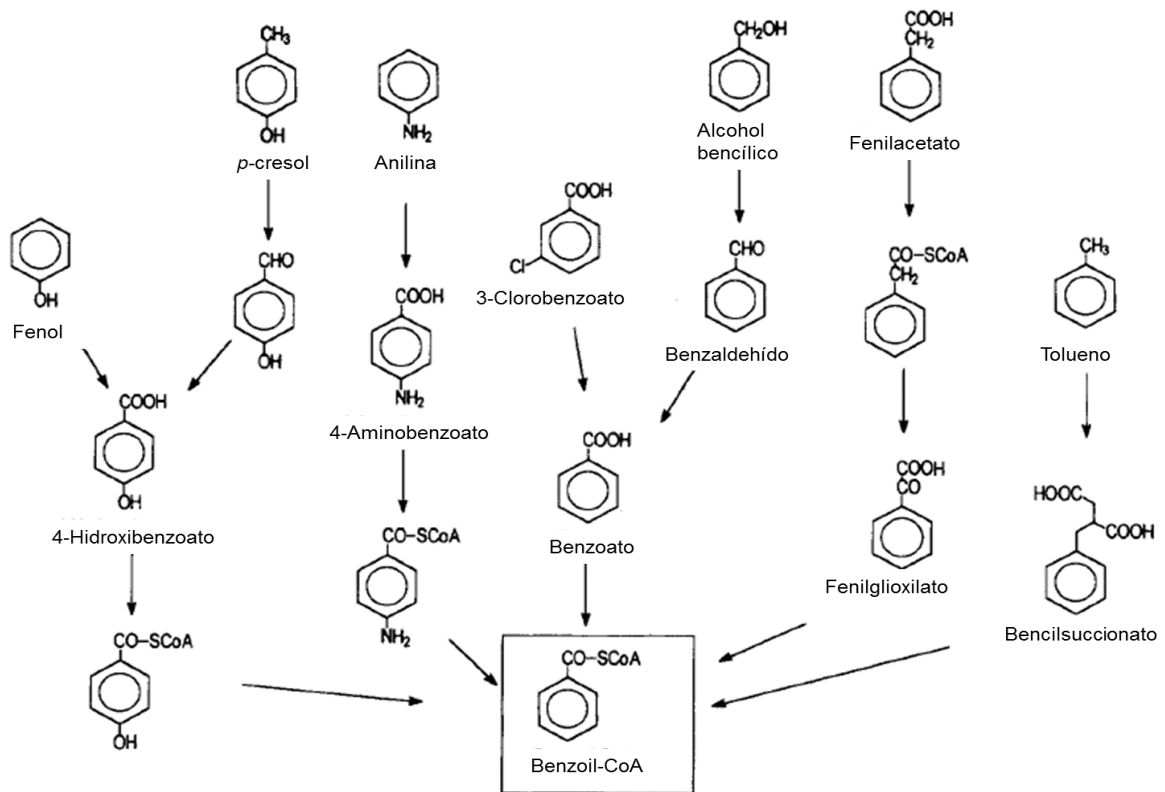


Figura 10. *Compuestos aromáticos que entran en la vía de degradación anaeróbica del Benzoil-CoA.*

Tomado de:

http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

Degradación de compuestos orgánicos halogenados.

Los compuestos orgánicos halogenados están muy extendidos en la naturaleza y principalmente son metabolitos secundarios de plantas, algas marinas, hongos y algunas bacterias. Por lo que no resulta sorprendente que una amplia variedad de bacterias y hongos pueda degradar estos compuestos.



La deshalogenación se produce básicamente a través de reacciones de oxidación, hidrólisis o reducción. En las bacterias anaerobias, el tipo más común de reacción de deshalogenación es la eliminación reductora de sustituyentes de halógeno y se observó por primera vez en cultivos enriquecidos con 3,5-dihidroxibenzoato (Suflita y col., 1982).

En la actualidad casi todos los compuestos orgánicos clorados pueden ser deshalogenados y degradados en cultivos microbianos estrictamente anaerobios. Como regla general, la decloración reductiva es el proceso preferido en cuanto mayor sea el grado de halogenación. Pues los compuestos altamente halogenados son mucho más susceptibles a un ataque nucleófilico sobre el átomo de carbono respectivo que a una reacción oxidativa.

La reacción global de la deshalogenación para un compuesto clorado se presenta en la Figura 11: Los electrones derivados del hidrógeno molecular, formiato, o compuestos orgánicos más complejos se transfieren al sustrato halogenado para liberar el residuo orgánico en una forma reducida, junto con cloruro. Se ha observado en varios casos que este proceso redox puede producir energía a través de un mecanismo respiratorio, lo que implica que se establece una translocación neta de protones a través de la membrana citoplasmática, y por lo tanto el gradiente de protones establecido forma ATP a través de la ATP sintasa.

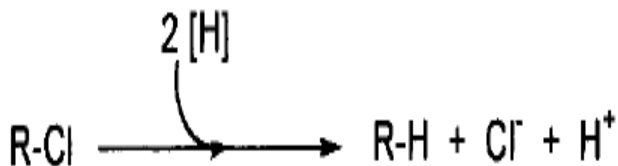


Figura 11. Deshalogenación reductiva de compuestos clorados.

Tomado de:
http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

Para concluir, la degradación anaeróbica puede ser aplicada en el tratamiento de desechos, produciendo CO_2 y CH_4 que puede ser empleado como fuente de energía.

Hasta ahora hemos revisado los mecanismos de degradación de algunos contaminantes comunes en los suelos por bacterias anaerobias. A



continuación, revisaremos los mecanismos de degradación de contaminantes por hongos.

2.2 Hongos y levaduras

Los miembros del reino de los hongos se encuentran en la vida como descomponedores, saprófitos, simbioses y parásitos. Existe un gran número de hongos, se ha estimado que puede haber hasta 1,500,000 de especies. Esta magnitud es sólo comparable con la enorme biodiversidad de insectos. Existen hongos en una amplia gama de hábitats: en el agua dulce y el mar, en el suelo, en la basura, en residuos en descomposición de plantas y los animales, y en los organismos vivos. Se estima que los hongos representan más del 60% de la biomasa microbiana que viven en hábitats determinados.

Los hongos han contribuido al bienestar del ser humano desde el comienzo de la civilización; su contribución va desde el uso natural hasta el uso industrial. Pueden existir y sobrevivir en casi todos los hábitats. Los hongos son vitales en todos los ecosistemas y participan en la regulación del flujo de nutrientes y energía, por lo que los hongos se consideran los ingenieros naturales y verdaderos de los ecosistemas (Lawton y Jones, 1995).

Se estima que los hongos han sobrevivido alrededor de 5300 años (Haselwandter y Ebner, 1994). Los hongos son organismos eucarióticos microscópicos que crecen en diversos sustratos y son capaces de continuar su función casi indefinidamente. Estos organismos, incluyendo los mohos, las levaduras y los hongos filamentosos, son microorganismos únicos que pueden emplearse en la remediación de desechos y aguas residuales. Algunos mohos, levaduras y hongos son altamente tolerantes a condiciones muy ácidas o altamente alcalinas. Los hongos poseen una alta plasticidad y la mayoría de las células fúngicas son totipotentes, por lo que todo el organismo puede ser regenerado no sólo a partir de esporas sino también de fragmentos de hifas.

2.2.1 Importancia de los hongos y levaduras en la biorremediación



Los científicos empezaron a usar los hongos y las bacterias para la degradación de compuestos orgánicos xenobióticos desde mitad del siglo XX. El uso de bacterias mostró resultados rápidos y promisorios, dejando de lado la investigación sobre la capacidad degradadora de hongos. Esto no significa que los hongos no son organismos adecuados o que funcionan menos satisfactoriamente que las bacterias en la degradación de estos compuestos. La participación de los hongos en la biorremediación ahora está bien establecida en todos los ecosistemas.

Se sabe que los hongos degradan, o hacen que se deterioren, una amplia variedad de materiales y compuestos, procesos conocidos como micodegradación y micodeterioración. Las actividades de degradación de los hongos se han reconocido en diversas situaciones, por ejemplo; en la degradación de diversos tipos de madera, papel, textiles, plásticos, cuero y diversos materiales de envoltura. El polietileno, con un peso molecular de 4000 a 28.000, se degrada por el cultivo de *Penicillium simplicissimum* YK (Yamada-Onodera y col., 2001), y la biorremediación del polietileno puede ser posible. Las enzimas de *Mucor rouxii* NRRL 1835 y *Aspergillus flavus* han producido cambios en las propiedades mecánicas y el peso de las bolsas de polietileno desechables (El-Shafei y col., 1998). Los hongos de pudrición blanca también son eficientes en la degradación del polietileno (Iiyoshi y col., 1997).

La micorremediación es una de las áreas más complejas en la ingeniería aplicada a la biorremediación. Durante las pasadas décadas, muchos científicos e ingenieros han querido intentar usar los hongos en la biorremediación de compuestos orgánicos, y aquellos que los han utilizado han obtenido resultados exitosos.

2.2.2 Metabolismo y mecanismos degradación de contaminantes

Como se ha comentado previamente, los hongos poseen importantes capacidades para degradar compuestos recalcitrantes (por ejemplo, lignina, hemicelulosa), y para eliminar desechos peligrosos del ambiente. A continuación, revisaremos algunas estrategias que llevan a cabo los hongos para degradar diferentes tipos de contaminantes.

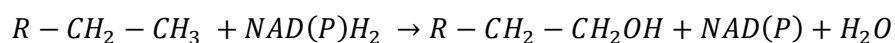


Degradación de hidrocarburos alifáticos.

La biodegradación de hidrocarburos alifáticos provenientes de productos del petróleo ha sido muy investigada, especialmente la degradación llevada a cabo por levaduras. Los hidrocarburos ampliamente utilizados como sustratos por los hongos son los *n*-alcanos de cadenas entre 10 y 20 átomos de carbono. Sin embargo, la degradación de *n*-alcanos con cadenas de más de 24 átomos de carbono también ha sido observada. Las levaduras más representativas en la degradación de alcanos son, *Candida lupolytica*, *C. tropicalis*, *Rhodoturula rubra* y *Aurebasidion (Trichosporon) pollutans*. Algunos ejemplos de hongos que emplean como sustrato a los *n*-alcanos son *Cunnighamella blakesleana*, *Aspergillus niger* y *Penicillium frequentans*.

Los hongos y levaduras tienen preferencia por oxidar cadenas largas de *n*-alcanos, debido a que los alcanos de cadena corta (C₅-C₉) son tóxicos para ellos. Los efectos tóxicos de los alcanos de cadena corta pueden ser revertidos con la adición de hidrocarburos de cadena larga. *Penicillium frequentans* es capaz de emplear alcanos monohalogenados (por ejemplo, 1-fluorotetradecano) y completamente deshalogenados. Debido a que todos los hidrocarburos alifáticos son casi insolubles en agua, los hongos deben producir biosurfactantes, los cuales dispersan los sustratos en emulsiones aceite-agua, incrementando con ello el área interfacial e incrementando la biodisponibilidad de los hidrocarburos.

Los hongos principalmente realizan una oxidación terminal de los alcanos, formando su correspondiente alcohol primario mediante un complejo enzimático de monooxigenasa, formado por citocromo P450 y citocromo-NAD(P)H P450 reductasa:



La oxidación subterminal de los alcanos, forma varios alcoholes secundarios, este tipo de oxidación de los alcanos ha sido observada en ciertos hongos (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*). Las enzimas perioxosomales llevan a cabo la degradación de los alcanos a intermediarios que son transferidos a la mitocondria. Después de la oxidación terminal, el alcohol producido es oxidado a su aldehído y ácido graso correspondiente por medio de deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina. Se ha



demostrado que en algunas especies de *Candida* y en varios hongos, las enzimas alcohol oxidasas están presentes, en lugar de las deshidrogenasas. Los alcoholes secundarios formados de la oxidación subterminal son oxidados a su éster correspondiente y posteriormente son escindidos hidrolíticamente en ácido acético y un alcohol, el cual es convertido en ácido graso. Los ácidos grasos producidos son siempre metabolizados mediante la β -oxidación y finalmente degradados a CO_2 a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Degradación de compuestos aromáticos

Numerosos hongos y levaduras emplean compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía (Tabla 2); pero también poseen la capacidad para degradar los compuestos aromáticos de manera cometabólica, es decir, transforman un sustrato que no es empleado como fuente de carbono en presencia de un segundo sustrato empleado como fuente de carbono (Figura 12).



Tabla 2. Especies de hongos y levaduras que emplean compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía.

Especie	Sustrato	Referencia
Levaduras		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fenol, <i>o</i> -cresol, <i>p</i> -cresol, ácido benzoico	Takahashi y col., 1981
<i>Candida maltosa</i>	Fenol, catecol, ácido benzoico	Polnisch y col., 1992
<i>Exophiala jeanselmei</i>	Fenol, estireno, ácido benzoico, acetofenona	COX et al. (1993)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Fenol, <i>m</i> -cresol, ácido benzoico	Walker 1972; Katayama-Hirayama y col.1994
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Fenol, <i>p</i> -cresol, ácido benzoico, ácido salicílico	Neujahr y Varga 1970; Hasegawa y col., 1990
Hongos		
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido monoclorobenzoico	Shailubhai y col., 1982,1983
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fenol, <i>p</i> -cresol, 4-etilfenol, ácido fenilacético	Jones y col., 1993,1995
<i>Fusarium flocciferum</i>	Fenol, resorcinol	Anselmo y Novais, 1984
<i>Penicillium frequentans</i>	Fenol, <i>p</i> -cresol, resorcinol, floroglucinol, anisol, alcohol bencílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido gálico, ácido fenilacético, acetofenona	Hofrichter y col., 1994, 1995; Hofrichter y Fritsche, 1996
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Fenol, fluoroglucinol, monofluorofenoles	Patel y col., 1990; Marr y col., 1996

(Mohapatra, 2006)



Cometabolismo

Es la transformación de un sustrato que no puede ser utilizado como fuente de carbono en presencia de un segundo sustrato utilizable.

En la Figura 12, se presenta este principio con el ejemplo de transformación de 3,4-diclorofenol en presencia de fenol como fuente de carbono por el hongo *Penicillium frequentans*; en este caso el fenol se convierte completamente en biomasa, dióxido de carbono y agua, mientras que el fenol clorado solamente se transforma en el catecol correspondiente el cual no puede ser degradado siendo este un producto terminal.

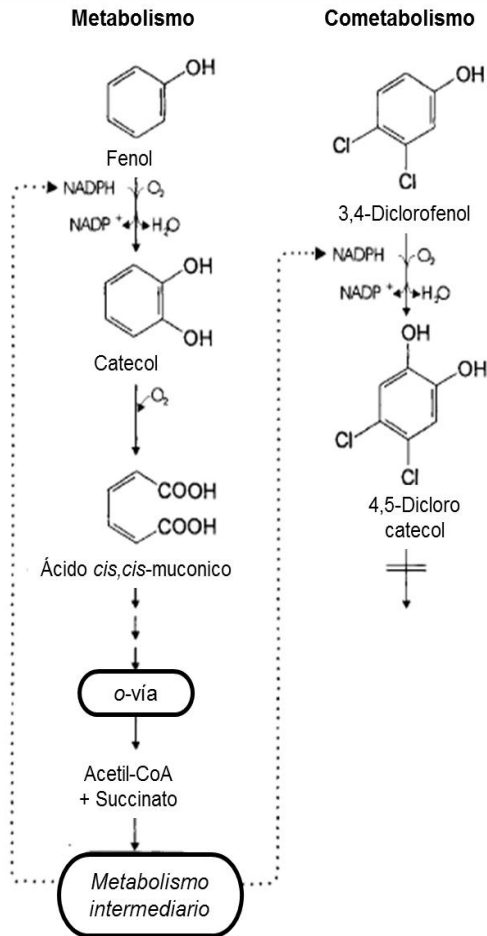


Figura 12. Transformación cometabolica de contaminantes orgánicos; hidroxilación de 3,4-diclorofenol por *Penicillium frequentans* cultivada sobre fenol.

Tomado de:
http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf

En la Tabla 2, se presenta una lista parcial de las especies de hongos que se ha demostrado son capaces de emplear compuestos aromáticos como fuente carbono. Estos hongos rompen el anillo aromático a través de la vía ortho (Figura 13); esta vía se activa al insertar hidroxilos en el anillo aromático, las enzimas que participan son la fenol hidroxilasa, benzoato-4-hidroxilasa, y 4-hidroxibenzoato-3-hidroxilasa. Estas enzimas son monooxigenasas dependientes de NADPH₂. Después de la activación, dioxigenasas rompen los anillos aromáticos para formar ácido *cis-cis* mucónico. Este último se lactoniza, isomeriza y se hidroliza formando β-cetoadipato que se degrada a CO₂, mediante el ciclo del ácido tricarbóxico.

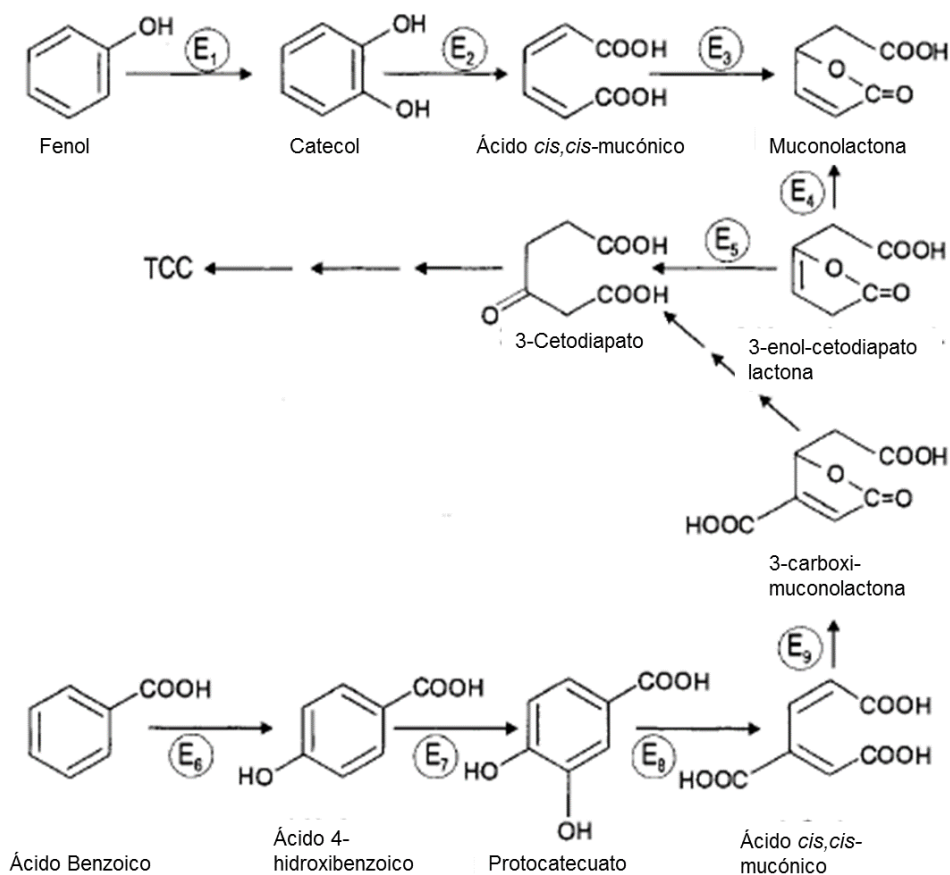


Figura 13. Vía *ortho* de ruptura del anillo para el fenol y el ácido benzoico en hongos.

E1: Fenol hidroxilasa; E2: Catecol-1,2-dioxigenasa; E3: Muconato cicloisomerasa; E4: Muconolactona isomerasa; E5: 3-enolcetodiapato-lactona hidroxilasa; E6: 4-benzoato hidroxilasa; E7: 4-hidroxibenzoato-3-hidroxilasa; E8: 3,4-protocatecuato dioxigenasa; E9: enzima lactonizante carboximuconato.

Las enzimas de hongos y levaduras son relativamente inespecíficas pues también pueden convertir derivados sustituidos de compuesto aromáticos, incluyendo los halo- y nitroaromáticos. Por lo que, dependiendo del sustituyente, los fluoro y clorofenoles son convertidos en sus catecoles, escindiéndose al ácido mucónico halogenado correspondiente o sufren deshalogenación.

Además de los compuestos aromáticos halogenados, los hongos transforman cometabólicamente numerosos contaminantes orgánicos aromáticos, por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP),



bifenilos, dibenzofuranos, compuestos nitroaromáticos, diversos pesticidas, y plastificantes. Las transformaciones fúngicas típicas son las glicosilaciones, hidroxilaciones, metoxilaciones o la reducción de grupos nitro a grupos amino (Tabla 3). Las reacciones de hidroxilación son particularmente importantes para la eliminación de contaminantes orgánicos en suelos, ya que aumentan la reactividad de las moléculas y hacen posible su acoplamiento al humus.



Tabla 3. Contaminantes orgánicos y metabolitos formados cometabolicamente por hongos y levaduras.

Contaminante orgánico	Metabolitos	Referencias
Mono- y diclorofenoles	Clorocatecoles ^{a-c} , cloroguaiacoles ^c , ácidos mucónicos clorados ^c	Walker, 1972; Hofrichter y col., 1994
Pentaclorofenol	Pentacloroanisolf	Cserjesi, 1967
Fluorofenoles	Fluorocatecoles ^c , ácidos mucónicos fluorados ^c	Wunderwald y col., 1998
2,4-dinitrofenol	Monoaminonitrofenoles ^c	Madhosingh, 1991
2,4,6-trinitrotolueno	Aminodinitrotoluenos ^{c-e} , hidroxilamino-dinitrotoluenos ^{c-e}	Scheibner y col., 1997
Pireno	1-pireno ^{c-e} , 1-metoxipireno ^d , dihidroxipirenos ^c	Sack y col., 1997
Benzo(a)pireno	Hidroxibenzo(a)pirenos	Dutta y col., 1983
Dibenzofurano	2,3-dihidroxibenzofurano ^b	Hammer y col., 1998
Bifenilo	4,4'-dihidroxibifenilo ^d	Gibson y Subramanian, 1984

^a *Rhodotorula spp.*, ^b *Trichosporon spp.*, ^c *Penicillium spp.*, ^d *Aspergillus spp.*, ^e *Fusarium spp.*, ^f *Trichoderma spp.*

(Fritsche y Hofrichter, 2000)

En resumen, la capacidad de degradación de hongos y levaduras juega un papel importante en todos los ecosistemas y participan en la regulación del flujo de nutrientes y energía; así como el potencial de auto-limpieza de los suelos, pues tienen la capacidad de degradar compuestos recalcitrantes por lo que su aplicación en tecnologías de biorremediación es prometedora.



2.3 Plantas

Las plantas se han empleado para limpiar ambientes contaminados, esta tecnología es conocida como Fitorremediación. Aún se encuentra en desarrollo, pero constituye una estrategia interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos, etc. Las ventajas que ofrece la fitorremediación son el bajo costo y la rapidez con que pueden llevarse a cabo ciertos procesos degradativos.

2.3.1 Las plantas y su aplicación en la biorremediación

Las plantas exhiben diferentes mecanismos de captación de contaminantes orgánicos e inorgánicos que se emplean en los procesos de fitorremediación (Pilon-Smits, 2005) (Figura 14).

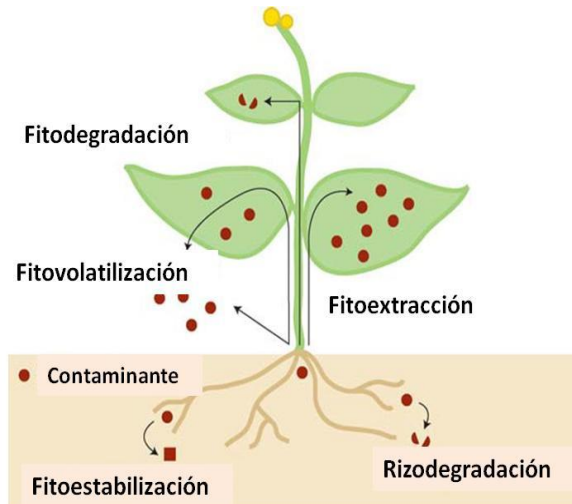


Figura 14. Posibles destinos de los contaminantes durante la fitorremediación, pueden ser estabilizados o degradados en la rizosfera, secuestrados o degradados dentro de la planta o volatilizados.

Tomado de: Pilon-Smits, 2005

Los mecanismos y la eficiencia de la fitorremediación dependen del tipo de contaminante, la biodisponibilidad y las propiedades del suelo (Cunningham y Ow, 1996). Existen diversas formas por las cuales las plantas limpian o reparan sitios contaminados. La absorción de contaminantes en las plantas se produce principalmente a través del sistema radicular, en el que se encuentran los principales mecanismos para prevenir la toxicidad. El sistema radicular proporciona una enorme superficie que absorbe y



acumula agua y nutrientes esenciales para el crecimiento junto con otros contaminantes no esenciales (Raskin y Ensley, 2000).

Los mecanismos de fitorremediación incluyen la extracción de contaminantes del suelo o del agua; concentración de contaminantes en el tejido vegetal; degradación de contaminantes por diversos procesos bióticos o abióticos; volatilización o transpiración de contaminantes volátiles de las plantas hacia el aire; inmovilización de contaminantes en la zona de raíces; control hidráulico de aguas subterráneas contaminadas; y control de la erosión e infiltración por cubiertas vegetativas. A continuación, se presenta una breve explicación de estos mecanismos, en la unidad 3 se revisará la Fitorremediación con mayor detalle.

Fitoextracción

La fitoextracción (también conocida como fitoacumulación, fitoabsorción o fitosecuestración) se refiere a la acumulación y translocación, a través de las raíces, de contaminantes presentes en el suelo hacia diferentes partes cosechables de la planta, dando como resultado la limpieza permanente del sitio. Esta es la tecnología más estudiada entre todas las de este tipo (Tangahu et al., 2011).

Fitofiltración

La fitofiltración se refiere a la remoción de los contaminantes del agua o aguas residuales por plantas (Mukhopadhyay y Maiti, 2010). La fitofiltración se puede dividir en rizofiltración (uso de raíces) o blastofiltración (uso de plántulas) o caulofiltración. En la fitofiltración los contaminantes son absorbidos o adsorbidos y por lo tanto su disponibilidad hacia aguas subterráneas es minimizada.

Fitoestabilización

La fitoestabilización o fitoinmovilización es el uso de ciertas plantas para la estabilización de contaminantes en suelos contaminados (Singh, 2012). Esta técnica es empleada para disminuir la movilidad y biodisponibilidad de contaminantes en el ambiente, evitando así su migración a aguas subterráneas o su entrada en la cadena alimenticia (Erakhrumen, 2007). Las plantas pueden inmovilizar los metales pesados (MP) a través de la sorción en sus raíces, precipitación, formación de complejos, reducción de la valencia del MP en la rizósfera (Barceló y Poschenrieder, 2003; Ghosh y Singh, 2005). Aunque la fitoestabilización limita el movimiento de los MP hacia la cadena trófica o mantos acuíferos, no es una solución permanente



ya que los MP siguen estando en el suelo. Actualmente, es empleada como una estrategia para la estabilización (inactivación) de contaminantes potencialmente tóxicos (Vangronsveld et al., 2009).

Fitovolatilización

La fitovolatilización es la absorción de los contaminantes del suelo por las plantas, su conversión en formas volátiles y subsecuente liberación a la atmosfera. Esta técnica puede ser empleada para contaminantes orgánicos y algunos metales como el Hg y Se. Sin embargo, su uso es limitado por el hecho de que no remueven el contaminante completamente solo lo transfieren del suelo a la atmosfera (Padmavathiamma y Li, 2007).

Fitodegradación

La fitodegradación es la degradación de los contaminantes orgánicos por las plantas a través de enzimas como deshalogenasas y oxigenasas. Las plantas pueden acumular contaminantes orgánicos de sitios contaminados y eliminarlos a través de sus actividades metabólicas. La fitodegradación está limitada solo a contaminantes orgánicos porque los metales no son biodegradables (Vishnoi y Srivastava, 2008).

En la unidad 3 revisaremos con mayor detalle estas estrategias de fitorremediación. A continuación, revisaremos los mecanismos que poseen las plantas para degradar los diferentes contaminantes.

2.1.1 Mecanismos de tolerancia y detoxificación de contaminantes

Las plantas exhiben diferentes mecanismos de tolerancia y detoxificación de contaminantes orgánicos e inorgánicos a continuación revisaremos algunos de ellos.

Contaminantes orgánicos.

Ciertas plantas tienen la capacidad para degradar o acumular compuestos orgánicos como el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (DDT), tricloroetileno (TCE), 2,4-diclorofenol, PCB's, explosivos como el trinitrotolueno (TNT) o dinitrotolueno, PAH's y detergentes (Tabla 4, Delgadillo-López y col., 2011).



Tabla 4. Algunas plantas capaces de degradar contaminantes orgánicos.

Contaminante orgánico	Planta	Efecto	Referencia
Benzotriazoles	<i>Helianthus annuus</i>	Metabolismo	Castro y col., 2003
4-Clorofenol 2,6-dimetilfenol naftaleno	<i>Carex gracilis</i>	Remediación	Wand y col., 2002
2,4-Diclorofenol	<i>Brassica napus</i>	Remediación	Agostini y col., 2003
DDT	<i>Brassica juncea</i> , <i>Cichorium intybus</i>	Metabolismo	Suresh y col., 2005
2,4-Dinitrotolueno	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismo	Yoony col., 2006
Metilterbutiléter	<i>Populus spp.</i>	Volatilización	Ma y col., 2004
Perclorato	<i>Nicotiana tabacum</i>	Metabolismo	Sundberg y col., 2003
Hidrocarburos de petróleo	<i>Vetiveria zizanooides</i>	Remediación	Brandt y col., 2006
Fenol	<i>Brassica juncea</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Azadirachta indica</i> , <i>Beta vulgaris</i>	Remediación	Singhy col., 2006
Fenol y clorofenoles	<i>Daucus carota</i>	Metabolismo	Araujo y col., 2002
Hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina	<i>Populus spp.</i>	Metabolismo	Van y col., 2004
TCE	<i>Populus spp.</i>	Metabolismo	Ma y Burken, 2003
TNT	<i>Myriophyllum aquaticum</i> , <i>Helianthus annuus</i>	Metabolismo	Sung y col., 2003 Adamia y col., 2006

(Delgadillo-López y col., 2011)



Se sabe que los microorganismos que habitan en la rizósfera tienen un papel importante en la degradación de la materia orgánica. Los metabolitos generados en esta degradación son absorbidos por las plantas junto con nitrógeno, fósforo y otros minerales (Garbisu *et al.*, 2007).

En la fitorremediación de contaminantes orgánicos se deben considerar los siguientes aspectos:

1. El metabolismo de los contaminantes al interior y al exterior de la planta (rizósfera),
2. Los procesos que conducen a la completa degradación de los contaminantes (mineralización)
3. La absorción de los contaminantes (Reichenauer y Germida, 2008).

Degradación de compuestos orgánicos en plantas.

Las plantas degradan los compuestos orgánicos mediante tres pasos secuenciales:

Fase I. Involucra la conversión/activación (oxidación, reducción e hidrólisis) de los compuestos orgánicos lipofílicos (Komives y Gullner, 2005).

Fase II. Permite la conjugación de los metabolitos de la fase I a una molécula hidrofílica endógena como los azúcares, aminoácidos y glutatona (Diet y Schnoor, 2001).

Fase III. Promueve la compartimentalización de los compuestos orgánicos modificados en las vacuolas o formación de enlaces con los componentes de la pared celular como la lignina y la hemicelulosa.

Las enzimas, en la planta, que catalizan la primera fase de las reacciones son las monoxigenasas P450 y las carboxilesterasas. De la segunda fase, en la que ocurre la conjugación por enzimas como la glutatona S-transferasa, resulta la formación de compuestos solubles y polares. La tercera fase del metabolismo de la planta es la compartimentalización y almacenamiento de los metabolitos solubles en las vacuolas o en la matriz de la pared celular.



La glutatión S-conjugasa es la encargada de este proceso (Cherian y Oliveira, 2005).

Contaminantes inorgánicos

Las plantas son capaces de absorber metales esenciales y no esenciales del suelo, como respuesta a los gradientes de concentración, mediante la absorción selectiva de iones o por difusión a través de las raíces. La capacidad de tolerar y acumular metales pesados (MP) en las plantas depende de la especie vegetal (Huang y Cunningham, 1996; McGrath et al., 2002). Cuando un MP entra a las células de una planta, ocurren numerosas reacciones bioquímicas, de las cuales, la mayoría son producidas por bloqueo de grupos funcionales de las proteínas o por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Figura 15).

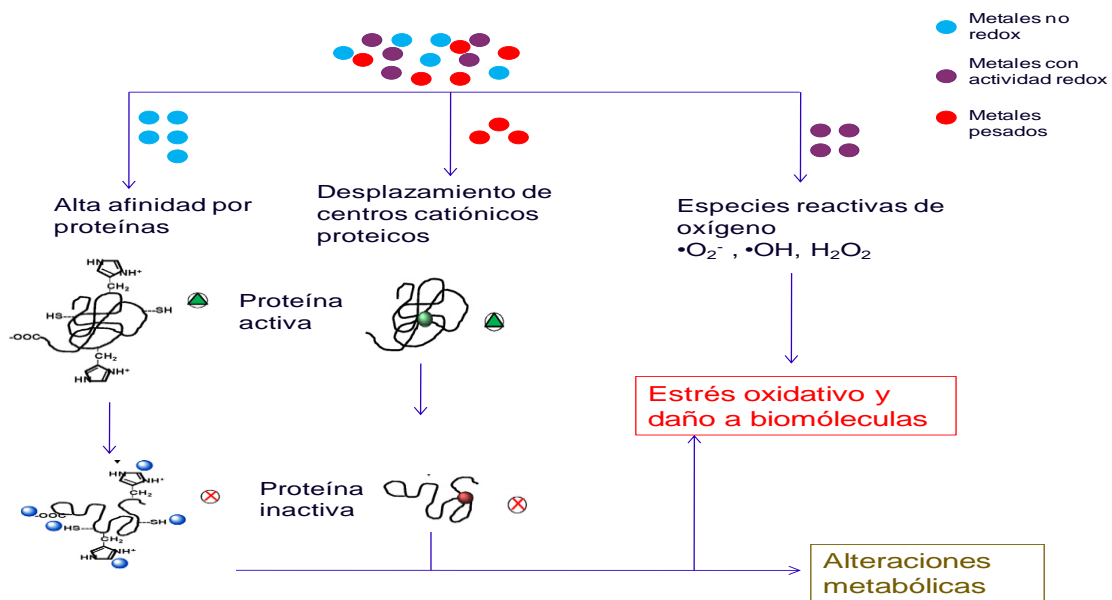


Figura 15. Toxicidad ocasionada por los metales pesados sobre las biomoléculas.

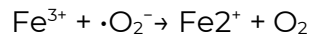
Tomado de: McGrath et al., 2002.



Los mecanismos moleculares de respuesta a MP, incluyen:

(a) Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO); por auto-oxidación y reacciones de Fenton y Haber-Weiss, estas reacciones son típicas para los metales con actividad redox (Fe y Cu). La reacción de Haber-Weiss genera radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) a partir de H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) y superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Esta reacción puede ocurrir en las células vivas y como consecuencia es una posible fuente de estrés oxidativo. La reacción directa es muy lenta, pero es catalizada por el hierro en estado de oxidación (III).

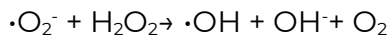
El primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del catión férrico a catión ferroso:



El segundo paso es una reacción de Fenton:



La reacción neta es:



(b) Bloqueo de grupos funcionales esenciales de biomoléculas, que se presenta principalmente con metales no redox (Cd y Hg); y (c) desplazamiento de metales esenciales de biomoléculas (Schützendübel y Polle, 2002). En respuesta al daño ocasionado por los MP, las células activan sus sistemas antioxidantes, producen moléculas encargadas de la detoxificación (glutación, fitoquelatinas y metalotioneínas), así como proteínas capaces de reparar las proteínas dañadas (chaperonas), y activan vías de señalización con el fin de que la célula active todos los mecanismos necesarios para que logre adaptarse, tolerar y defenderse de los MP (Ahsan *et al.*, 2009) (Figura 16).

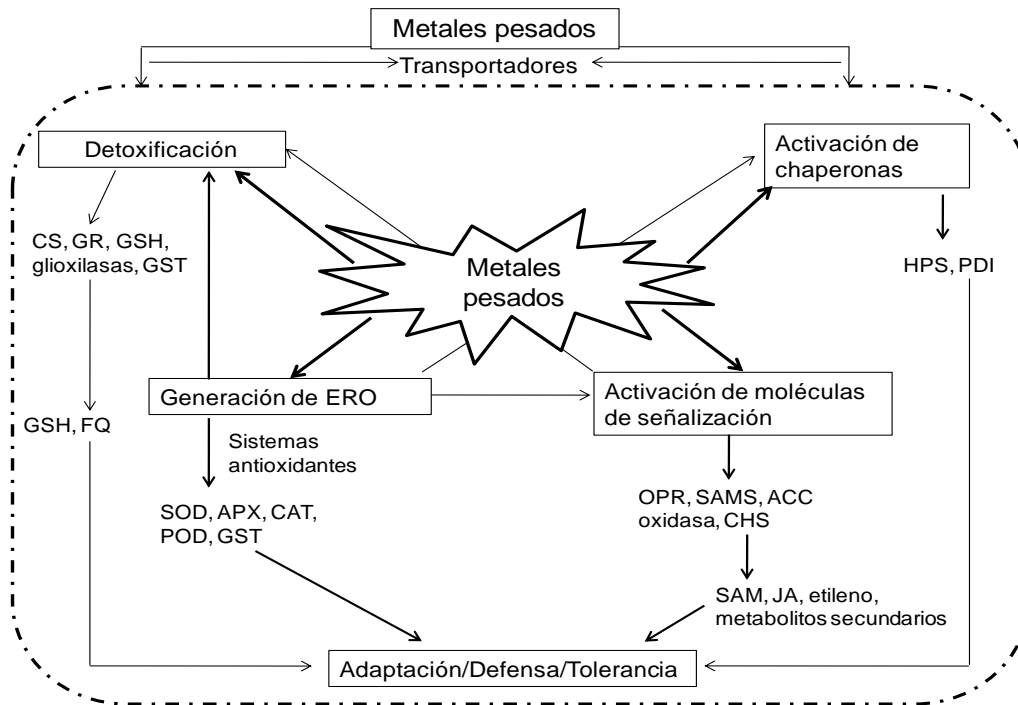


Figura 16. . Mecanismos de defensa activados por los MP en las células vegetales. CS, cisteína sintasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión; GST, glutatión-S-transferasa; SOD, superóxido dismutasa; APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; POD, peroxidasa; PDI, proteína disulfuro isomerasa; HSP, proteína de choque térmico; OPR, ácido 12-oxo-fitodienoico isomerasa; SAMS, S-adenosil-L-metionina sintetasa; ACC oxidasa, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa; CHS, chalcona sintasa; SAM, S-adenosil-L-metionina; JA, ácido jasmónico.

Tomado de: Ahsan y col., 2009

Las plantas poseen diversos mecanismos celulares involucrados en la detoxificación y tolerancia al estrés provocado por los MP. Estos mecanismos tienen la función de evitar altas concentraciones de iones metálicos en sitios sensibles dentro de la célula. Los mecanismos de tolerancia incluyen el secuestro de metales y la formación de complejos, siendo esta la primera línea de defensa contra la toxicidad provocada por los MP. La segunda línea de defensa incluye un amplio rango de mecanismos indirectos como sistemas antioxidantes celulares, proteínas de estrés térmico y sistemas de reparación de daños celulares (Hall, 2002).



Sistemas antioxidantes

Los MP provocan un incremento en el estrés oxidativo por la formación de ERO o por la disminución de las enzimas y moléculas antioxidantes. Los sistemas de defensa de las plantas contra las ERO incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) (Verma y Dubey, 2003). La SOD es la primera línea de defensa contra las ERO, el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) se puede dismutar en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 por acción de la SOD; el H_2O_2 formado puede ser descompuesto en H_2O y O_2 dentro de los peroxisomas, por acción de la CAT, enzima que no requiere un sustrato adicional. Asimismo, la eliminación del H_2O_2 dentro de otros compartimentos celulares depende de distintas peroxidasas, como la guayacol peroxidasa (G-POD) y la ascorbato peroxidasa (APX); ambas enzimas dependen de un sustrato reducido para su actividad. La enzima GR, junto con la dehidroascorbato reductasa (DHAR), se encuentran también involucradas en la eliminación de H_2O_2 a través del ciclo ascorbato – glutatión (Figura 17) (Noctor y Foyer, 1998). La GR también se encarga de mantener la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) alta, lo cual es importante para la protección contra el estrés oxidativo (Asada, 1994).

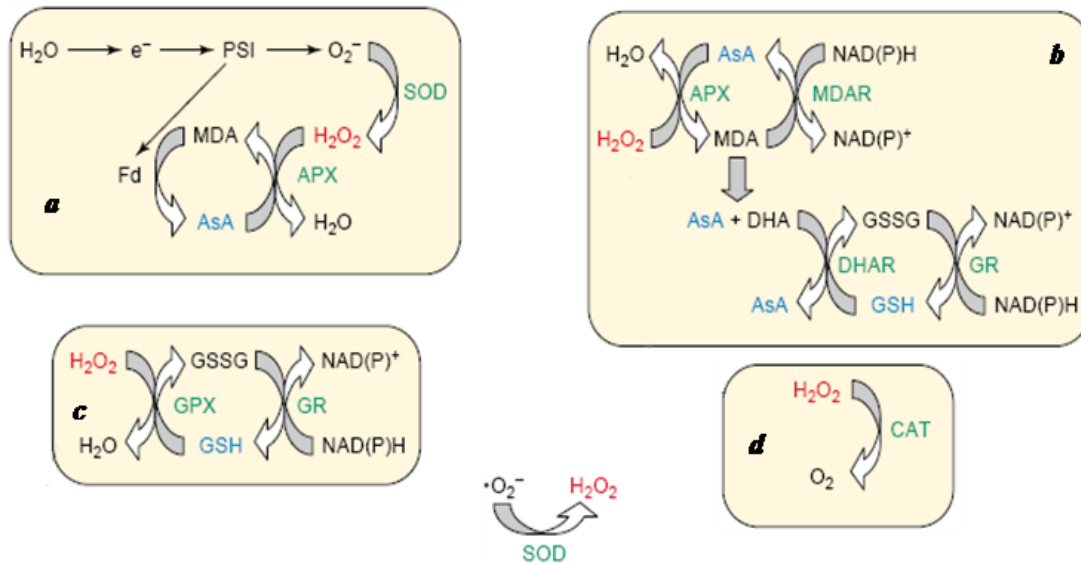


Figura 17. Sistemas antioxidantes para la eliminación de ERO en plantas: (a) Ciclo agua-agua; (b) ciclo ascorbato-glutati3n; (c) ciclo glutati3n peroxidasa (GPX); (d) acci3n de la catalasa (CAT) sobre el H₂O₂. Fd, ferredoxina; MDHA, monodehidro-ascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; PSI, fotosistema I; tAPX, APX tilacoidal.

Tomado de: Mittler, 2002

Por otra parte, en los tejidos vegetales, las principales mol3culas que actúan como eliminadoras de ERO, incluyen el 3cido ascorbico (AsA), tocoferoles, carotenoides y amino3cidos no proteicos como el GSH, adem3s de compuestos fen3licos como flavonoides, taninos y precursores de lignina. Todos estos antioxidantes actúan como una red cooperativa que emplea una serie de reacciones de 3xido-reducci3n para evitar el daño por ERO (Blokhina *et al.*, 2003; Grat3o *et al.*, 2005). Uno de los mecanismos de las plantas para soportar el exceso de H₂O₂ es a trav3s de su transporte a vacuolas para su detoxificaci3n. Las vacuolas son ricas en flavonoides, poderosos antioxidantes que eliminan varias ERO y peroxinitrito, y tambi3n pueden contener altos niveles de AsA, GSH y peroxidasa ubicada en la superficie interna del tonoplasto (Gechev *et al.*, 2006). El α -tocoferol se encuentra en altas concentraciones en las membranas fotosint3ticas donde



es el principal antioxidante lipofílico que interactúa con radicales peroxi- de lípidos y con $\cdot O_2^-$. Los carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides también pueden neutralizar ERO como $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$ y 1O_2 (Davey *et al.*, 2000).

Hasta ahora hemos dado una breve revisión a los mecanismos que poseen las plantas para metabolizar o almacenar algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Actividades

La elaboración de las actividades estará guiada por tu Docente en línea, mismo que te indicará, a través del **Organizador Didáctico de Aprendizaje** (ODA), la dinámica que tú y tus compañeros llevarán a cabo, así como los envíos que tendrán que realizar.

Autorreflexiones

Para la parte de **autorreflexiones** debes de consultar el foro *Preguntas de Autorreflexión* para realizar la actividad correspondiente y enviarlo a la herramienta de *Autorreflexiones*. Cabe recordar que esta actividad tiene una ponderación del 10% de tu evaluación.

Cierre de Unidad

En esta Unidad lograste conocer a detalle las características metabólicas de microorganismos y plantas involucrados en los procesos de biorremediación. Asimismo, lograste identificar los microorganismos involucrados en procesos de biorremediación, así como distinguir las características de las plantas empleadas en la fitorremediación. Y, por último, conociste los principales mecanismos de detoxificación que poseen los microorganismos y las plantas.



Fuentes de consulta



- Aeckersberf, G., Rainey, F. A, Widdel, F. (1998). Growth, natural relationships, cell fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria utilizing long-chain alkanes under anoxic conditions, *Arch. Microbiol.* 170,361-369.
- Bache, R., Pfennig, N. (1981). Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* 130: 255-261.
- Beknhardt, F. H., Staudingeh, R., Ullrich, V. (1970). Eigenschaften einer p-Anisat-o-Demethylase im zellfreien Extrakt von *Pseudomonas species*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351: 467 - 478.
- Brenner K, You L, Arnold FH. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26(9):483-9. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.05.004.
- Deppe, U., Richnow, H-H., Michaelis, W., Antranikian, G. (2005). Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles.* 9(6), 461-470.
- Egli, T., Bally, M., Uetz, T. (1990). Microbial degradation of chelating agents used in detergents with special reference to nitrilotriacetic acid (NTA). *Biodegradation.* 1: 121-132.
- El-Shafei, H.A., El-Nasser, N.H.A., Kansoh, A.L. et al. (1998). Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and *Streptomyces species*. *Polym. Degrad. Stab.* 62: 361-365.
- Evans, W. C. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature.* 270: 17-22.
- Fritsche, W. and Hofrichter, M. (2001) *Aerobic Degradation by Microorganisms*, in *Biotechnology Set, Second Edition* (eds H.-J.



- Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. doi:10.1002/9783527620999.ch6m.
- Harder, J. (1997). Anaerobic methane oxidation by bacteria employing ^{14}C -methane uncontaminated with ^{14}C -carbon monoxide. *Mar. Geol.* 137: 13-23.
- Haselwandter, K., Ebner, M.R. (1994) Microorganisms surviving for 5300 years. *FEMS Microbiol. Lett.* 116: 189 – 194.
- Hincheer, E., Alleman, B. C., Hoepfel, E., Miller, R. N. (Eds.) (1994), *Hydrocarbon Bioremediation*. Boca Raton, FL: Lewis Publisher.
- Iiyoshi, Y., Tsutsumi, Y., Nishida, T. (1997). Polyethylene biodegradation by white rot fungi. In: *Proceedings of the Ninth International Symposium on Wood and Pulp Chemistry*, Montreal, Canada, pp. 38-1 to 38-4.
- Lawton, J.H., Jones, C.G. (1995) Linking species and ecosystems: organisms as ecosystem engineers. En: *Linking Species and Ecosystems*, C.G. Jones & J.H. Lawton (Eds.) Chapman and Hall, New York. pp. 141-150.
- Margesin, R., Schinner F. (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 650-663.
- Mohapatra, P.K. (2006). *Textbook of Environmental Microbiology* (I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi).
- Norteman, B. N. (1992). Total degradation of EDTA by mixed cultures and a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 671- 676.
- Pilon-Smits E. (2005). Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol.* 56: 15-39.
- Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberf, G., Rainey, F. A. (1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by denitrifying bacteria. *Nature* 372,445 - 458.
- Sathishkumar, M., Binupriya, A.R., Baik, S-H., Yun, S-E. (2008). Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean.* 36(1), 92-96.
- Schink, B. (1988). Principles and limits of anaerobic degradation - environmental and technological aspects, in: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. (Zehnder, A.J. B., Ed.), pp. 771-846. New York: John Wiley & Sons.
- Schink, B. (1997), Energetics of syntrophic cooperations in methanogenic degradation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61,262-280.
- Smith, M. R. (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1,191-206.



- Suflita, J. M., Liang, L. N., Saxena, A. (1989). The anaerobic degradation of o-, m-, and p-cresol by sulfate-reducing bacterial enrichment cultures obtained from a shallow anoxic aquifer. *J. Ind. Microbiol.* 4: 255-266.
- Supaphol, S., Jenkins, S.N., Intomo, P., Waite, I.S., O'Donnell, A.G. (2011). Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresource Technol* 102(5):4021-4027. 10.1016/j.biortech.2010.11.124.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73(7), 1163-1172.
- Yamada-Onodera, K., H. Mukumoto, Y. Katsuyaya, et al. (2001). Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polym. Degrad. Stab.* 72: 323-327.
- Zehnder, A. J. B., Brock, T. D. (1980). Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 194-204.