

BASES MOLECULARES DE LA FITORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO

Biological Basis of Phytoremediation of Total Petroleum Hydrocarbons

Julián Mario Peña-Castro¹, Blanca Estela Barrera-Figueroa¹, Roberto Ruiz-Medrano¹ y
Beatriz Xoconostle-Cázares^{1‡}

RESUMEN

La fitorremediación es una biotecnología que ha demostrado su utilidad en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en diversas pruebas de campo. A pesar de sus ventajas, es importante entender los mecanismos biológicos que la sustentan. En este trabajo, se revisa la literatura publicada recientemente sobre los mecanismos investigados de la fitorremediación de HTP: el efecto de la rizosfera, la estimulación de genotipos bacterianos con propiedades para degradar HTP en la rizosfera, la modificación enzimática o degradación de hidrocarburos *in y ex planta* y los mecanismos de detoxificación. Por último, se describen las respuestas al estrés en las plantas al crecer en suelos contaminados por HTP.

Palabras clave: pastos, fitotoxicidad, enzimas, hidrocarburos del petróleo.

SUMMARY

Phytoremediation is an efficient field-scale tested biotechnology for the removal of total petroleum hydrocarbons (TPH) in polluted soils. However, in order to expand the current capabilities of phytoremediation, a better understanding of the basic biological mechanisms underlying this technology is imperative. In this paper, the recent literature on the three principal biological mechanisms describing TPH phytoremediation are reviewed. These are the rhizosphere effect, the rhizosphere enrichment of specific TPH-degradative bacterial genotypes, *in and ex planta* TPH enzymatic

modification, or degradation and plant detoxification mechanisms in addition to stress responses when growing in TPH polluted soils.

Index words: grass, phytotoxicity, oil hydrocarbons, enzymes.

INTRODUCCIÓN

La actividad humana -doméstica, agrícola e industrial- ha conducido a la movilización de toneladas de elementos y compuestos orgánicos e inorgánicos fuera de sus compartimentos geoecológicos. Lo anterior tiene como consecuencia negativa problemas ambientales, tanto en países desarrollados, como en países en vías de desarrollo, mismos que impactan directamente a la salud humana y la diversidad biológica (Wania y Mackay, 1996). Por esta razón, los gobiernos de diversos países han implementado normatividades ambientales que obligan a las fuentes de contaminación a implementar opciones para tratar los residuos generados (Guédez-Mozur *et al.*, 2003).

El petróleo es un ejemplo claro de lo anterior, pues los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) son una de las fuentes básicas de energía sobre las cuales se sustentan las actividades económicas de todos los países del mundo. Por otra parte, los HTP también son la principal fuente que origina los problemas ambientales más importantes de este siglo, como el smog, el cambio climático global y la liberación de moléculas tóxicas (Hall *et al.*, 2003). En países productores, como México y muchos otros, la extracción, el transporte y el procesamiento de HTP ha conducido a la contaminación de grandes áreas de suelo y agua (Gallegos Martínez *et al.*, 2000; Iturbe *et al.*, 2004; García-Cuellar *et al.*, 2004)

En la actualidad, un gran número de grupos de investigación en biotecnología están diseñando procesos en los que se emplean uno o más elementos bióticos para inmovilizar o transformar a los contaminantes ambientales. Este proceso se denomina biorremediación

¹ Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional. Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, GAM, 07360 México D.F.

[‡] Autor responsable (bxoconos@cinvestav.mx)

Recibido: noviembre de 2003. Aceptado: diciembre de 2005.
Publicado como ensayo en *Terra Latinoamericana* 24: 529-539.

y proveerá de sustanciales mejoras en la restauración de suelos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo (Adams *et al.*, 1999; Alexander, 1999; Infante, 2001).

En el caso de los suelos contaminados, las tecnologías de biorremediación se aplican en el mismo lugar (*in situ*), o bien, el suelo contaminado se transporta fuera de su sitio original para su procesamiento (*ex situ*) (Infante, 2001). Estos procedimientos pueden implicar la aireación del suelo, el suplemento de nutrimentos o la inoculación con bacterias (p. ej. *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) y hongos degradadores (p. ej. *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium frequentans*), con el propósito de crear un ambiente propicio para que los microorganismos sean capaces de -preferencialmente- degradar a los compuestos contaminantes o, en su defecto, volatilizarlos, y así disminuir la toxicidad del suelo remanente (Adams *et al.*, 1999; Alexander, 1999; Infante, 2001).

La fitorremediación puede considerarse como una técnica *in situ* de biorremediación, como la bioaumentación, la bioestimulación y la atenuación natural (Alexander, 1999). La fitorremediación se define como el uso de especies vegetales vivas para eliminar o transformar contaminantes ambientales, con el fin de hacerlos inocuos para el ambiente y la salud (Salt *et al.*, 1998; USEPA, 2000). La fitorremediación se ha validado en pruebas de campo exitosas, para la remediación de contaminación, tanto orgánica como inorgánica (Watanabe, 1997; Fiorenza *et al.*, 2000; Nedunuri *et al.*, 2000; USEPA, 2000; Van der Lelie *et al.*, 2001).

En el caso de la contaminación del suelo por petróleo, la extensión de las zonas contaminadas llega a hacer prohibitiva, por razones económicas, la aplicación de técnicas tradicionales de remediación (p. ej. desorción térmica o el lavado mecánico del suelo) por lo que la biotecnología ambiental puede encontrar aquí su nicho de mercado (Gallegos Martínez *et al.*, 2000; Infante, 2001). La fitorremediación de sitios contaminados por petróleo es una de las aplicaciones más prometedoras de esta biotecnología en México y otros países que poseen vastas reservas de hidrocarburos en zonas tropicales (Aburto *et al.*, 2001).

No obstante, a la fecha, se desconocen las bases biológicas que podrían explicar la efectividad del procedimiento, por lo cual es necesario realizar investigación básica para identificar a escala bioquímica y molecular los mecanismos fundamentales de la fitorremediación (Meagher, 2000).

Esta revisión tiene como objetivo analizar la literatura en la que se han aportado diversas hipótesis sobre las bases biológicas de la fitorremediación de HTP, así como aquella en la que se han comprobado los mecanismos propuestos.

FUNCIÓN DE LA PLANTA EN LA FITORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO

Diversos estudios han demostrado que la degradación de los HTP y sus componentes (hidrocarburos alifáticos, policíclicos, fenólicos y otros) es más rápida en suelos donde existe vegetación creciendo activamente, que en suelos donde sólo existen microorganismos o suelos estériles (Aprill y Sims, 1990; Günther *et al.*, 1996; Nedunuri *et al.*, 2000; Siciliano *et al.*, 2003); además, se ha observado que la toxicidad remanente de los suelos recuperados por fitorremediación es menor que la de aquéllos recuperados por otros tratamientos (Joner *et al.*, 2001). Este sinergismo puede explicarse si se considera que la planta posee un papel activo en la transformación de las fracciones que componen a los HTP, así como en el fomento de los microorganismos que los degradan. Diversos autores han propuesto algunas hipótesis que podrían explicar por qué la presencia de la planta aumenta la degradación de HTP en el suelo. A continuación se enlistan las hipótesis más importantes:

1. La rizosfera crea un mejoramiento de las propiedades físicas y químicas de los suelos contaminados mediante la aireación e introducción de nutrimentos por la penetración radicular, lo que fomenta la riqueza y diversidad microbiológica del suelo, en consecuencia, existen más microorganismos y mayor degradación de HTP. A esta hipótesis se le conoce como "efecto rizosfera" (Aprill y Sims, 1990; Günther *et al.*, 1996; Shaw y Burns, 2003).

2. La comunicación directa planta-bacteria contribuye a un aumento en la degradación del contaminante, al crear una zona favorable para el fomento selectivo de los genotipos microbianos degradadores de HTP del suelo (Top y Springael, 2003). De manera indirecta, se promueve el co-metabolismo de los contaminantes y se inducen vías catabólicas microbianas por compuestos de origen vegetal (Siciliano y Germida, 1998; Shaw y Burns, 2003; Francova *et al.*, 2004).

3. Degradación *ex e in planta*: se establece la hipótesis que la extracción de agua hacia la parte aérea y la reversión del gradiente hidráulico pueden favorecer la degradación o inmovilización del contaminante (en especial, los menos hidrofóbicos) en las raíces y la parte aérea, por medio de enzimas vegetales (Korte *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2001).

Los tres mecanismos propuestos no son excluyentes y la fitorremediación puede ser el resultado de la combinación de ellos, en proporciones hasta ahora no descritas (Shaw y Burns, 2003).

Efecto Rizosfera y Comunicación Planta-Bacteria

En la zona rizosférica se presentan múltiples fenómenos de comunicación que inducen o inhiben el crecimiento de microorganismos, así como otros factores nutrimentales, e incluso espaciales, que ocurren en función del tiempo (Walker *et al.*, 2003). El efecto rizosfera y la comunicación planta-bacteria ocurren en el hábitat ecológico de la raíz, donde la dinámica poblacional microbiana es altamente influida por ese órgano vegetal; de esta manera, ambas hipótesis pueden discutirse en conjunto.

El efecto rizosfera involucra al enriquecimiento de la diversidad microbiana en el suelo, influido por la raíz (Grayston *et al.*, 1998), cuyo resultado inmediato sería una mayor actividad en la degradación del contaminante por los múltiples sistemas enzimáticos que poseen los microorganismos (Mishra *et al.*, 2001). La comunicación específica planta-bacteria involucraría sistemas complejos de comunicación, en los cuales la planta, al estar sometida a un estrés por un contaminante orgánico, cambiaría sus patrones de exudación de compuestos para promover el crecimiento de microorganismos con las capacidades degradadoras adecuadas (Siciliano y Germida, 1998).

Enriquecimiento de la flora microbiana en la rizosfera. Debido al problema metodológico que implica la separación de los microorganismos y la rizosfera para su estudio, la asignación de la actividad transformante a la planta o los microorganismos es difícil, aunque la evidencia experimental apoya más la hipótesis del efecto rizosfera. Así, los suelos rizosféricos aún altamente contaminados con hidrocarburos son capaces de sustentar una gran diversidad microbiana y, de ellos, es posible aislar múltiples organismos hidrocarbonoclastas (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). La capacidad de esa microflora para metabolizar múltiples sustratos es mayor

cuando el suelo contaminado con HTP se cultiva con gramíneas, que en ausencia de plantas creciendo en él (Banks *et al.*, 1997). En adición, el efecto de enriquecimiento microbiano en la rizosfera es notorio, aun cuando la concentración de HTP disminuye hasta 50% o más, por efecto de la fitorremediación (Hutchinson *et al.*, 2001a).

Comunicación indirecta planta-bacteria. A la fecha, de la exudación de moléculas sintetizadas por la raíz, se conoce que pueden inducir la síntesis bacteriana de enzimas con capacidades de transformación de contaminantes orgánicos (Siciliano y Germida, 1998; Shaw y Burns, 2003). Un ejemplo de lo anterior son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA); se sabe que el ácido salicílico es un inductor de la actividad catabólica de HPA por bacterias (Rentz *et al.*, 2004). En la última década, hay evidencias experimentales sobre la existencia de co-metabolismo inducido por plantas para la degradación de una amplia gama de contaminantes orgánicos solubles, como insecticidas y surfactantes (Shaw y Burns, 2003). En el caso de compuestos menos solubles más similares a los componentes de los HTP, autores como Hegde y Fletcher (1996) encontraron que *Morus rubra* exuda a la rizosfera una gran variedad de compuestos fenólicos, incluso de hasta tres anillos, y que este fenómeno era dependiente de la edad de la planta. En trabajos anteriores, se demostró que dichos compuestos fenólicos podían sustentar el crecimiento de bacterias degradadoras de bifenilos policlorados (BPC) que son compuestos xenobióticos recalcitrantes (Donnelly *et al.*, 1994). Además del co-metabolismo, la catálisis compartida y secuencial de contaminantes orgánicos se ha demostrado; autores como Francova *et al.* (2004) reportaron recientemente que los metabolitos derivados de los BPC, parcialmente hidroxilados por las células vegetales, pueden utilizarse como sustratos de enzimas microbianas que los continúan oxidando.

Comunicación directa planta-bacteria. En un trabajo no directamente relacionado con la fitorremediación, Mawdsley y Burns (1994) encontraron que cuando la bacteria *Flavobacterium* se inoculó a plántulas de trigo, las actividades de algunas enzimas microbianas detectadas en la rizosfera relacionadas con la adquisición de nutrimentos, cambiaron con el desarrollo fenológico de la planta. Este efecto no pudo atribuirse a la muerte celular bacteriana o al número total de bacterias, por lo tanto, se consideró que los patrones de producción enzimática de las bacterias responden a los cambios de

los exudados de la planta. En las revisiones sobre fitorremediación se discute que una relación planta-bacteria similar puede establecerse con cambios enzimáticos semejantes a los reportados por Mawdsley y Burns (1994), pero ahora con enzimas importantes para la fitorremediación (Siciliano y Germida, 1998).

El estado actual de la investigación sobre la rizosfera ha acumulado mucha información que demuestra que la comunicación entre la raíz de las plantas y sus alrededores existe y es sumamente compleja (Walker *et al.*, 2003), pero la importancia de esta comunicación en la fitorremediación no se ha estudiado directamente en el compartimiento de la raíz y muy poco en el de los microorganismos. Algunos reportes recientes aportan evidencias de la posible existencia de un mecanismo mediante el cual la planta enriquece diferencialmente a las poblaciones microbianas con capacidades metabólicas deseables ante la presencia de un tipo específico de contaminante. Mediante la detección por hibridación y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes que codifican enzimas catabólicas bacterianas de importancia en la degradación de HTP (alcano monooxigenasa, naftaleno dioxigenasa, y catecol 2,3-dioxigenasa) y compuestos nitroaromáticos (nitrotolueno monooxigenasa y 2-nitrotolueno reductasa), Siciliano *et al.* (2001) encontraron que los genotipos bacterianos con potencial degradador de hidrocarburos podían detectarse en mayor abundancia (entre 50 y 200% más) en la raíz y en la rizosfera, que en el suelo sin vegetación. Este estudio se realizó con organismos bacterianos cultivables, así como en ADN bacteriano total extraído de suelo rizosférico, raíz y suelo no rizosférico; lo mismo sucedió cuando se detectaron los genes que codifican enzimas importantes para la degradación de nitroaromáticos. De manera interesante, los genes catabólicos de hidrocarburos no se detectaron en contaminación por nitroaromáticos y *viceversa*, pero conjuntamente este efecto fue específico de la especie de planta analizada, por ejemplo, *Festuca arundinacea*, un pasto comúnmente empleado en la fitorremediación de HTP y que no es tolerante a nitroaromáticos, no promovió el genotipo degradador de nitroaromáticos a pesar de sembrarse en suelo contaminado con estos compuestos.

Siciliano *et al.* (2003), mediante técnicas similares, establecieron que la diversidad taxonómica del suelo no cambió al estar presentes algunos HPA, pero sí aumentó la presencia de genes catabólicos específicos para la degradación de HPA. No obstante que el fenotipo no

se determinó directamente, los trabajos de Siciliano *et al.* (2001, 2003) fueron los primeros que demuestran el enriquecimiento de genotipos catabólicos de manera específica alrededor de la raíz, en relación con el contaminante presente; sin embargo, el mecanismo de comunicación permanece sin dilucidarse.

La transferencia horizontal de genes por conjugación bacteriana es el mecanismo más probable por el cual se enriquecen estas poblaciones (Top y Springael, 2003). Por ejemplo, se conoce que las bacterias rizosféricas son capaces de transferirse los genes para el catabolismo de HPA, aun entre grupos bacterianos que no están filogenéticamente relacionados (Wilson *et al.*, 2003). De manera notable, la familia de genes catabólicos de HPA que es transferida horizontalmente es altamente influida por la presencia o ausencia de plantas más que por la concentración del contaminante (Wilson *et al.*, 2003). De tal forma, la rizosfera de diversos tipos de plantas es un ambiente más propicio para la transferencia horizontal de genes que el suelo no rizosférico, sin embargo, el aumento de la transferencia también depende del tipo de planta (Schwaner y Kroer, 2001). Se ignora por qué ocurre esto, pero se ha propuesto que una mayor concentración de bacterias puede ser alcanzada en la rizosfera, lo que favorecería el contacto entre las bacterias donantes y las receptoras (Top y Springael, 2003).

Estos conocimientos básicos ya comienzan a ser utilizados por la biotecnología. Por medio de la conjugación, ha sido posible obtener bacterias endófitas capaces de mejorar la fitorremediación de hidrocarburos solubles como el tolueno, además de atenuar la fitotoxicidad del contaminante, en comparación con plantas que no han establecido relación con ninguna bacteria o con plantas asociadas con bacterias que poseen los genes catabólicos adecuados, pero que no son endófitas (Barac *et al.*, 2004).

Importancia de las micorrizas en la fitorremediación de HTP. Además de las bacterias, los hongos micorrícicos también son de gran importancia para lograr un proceso exitoso de remediación, ya que los tratamientos de fitorremediación en los cuales se establecen asociaciones micorrícicas son más eficientes en la remoción de HPA y en la disminución de la toxicidad del suelo remediado (Joner *et al.*, 2001). Este efecto puede deberse a los beneficios que trae esta simbiosis en el desarrollo de las plantas, como mejor adquisición de nutrimentos inorgánicos, protección de la raíz ante patógenos y ante otros estreses abióticos, como

sequía (Hause y Fester, 2005). Sin embargo, se ha descrito que existe un efecto positivo adicional de la simbiosis micorrícica en la fitorremediación de petróleo y es la estimulación de una microflora de bacterias específica de esta simbiosis que podría ser responsable del aumento registrado en la eficiencia de la fitorremediación (Heinonslao *et al.*, 2000).

Más allá de lo anterior, la dinámica de la micorriza, en casos de contaminación con HTP o compuestos relacionados, no se ha investigado a pesar de que se estima que el área superficial que estos organismos ocupan en la rizosfera podría superar, por varios órdenes de magnitud, al de la raíz misma (Davis *et al.*, 2002). Sin embargo, las investigaciones realizadas sobre micorrizas en otros casos de contaminación ambiental, como por metales pesados, demuestran la participación activa de especies micorrícicas asociadas a la raíz de las plantas en la remoción de metales pesados (González-Chávez *et al.*, 2002).

Investigaciones tecnológicas en fitorremediación.

No obstante que el efecto rizosfera implica que la presencia de la planta creará condiciones óptimas para la degradación de los compuestos orgánicos, es necesario mencionar que, en algunas ocasiones, el proceso de fitorremediación necesitará de adecuaciones tecnológicas para hacerlo exitoso. Rentz *et al.* (2003) reportaron que un suelo contaminado con petróleo puede tener zonas altamente anaerobias que no permitirían a la raíz ni a los organismos aerobios crecer, lo anterior se debería a la alta demanda biológica de oxígeno de estos suelos. Rentz *et al.* (2003) también reportaron varios arreglos de ingeniería para mejorar la oxigenación de estos ambientes, así como varios tratamientos de fertilizantes que mejoran el crecimiento vegetal (en especial las raíces); estos autores ponen énfasis en que estos tratamientos de fertilizantes no deben fomentar el crecimiento de hongos o bacterias patógenos no competentes para la degradación.

Otra característica agronómica que recientemente ha llamado la atención es la de las relaciones suelo-agua en los suelos contaminados con HTP. Se ha observado que el agua no queda retenida en estos suelos, debido a su alta hidrofobicidad; en consecuencia, las plantas que se siembran en estos suelos tienen una baja eficiencia en el uso de agua, siendo ésta tan severa que puede llegar a disminuir marcadamente su crecimiento (Li *et al.*, 1997) y germinación, aun en especies reportadas en casos exitosos de fitorremediación (Adam y Duncan, 2002).

Debido a que no es el objetivo de esta revisión, no se mencionarán de forma extensiva las diversas prácticas agronómicas que se están proponiendo para mejorar los procesos de fitorremediación (evaluación de variedades, selección de fertilizantes, balance de agua, modelos de transferencia y monitoreo de la remediación), sin embargo, se aconseja ampliamente al lector la consulta de las siguientes revisiones y artículos recientes que tratan detalladamente este aspecto tecnológico de la fitorremediación (Fiorenza *et al.*, 2000; USEPA, 2000; Hutchinson *et al.*, 2001a,b; Davis *et al.*, 2002; Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003; Newman y Reynolds, 2004).

Degradación *in* y *ex planta*

En el caso de la contaminación por metales pesados (Meagher, 2000; Mejaré y Bülow, 2001) y por compuestos orgánicos de alta y media solubilidad, como herbicidas, plaguicidas, solventes y explosivos, la extracción, acumulación o volatilización por la planta, en general, aporta un porcentaje relevante de la remoción debido a la mayor movilidad de estos compuestos hacia y en la planta (Simonich y Hites, 1995; Salt *et al.*, 1998). Lo anterior no se aplica en la remoción de la mayor parte de los componentes de los HTP y otros contaminantes orgánicos de baja solubilidad, pues el papel directo de la planta en la extracción y remoción no es tan relevante. Esto se debe a que el contenido de materia orgánica, la solubilidad del compuesto y el propio suelo son barreras que tiene que superar un contaminante hidrofóbico para llegar a establecer contacto con la planta. Aunque si se analiza el fenómeno en otras condiciones físicas (en especial sin suelo), la planta puede tener respuestas complejas ante la presencia de un contaminante hidrófobo o hidrófilo y puede responder, de diversas maneras, a los efectos tóxicos que puede ejercer.

Degradación *in planta*: el “hígado verde” y su enzimología. Desde hace más de 20 años se conoce que las células vegetales en suspensión, macerados y microsomas vegetales pueden transformar los HPA a diversos metabolitos hidroxilados como son quinonas (Van der Trenck y Sandermann, 1980), alcoholes y dioles (Negishi *et al.*, 1987; Warshawsky *et al.*, 1988), y otros compuestos indeterminados de diferente solubilidad (Van der Trenck y Sandermann, 1978, Higashi *et al.*, 1981; Harms, 1983).

Dado que algunos de estos son metabolitos mutagénicos o citotóxicos, se planteó la hipótesis de que las plantas

debían poseer un sistema posterior de destoxificación. Existen evidencias experimentales que sugieren que las plantas pueden incluir nuevos grupos químicos a estas moléculas insolubles, como carbohidratos y sulfatos (Negishi *et al.*, 1987), y péptidos, como glutatión (Diesperger y Sandermann, 1979; Van der Trenck y Sandermann, 1980). En adición, en un sistema *in vitro* de síntesis de lignina, se encontró que las quinonas derivadas de HPA podían incorporarse a este polímero, siendo éste el último paso de inmovilización y destoxificación (Van der Trenck y Sandermann, 1981). Esta capacidad metabólica de las plantas se reportó recientemente para otras estructuras presentes en los HTP, como otros HPA y alcanos lineales y cíclicos (Korte *et al.*, 2000). Incluso se describió que algunos monofenólicos pueden absorberse rápidamente por las hojas y su metabolismo puede llegar a grados avanzados de degradación, hasta mineralizar a CO₂ 5% del contaminante aplicado y el resto asimilarse en ácidos orgánicos y aminoácidos (Ugrekheldze *et al.*, 1997). Estos pasos de modificación química de compuestos orgánicos no sólo se presentan para los HPA y HTP, también para otras estructuras muy diferentes entre sí, incluso xenobióticos; esto ha sido base para proponer los pasos enzimáticos que consisten en la teoría del "hígado verde", por analogía con el metabolismo de destoxificación de compuestos orgánicos en seres humanos (Sandermann, 1992). De esta manera, la enzimología de la destoxificación de compuestos orgánicos se divide en tres tipos: de transformación o activación (Fase I), de conjugación (Fase II) y de compartamentación (Fase III).

Las enzimas de la Fase I son las que están involucradas en la degradación y modificación *ex e in planta* (las de las Fases II y III se tratarán en la sección de toxicidad). Las enzimas de la Fase I, para el caso de HPA y otros compuestos orgánicos (incluso endógenos), poseen actividad de P450 monooxigenasas y de peroxidasas (Khatisashvili *et al.*, 1997; Stiborová *et al.*, 2000; Chroma *et al.*, 2002; Flocco *et al.*, 2002). Las P450 monooxigenasas son una superfamilia de proteínas presentes en todas las divisiones filogenéticas de los seres vivos; en las plantas se estima que existen cerca de 300 genes codificándolas, cuyo control transcripcional es tejido específico (Xu *et al.*, 2001). El análisis del comportamiento de estas enzimas ante un contaminante se encuentra en niveles muy básicos, sin embargo, los estudios preeliminares muestran evidencia de que el ataque de estructuras relacionadas con los HTP por

este tipo de enzimas no es fortuito y obedece a una red de señales no definidas (que podría ser el estrés mismo) que inducen cambios fisiológicos (movimiento de membranas) y bioquímicos (cambio de actividades enzimáticas) tendientes a favorecer el desvío de recursos energéticos de las células en estrés hacia la neutralización del compuesto orgánico (Khatisashvili *et al.*, 1997; Kvesitadze *et al.*, 2001).

Una aportación técnica muy importante del trabajo de Xu *et al.* (2001) fue la demostración de que es posible estudiar, mediante metodologías de escrutinio masivo de genes -en este caso microarreglos-, la expresión específica en tejidos de los genes codificantes de una superfamilia como P450, que posee entre sí homologías de secuencia de DNA hasta 20%.

Respecto a lo anterior, existen múltiples metodologías mediante las cuales es posible hacer el estudio, tanto genómico, como transcriptómico, de condiciones contrastantes de interés para la biotecnología ambiental en plantas y otros organismos (Diatchenko *et al.*, 1999; Holtrof *et al.*, 2002).

Los estudios sobre la capacidad catabólica vegetal se ha evaluado en condiciones de laboratorio que pueden diferir de la que ocurre *in situ* en suelos contaminados (Kucerová *et al.*, 2001; Flocco *et al.*, 2002). En la fitorremediación en condiciones de campo, este tipo de mecanismos de degradación serían de mayor importancia para la tolerancia de la planta que para la desaparición del compuesto contaminante, lo cual no es menos importante, ya que el cultivo de una especie tolerante que pueda desarrollarse en un ambiente contaminado con HTP es una condición primordial para el éxito de un proceso de fitorremediación (Salt *et al.*, 1998; USEPA, 2000; Harvey *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos por Chaîneau *et al.* (1997) pueden tomarse como evidencia indirecta del efecto protector de las enzimas de Fase I, ya que en condiciones en las cuales la fitotoxicidad puede sobrellevarse, no se encuentran hidrocarburos en la planta, a diferencia de cuando hay fitotoxicidad por altas concentraciones, que sí se registraron estas fracciones en la planta.

Otro fenómeno en el que estas respuestas pueden ser de gran importancia práctica en la biotecnología ambiental es en el estudio de la acumulación y para el desarrollo de biomonitores de contaminación (Simonich y Hites, 1995). También son de interés en el estudio de la capacidad de las plantas para remover contaminantes orgánicos del aire, en especial en ambientes cerrados (Cornejo *et al.*, 1999).

Degradación *ex planta*. Existen otras posibilidades de que la planta participe directamente en la inmovilización o degradación de un HTP en el suelo. La enzimología *ex planta* abre esta posibilidad y estaría en concordancia con estudios recientes que demuestran que incluso moléculas de baja solubilidad, como los HPA, pueden acumularse en mayores concentraciones en el suelo adyacente a la raíz y que la fracción anteriormente biodisponible resulta ahora inmovilizada con la presencia de las plantas (Liste y Alexander, 2000a,b). Se ha reportado la existencia de enzimas extrarradiculares de la Fase I en suficientes concentraciones en la rizosfera como para tener una participación notoria en la degradación de algunos compuestos orgánicos. La capacidad de secreción de estas enzimas no resultó ser una propiedad generalizada de todas las plantas evaluadas y, de manera interesante, las gramíneas que comúnmente se usan en pruebas de campo exitosas de fitorremediación de HTP resultaron ser las máximas secretoras de ellas (Gramss *et al.*, 1999). Se ha encontrado que las enzimas de Fase I de la superficie de la raíz de algunas plantas tienen la capacidad de polimerizar y, tal vez, degradar una variedad de compuestos fenólicos (Adler *et al.*, 1994) y compuestos halogenados (Siciliano *et al.*, 1998). Hay que recordar que el metabolismo compartido de contaminantes orgánicos entre plantas y bacterias se ha demostrado ya en el caso de los BPC (Francova *et al.*, 2004).

ESTRÉS EN PLANTAS POR HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO

Los HTP son tóxicos para las plantas y la tolerancia a ellos es muy variable en el reino vegetal, aun variedades (Adam y Duncan, 2002; Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003). La germinación retardada de las semillas, el decremento en la producción de pigmentos fotosintéticos, la reducción del tamaño de la parte aérea y de la raíz son efectos tóxicos que se observan comúnmente (Chaîneau *et al.*, 1997; Adam y Duncan, 2002; Flocco *et al.*, 2002).

Se han propuesto varias hipótesis sobre los mecanismos mediante los cuales los diversos componentes de los HTP pueden ejercer su toxicidad. Con base en las observaciones de algunos autores sobre la formación de una capa de HTP en la raíz de plantas que crecen en presencia de estos contaminantes, puede esperarse daño por la disolución de membranas y

el consiguiente gasto energético para mantener la arquitectura de la raíz (en especial en contaminación reciente). Además, esta capa podría evitar el contacto adecuado de la raíz con la fase acuosa y, por ende, el abasto de nutrimentos al resto de la planta (Udo y Fayemi, 1975; Chaîneau *et al.*, 1997). Por ejemplo, cuando las plantas de cebada se hicieron crecer en suelos contaminados con 20 g de HTP kg⁻¹ de suelo, se observó que estas plantas disminuyeron su eficiencia en la utilización de agua, debido a la alta hidrofobicidad del suelo (Li *et al.*, 1997). De esta forma, se ha propuesto que la tolerancia a la sequía puede permitir a las plantas ser también tolerantes a los HTP y se recomienda como una característica agronómica deseable en plantas empleadas en la fitorremediación de compuestos orgánicos (USEPA, 2000). Una buena parte de los estudios de fitorremediación que se han revisado aquí, se llevaron a cabo con gramíneas, en particular con especies tolerantes a la sequía (p. ej. *Cynodon dactylon*, *Panicum virgatum*, *Agropyron smithii* y *Elymus canadensis*).

Otras investigaciones indican que la alta demanda biológica de oxígeno que exigiría la degradación de HTP, aun en concentraciones relativamente pequeñas como 1.5 g de HTP kg⁻¹ de suelo, agotaría el oxígeno en la columna de suelo, creando fuertes condiciones anaeróbicas que afectan negativamente el desarrollo de las raíces y de los microorganismos (Rentz *et al.*, 2003). En adición, el estrés por carencia de oxígeno también puede crearse por las pobres condiciones agronómicas que provoca la contaminación por HTP en el suelo y por la formación de capas hidrofóbicas alrededor de las raíces, pues, al igual que en el caso del agua, la difusión de oxígeno del aire puede verse impedida. Lo anterior se ha señalado como la principal causa en el retraso de la germinación de semillas en presencia de HTP (Chaîneau *et al.*, 1997; Adam y Duncan, 2002).

Autores como Harvey *et al.* (2001) propusieron que una fuente de estrés considerable para las especies vegetales bajo influencia de HPA y otros contaminantes orgánicos se originaría de la capacidad disminuida de estas células para obtener poder reductor (cofactor de las enzimas de Fase I) y, en consecuencia, el aumento de especies reactivas de oxígeno que causarían estrés oxidativo en la célula. El aumento de la actividad de enzimas relacionadas con la atenuación del estrés oxidativo (superóxido dismutasa, glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa) se detectó en una planta acuática, *Fontinalis antipyretica*, en medio con HPA (Roy *et al.*,

1994). Se ha reportado que las fracciones más fitotóxicas de los HTP son las fracciones ligeras y aromáticas (Chaîneau *et al.*, 1997). Estas fracciones fitotóxicas serían las que, al modificarse por enzimas de Fase I de manera secundaria, desencadenarían mayor estrés oxidativo. En relación con lo anterior, Mallakin *et al.* (2002) encontraron que el antraceno (un HPA) y sus derivados producidos por fotodescomposición inducen daño general, tanto al Fotosistema II, como al I de las plantas entre 0.1 y 10 mg kg⁻¹, las cuales son concentraciones relevantes para la fitorremediación de agua (rizofiltración).

En adición, es de esperarse que la saturación de la capacidad de las células para sostener el gasto energético de las enzimas de Fase II y III, también sea una fuente de estrés. Para el caso de HTP, se conoce mucho menos de las enzimas de Fase II y III y de sus genes codificantes, que podrían involucrarse en la destoxicación de estos compuestos y, como ya se mencionó antes, sólo existe información acerca del hallazgo de metabolitos de HPA, característicamente catalizados por las enzimas de conjugación (Fase II) y que, en consecuencia, es probable que puedan transportarse a través del tonoplasto por las enzimas de Fase III. En los casos de otras moléculas orgánicas que son tóxicas endógenas o exógenas (quinonas, pesticidas, herbicidas) existe mucha información que involucra a estas enzimas en su destoxicación (Jones y Vogt, 2001). Así, las enzimas de Fase II son transferasas de diversos tipos, como glucosil (119 secuencias codificantes deducidas en *A. thaliana*) y sulfotransferasas (Pflugmacher y Sandermann, 1998), de las cuales las más estudiadas son las glutatión-S-transferasas, ya que se involucran en múltiples procesos de destoxicación en la célula vegetal y se expresan ante varios tipos de estrés ambiental, como la sequía (Edwards *et al.*, 2000). Para el caso de las enzimas de Fase III, se tiene registro de los transportadores vacuolares ABC cuya función molecular es transportar diversos complejos orgánicos y organometálicos a través de las membranas mediante la hidrólisis de ATP, en especial en la membrana vacuolar para excluirlos del citoplasma y así evitar que ejerzan un efecto tóxico en la célula (Sánchez-Fernández *et al.*, 2001). Estas proteínas, cuya superfamilia también está entre las más grandes de los organismos vegetales (con 129 secuencias codificantes potenciales), son capaces de transportar moléculas orgánicas conjugadas de alto peso molecular, como lo pueden ser catabolitos derivados de la clorofila. Además, las capacidades de transporte

a través de las membranas pueden ser específicas de cada proteína de la familia para ciertos tipos de compuestos (Lu *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

- El uso de plantas para la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) es una biotecnología que ha demostrado su eficiencia en múltiples ensayos de campo. Sin embargo, se aplica sin el conocimiento básico de los mecanismos biológicos que le sostienen.
- Existen tres elementos biológicos de la fitorremediación que deben comprenderse mejor y constituirse en líneas de investigación. El primero, es la compleja red de señales establecidas entre la planta y su microflora rizosférica para el establecimiento de condiciones que favorecen la degradación de los HTP, incluso de aquellos que son altamente insolubles y recalcitrantes. El segundo, es el programa molecular que se activa en las plantas para modificar químicamente los hidrocarburos que llegan a penetrar su raíz y parte aérea, o incluso que pueda evitar que estos lleguen a las estructuras mencionadas. El tercero, es el manejo que hace la planta del estrés impuesto por los HTP sobre ella y que teóricamente puede involucrar respuestas ya conocidas ante otros tipos de estrés (p. ej. sequía y anoxigenia) y que le permite sobrevivir en ambientes contaminados por HTP y posiblemente por otros compuestos orgánicos.
- La elucidación de los mecanismos básicos involucrados en la remoción de HTP y la tolerancia a los mismos en la planta y en la rizosfera, es de gran interés para la biotecnología ambiental, con el fin de que el uso de las plantas sea más racional y, por ende, con mayores posibilidades de explotación en la remoción de HTP, de las fracciones que los componen e, incluso, de contaminantes orgánicos relacionados.

AGRADECIMIENTOS

La investigación en nuestro laboratorio se realiza con fondos del proyecto CONACyT 39961.

LITERATURA CITADA

- Aburto, J. A., N. Rojas y R. Quintero. 2001. Biotecnología. pp. 136-147. *In*: Prospectiva de la Investigación y el Desarrollo Tecnológico del Sector Petrolero al Año 2025. Instituto Mexicano del Petróleo. México, D. F.

- Adam, G. y H. Duncan. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Poll.* 120: 363-370.
- Adams-Schroeder, R. H., V. I. Domínguez-Rodríguez y L. García-Hernández. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra* 17: 159-174.
- Adler, P. R., R. Arora, A. El Ghaouth, D. M. Glenn y J. M. Solar. 1994. Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J. Environ. Qual.* 23: 1113-1117.
- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press. Burlington, MA, USA.
- Aprill, W. y R. C. Sims. 1990. Evaluation on the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-265.
- Banks, M. K., S. Pekarek, K. Rathbone y A. P. Schwab. 1997. Phytoremediation of petroleum contaminated soils: field assessment. pp. 305-308. *In*: B. C. Alleman y A. Leeson (eds.). *In situ and On-site bioremediation (Volume 3)*. Battelle Press. Columbus, OH, USA.
- Barac, T., S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J. V. Colpaert, J. Vangronsveld y D. van der Lelie. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat. Biotechnol.* 22: 583-588.
- Chaîneau, C. H., J. L. Morel y J. Oudot. 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26: 1478-1483.
- Chroma, L., M. Mackova, P. Kucerova, C. idWiesche, J. Burkhard y T. Macek. 2002. Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta Biotechnol.* 22: 35-41.
- Cornejo, J. J., F. G. Munoz, C. Y. Ma y A. J. Stewart. 1999. Studies on the decontamination of air by plants. *Ecotoxicology* 8: 311-320.
- Davis, L. C., S. Castro-Diaz, Q. Zhang y L. E. Erickson. 2002. Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 457-491.
- Diatchenko, L., S. Lukyanov, Y. C. F. Lau y P. D. Siebert. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303: 349-380.
- Diesperger, H. y H. Sandermann. 1979. Soluble and microsomal glutathione-S-transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta* 146: 643-648.
- Donnelly, P. K., R. S. Hegde y J. S. Fletcher. 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. *Chemosphere* 28: 981-988.
- Edwards, R., D. P. Dixon y V. Walbot. 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5: 193-198.
- Fiorenza, S., C. L. Oubre y C. H. Ward. 2000. *Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL, USA.
- Flocco, C. G., A. Lo Balbo, M. P. Carranza y A. M. Giulietti. 2002. Removal of phenol by alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) grown in hydroponics and its effects on some physiological parameters. *Acta Biotechnol.* 10: 43-54.
- Francova, K., M. Macková, T. Macek y M. Sylvestre. 2004. Ability of bacterial biphenyl dioxygenases from *Burkholderia* sp. LB400 and *Comamonas testosteroni* B-356 to catalyse oxygenation of *ortho*-hydroxychlorobiphenyls formed from PCBs by plants. *Environ. Poll.* 127: 41-48.
- Gallegos-Martínez, M., A. Gómez-Santos, L. González-Cruz, M. A. Montes de Oca-García, L. Yáñez-Trujillo, J. A. Zermeno Eguía Lis y M. Gutiérrez-Rojas. 2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Wat. Sci. Technol.* 42: 377-384.
- García-Cuellar, J. A., F. Arreguín-Sánchez, S. Hernández Vázquez y D. B. Lluch-Cota. 2004. Impacto ecológico de la industria petrolera en la sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia* 29: 311-319.
- González-Chávez, C., J. D'Haen, J. Vangronsveld y J. C. Dodd. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240: 287-297.
- Gramss, G., K.-D. Voigt y B. Kirsche. 1999. Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere* 38: 1481-1494.
- Grayston, S. J., S. Wang, C. D. Campbell y A. C. Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30: 369-378.
- Guédez-Mozur, C., D. de Armas-Hernández, R. Reyes-Gil y L. Galván-Rico. 2003. Los sistemas de gestión ambiental en la industria petrolera internacional. *Interciencia* 28: 528-533.
- Günther, T., U. Dornberger y W. Fritsche. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33: 203-215.
- Hall, C., P. Tharakan, J. Hallock, C. Cleveland y M. Jefferson. 2003. Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature* 426: 318-322.
- Harms, H. 1983. Uptake and conversion of three different 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cell suspension cultures of various *Chenopodiaceae*-species. *Z. Naturforsch.* 38c: 382-386.
- Harvey, P. J., B. F. Campanella, P. M. L. Castro, H. Harms, E. Lichtfouse, A. R. Schaeffner, S. Smrcek y D. Werck-Reichhart. 2001. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9: 29-47.
- Hause, B. y T. Fester. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221: 184-196.
- Hegde, R. S. y J. S. Fletcher. 1996. Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere* 32: 2471-2479.
- Heinonslao, J., K.S. Jorgensen, K. Haahtela y R. Sen. 2000. Effects of *Pinus sylvestris* root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 46: 451-464.
- Higashi, K., K. Nakashima, Y. Karasaki, M. Fukunaga y Y. Mizuguchi. 1981. Activation of benzo[a]pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. *Biochem. Int.* 2: 373-380.
- Holtrof, H., M.-C. Guitton y R. Reski. 2002. Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* 89: 235-249.
- Hutchinson, S.L., M.K. Banks y A.P. Schwab. 2001a. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403.

- Hutchinson, S.L., A.P. Schwab y M.K. Banks. 2001b. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of irrigation techniques and scheduling. *J. Environ. Qual.* 30: 1516-1522.
- Infante, C. 2001. Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de Intebios y Biorize. *Interciencia* 26: 504-507.
- Iturbe, R., R.M. Flores, C.R. Flores y L.G. Torres. 2004. TPH-contaminated Mexican refinery soil: health risk assessment and the first year of changes. *Environ. Monitor. Assess.* 91: 237-255.
- Joner, E.J., A. Johansen, A.P. Loibner, M.A. de la Cruz, O.H.J Szolar, J.M. Portal y C. Leyval. 2001. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2773-2777.
- Jones, P. y T. Vogt. 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174.
- Khatisashvili, G., M. Gordeziani, G. Kvesitadze y F. Korte. 1997. Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotox. Environ. Saf.* 36: 118-122.
- Korte, F., G. Kvesitadze, D. Ugrekheldze, M. Gordeziani, G. Khatisashvili, O. Buadze, G. Zaalishvili y F. Coulston. 2000. Organic toxicants and plants. *Ecotox. Environ. Saf.* 47: 1-26.
- Kucerová, P., C. idWiesche, M. Wolter, T. Macek, F. Zadrzil y M. Macková, 2001. The ability of different plant species to remove polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from incubation media. *Biotechnol. Lett.* 23: 1335-1359.
- Kvesitadze, G., M. Gordeziani, G. Khatisashvili, T. Sadunishvili y J. J. Ramsden. 2001. Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation. *J. Biol. Phys. Chem.* 1: 49-57.
- Li, X., Y. Feng y N. Sawatsky. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *Plant Soil* 192: 219-226.
- Liste, H. H. y M. Alexander. 2000a. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40: 7-10.
- Liste, H. H. y M. Alexander. 2000b. Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere* 40: 11-14.
- Lu, Y. P., Z. S. Li, Y. M. Drowdowicz, S. Hörtensteiner, E. Martinoia y P. A. Rea. 1998. AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* 10: 267-282.
- Mallakin, A., T. S. Babu, D. G. Dixon y G. M. Greenberg. 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-2 (Duckweed). *Environ. Toxicol.* 17: 462-471.
- Mawdsley, J. L. y R. G. Burns. 1994. Inoculation of plants with *Flavobacterium* species results in altered rhizosphere enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 26: 871-882.
- Meagher, R. B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Op. Plant Biol.* 3: 153-162.
- Mejaré, M. y L. Bülow. 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 19: 67-73.
- Mishra, V., R. Lal y Srinivasan. 2001. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 133-166.
- Nedunuri, K. V., R. S. Govindaraju, M. K. Banks, A. P. Schwab y Z. Chen. 2000. Evaluation of phytoremediation for field-scale degradation of total petroleum hydrocarbons. *J. Environ. Eng.* 126: 483-490.
- Negishi, T., M. Nakano, S. Kobayashi y C. H. Kim. 1987. Isolation and determination of benzo[a]pyrene glucuronide and sulfate conjugates in soybean leaves. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 294-298.
- Newman, L. A. y C. M. Reynolds. 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Op. Biotechnol.* 15: 225-230.
- Pflugmacher, S. y H. Sandermann. 1998. Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 49: 507-511.
- Quiñones-Aguilar, E. E., R. Ferrera-Cerrato, F. Gavi-Reyes, L. Fernández-Linares, R. Rodríguez-Vázquez y A. Alarcón. 2003. Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia* 37: 585-594.
- Rentz, J. A., B. Chapman, P. J. J. Álvarez y J. L. Schnoor. 2003. Stimulation of hybrid poplar growth in petroleum-contaminated soils through oxygen addition and soil nutrient amendments. *Int. J. Phytorem.* 5: 57-72.
- Rentz, J. A., P. J. J. Álvarez y J. L. Schnoor. 2004. Repression of *Pseudomonas putida* phenanthrene-degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environ. Microbiol.* 6: 574-583.
- Rivera-Cruz, M. C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volke-Haller, R. Rodríguez-Vázquez y L. Fernández-Linares. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. *Terra* 20: 423-434.
- Roy, S., J. Pellinen, C. K. Sen y O. Hänninen. 1994. Benzo[a]anthracene and benzo[a]pyrene exposure in the aquatic plant *Fontinalis antipyretica*: uptake, elimination and the responses of biotransformation and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 29: 1301-1311.
- Salt, D. E., R. D. Smith e I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668.
- Sánchez-Fernández, R., T. G. E. Davies, J. O. D. Coleman y P. A. Rea. 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem.* 276: 30231-30244.
- Sandermann, H. 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* 17: 82-84.
- Schwaner, N. E. y N. Kroer. 2001. Effect of plant species on the kinetics of conjugal transfer in the rhizosphere and relation to bacterial metabolic activity. *Microb. Ecol.* 42: 458-465.
- Shaw, L. J. y R. G. Burns. 2003. Biodegradation of organic pollutants in the rhizosphere. *Adv. Appl. Microbiol.* 53: 1-60.
- Siciliano, S. D. y J. J. Germida. 1998. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environ. Rev.* 6: 65-79.
- Siciliano, S. D., H. Goldie y J. J. Germida. 1998. Enzymatic activity in root exudates of dahurian wild rye (*Elymus dauricus*) that degrades 2-chlorobenzoic acid. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5-7.
- Siciliano, S. D., N. Fortin, A. Mihoc, G. Wisse, S. Labelle, D. Beaumier, D. Ouellette, R. Roy, L. G. Whyte, M. K. Banks, P. Schwab, K. Lee y C. W. Greer. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2469-2475.

- Siciliano, S. D., J. J. Germida, K. Banks y C. W. Greer. 2003. Changes in microbial community and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 483-489.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1995. Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2905-2914.
- Stiborová, M., H. H. Schmesier y E. Frei. 2000. Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a comparative study. *Phytochemistry* 54: 353-362.
- Top, E. M. y D. Springael. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Op. Biotechnol.* 14: 262-269.
- Udo, E. J. y A. A. A. Fayemi. 1975. The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn. *J. Environ. Qual.* 4: 537-540.
- Ugrekheldze, D., F. Korte y G. Kvesitadze. 1997. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves. *Ecotox. Environ. Saf.* 37: 24-29.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). 2000. Introduction to phytoremediation. Cincinnati, OH, USA.
- Van der Lelie, D., J. P. Schwitzguébel, D. J. Glass, J. Vangronsveld y A. Baker. 2001. Assessing phytoremediation's progress in the United States and Europe. *Environ. Sci. Technol.* 35: 446A-452A.
- Van der Trenck, K. T. y H. Sandermann. 1978. Metabolism of benzo[a]pyrene in cell suspension cultures of parsley (*Petroselinum hortense*, Hoffm.) and soybean (*Glycine max* L.). *Planta* 141: 245-251.
- Van der Trenck, T. y H. Sandermann. 1980. Oxygenation of benzo[a]pyrene by plant microsomal fractions. *FEBS Lett.* 119: 227-231.
- Van der Trenck, T. y H. Sandermann. 1981. Incorporation of benzo[a]pyrene quinones into lignin. *FEBS Lett.* 125: 72-76.
- Walker, T. S., H. P. Bais, E. Grotewold y J. M. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132: 44-51.
- Wania, F. y D. Mackay. 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 30: 390A-396A.
- Warshawsky, D., M. Radike, K. Jayasimhulu y T. Cody. 1988. Metabolism of benzo[a]pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152: 540-544.
- Watanabe, M. E. 1997. Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environ. Sci. Technol.* 31: 182A-186A.
- Wilson, M. S., J. B. Herrick, C. O. Jeon, D. E. Hinman y E. L. Madsen. 2003. Horizontal transfer of *phnAc* dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guild from adjacent soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2172-2181.
- Xu, W., S. Bak, A. Decker, S. M. Paquette, R. Feyereisen y D. W. Galbraith. 2001. Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 272: 61-74.