

COMETABOLISMO EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

COMETABOLISM IN THE BIODEGRADATION OF HYDROCARBONS

M. García-Rivero^{1,*} y M. R. Peralta-Pérez²

¹Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Laboratorio de Catálisis Enzimática, División de Ciencias Químicas y Bioquímicas, Av. Tecnológico s/n, Col. Valle de Anáhuac, C.P. 55210, Ecatepec de Morelos, Edo. de México, México.

²Instituto Tecnológico Superior de Alvarado, División de Ciencias Básicas, Escollera s/n Col. La Trocha, C.P. 95 250, Alvarado Ver., México.

Recibido 4 de Septiembre 2006; Aceptado 4 de Abril 2008

Resumen

El cometabolismo microbiano, es decir, la transformación de un compuesto, llamado cosustrato, en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento o por células en reposo en ausencia del sustrato de crecimiento es parte fundamental de la eliminación biológica de compuestos xenobioticos en el ambiente. En este trabajo se hace especial énfasis en la biodegradación de hidrocarburos, debido a su amplio uso y distribución como contaminantes. Se hace un análisis de los alcances y limitaciones de modelos que explican la cinética del cometabolismo, basados en la ecuación de Monod o Michaelis-Menten, modelando el consumo del sustrato y cosustrato de manera independiente; se incluyen modelos que explican el efecto tóxico del cosustrato o una inhibición de tipo competitiva. Finalmente, se describe la aplicación del cometabolismo para la biorremediación *in situ*, cuyos avances se han centrado básicamente en la transformación del metil-terbutil-éter (MTBE) y en hidrocarburos alifáticos clorados (HACs) entre los cuales destaca el tricloroetileno (TCE).

Palabras clave: cometabolismo, hidrocarburos, cinética, enzimas.

Abstract

Microbial cometabolism, i.e. transformation of a non-growth substrate, namely cosubstrate, in the obligate presence of a growth substrate by growing cells, or by resting cells in the absent of a growth substrate, is a significant part of the total biodegradative activity toward xenobiotic compounds. In this work the importance of cometabolism in the biodegradation of hydrocarbons in the environment is discussed, due to hydrocarbons are the most common groundwater and soil pollutants. Varieties of kinetic equations, Monod or like Michaelis-Menten expressions that have been used to describe cometabolism are discussed; these models assumed that biodegradation takes place as single substrate and the interaction of growth- and non-growth substrate are described as toxic effect or competitive inhibition. Finally, the applicability of the cometabolism for *in situ* bioremediation is discussed, Methyl tert-Butyl Ether- and halogenated hydrocarbons are the most widespread studied compounds.

Keywords: cometabolism, hydrocarbons, kinetics, enzymes.

1. Introducción

Varios compuestos sintéticos y orgánicos, que son tanto de importancia ambiental como toxicológica son degradados por cometabolismo. El término cometabolismo define la transformación de un compuesto llamado cosustrato, en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento o por células en reposo en ausencia del sustrato de crecimiento (Perry, 1979). El cosustrato o cometabolito no aporta energía, carbono o algún otro nutriente y en consecuencia es incapaz de soportar la replicación celular. El sustrato de crecimiento actúa como un donador de electrones que proporciona poder reductor y energía para el crecimiento y el

mantenimiento celular (Janke y Fristche, 1985; Criddle, 1993). Se debe aclarar que la presencia del cosustrato no induce la actividad de las enzimas involucradas en su transformación, ya que se trata de una transformación colateral a la degradación del sustrato el cual sí induce la actividad enzimática.

Los primeros estudios acerca del cometabolismo datan de finales de los 50s, cuando Leadbetter y Foster (1959) observaron que *Pseudomona methanica* oxidaba el etano pero no podía ocuparlo como fuente de carbono. Este fue el primero de una serie de artículos del grupo de Foster, quienes subsecuentemente observaron que esta bacteria, al crecer en un medio con metano, podía transformar diferentes hidrocarburos. Dichos

* Autor para la correspondencia: E-mail: mgarcia@tese.edu.mx
Tel. 50 00 23 00 ext. 2227; Fax: 50 00 23 00 ext. 2304

estudios iniciales concluyeron que *P. methanica* no podía crecer utilizando el etano debido a su incapacidad para asimilar los productos de oxidación en sus vías metabólicas centrales. Foster en 1962 definió a este fenómeno “co-oxidación”.

Por otro lado, en 1963 Jensen observó que *Pseudomonas* era capaz de crecer en monocloroacetato y deshalogenar tricloroacetato, sin usar a éste último como fuente de carbono para el crecimiento. Con estos resultados Jensen generalizó el término co-oxidación para incluir otro tipo de reacciones, como las deshalogenaciones, y lo llamó “co-metabolismo”. El término actualmente se ha extendido para incluir diversas reacciones como son hidroxilaciones, desnitración, desaminación, hidrólisis, acilaciones o rompimiento de enlaces éter (Alexander, 1999).

En el presente trabajo se hace una revisión del estado del arte del cometabolismo en hidrocarburos y de los modelos fundamentales que son utilizados para explicar la cinética del cometabolismo, tanto la microbiana como la enzimática, con el objetivo de determinar sus alcances y limitaciones. Finalmente se analiza la aplicación del cometabolismo en el campo de la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.

2. Cometabolismo de compuestos xenobióticos en el ambiente.

Los avances en la síntesis química han conducido a la producción a gran escala de diferentes de compuestos orgánicos, que tienen un destino muy variable en el ambiente. La mayoría de estos compuestos son parecidos a algún compuesto natural, de modo que pueden ser degradados por el metabolismo microbiano. Otros compuestos sintéticos tienen estructuras moleculares o secuencias de enlaces químicos no reconocibles por los microorganismos, éstos son los llamados xenobióticos, (*xeno*: del griego extraño; Schwarzenbach y col., 1993). Estos compuestos pueden ser parcialmente metabolizados o resistentes a la biodegradación, es decir, recalcitrantes. Algunos ejemplos de compuestos xenobióticos recalcitrantes son anillos aromáticos altamente condensados, el polietileno, los plásticos, la fracción de asfaltenos en el petróleo crudo, que permanecen en el ambiente como contaminantes (Huessemann, 1997). Los compuestos xenobióticos que usualmente son resistentes a la degradación por especies biológicas individuales, pueden mineralizarse por secuencias catabólicas complementarias, que se llevan a cabo entre múltiples especies microbianas, en donde la transformación inicial es por cometabolismo (Fritsche, 1985).

Los compuestos finales de la transformación cometabólica pueden ser muy variados dando como resultado especies menos peligrosas, o bien, más

susceptibles a la degradación biológica. Sin embargo, puede ocurrir la formación de compuestos que se acumularán en el ambiente si no son intermediarios de otras rutas catabólicas, o si no están presentes microorganismos capaces de utilizarlos como sustrato (Alexander, 1999).

El cometabolismo de xenobióticos en ambientes naturales ocurre a tasas lentas, porque las poblaciones microbianas son pequeñas y no se incrementan en respuesta a la introducción de esos compuestos en el ambiente. Adicionalmente, en ambientes naturales, no es fácil de determinar la ocurrencia del cometabolismo debido a las diversas reacciones catabólicas que tienen lugar en los microorganismos interrelacionados y la dificultad para comprobar los efectos positivos que puede ejercer un compuesto sobre el consumo de otro. Estas limitantes se pueden superar en estudios a nivel de laboratorio mediante el uso de cultivos axénicos o consorcios microbianos con los cuales se pueden lograr altas concentraciones de biomasa y con una mezcla adecuada de sustrato-cosustrato se puede mejorar la tasa del cometabolismo. Adicionalmente, la capacidad de cepas silvestres puede servir como una herramienta para la construcción de cepas con nuevos potenciales de degradación para compuestos recalcitrantes xenobióticos.

Los hidrocarburos son los contaminantes mayoritarios debido a su utilización masiva como combustibles y solventes, entre otros usos. Algunos hidrocarburos que son transformados por cometabolismo se listan en la Tabla 1, entre los más sencillos se puede mencionar a los trimetilalcanos, componentes de la gasolina, que son degradados por cometabolismo, aunque existen bacterias especializadas que pueden utilizarlos como sustratos (Solano-Serena y col., 2001).

Los primeros estudios de la biodegradación de Metil-terbutil-éter (MTBE) (Steffan y col., 1997) y de tricloroetileno (TCE) (Nelson y col., 1986) proporcionaron evidencias sobre una transformación cometabólica de estos compuestos, posteriormente se demostró que pueden ser utilizados como sustratos por bacterias especializadas. Bruns y col. (2001) identificaron bacterias metilotrofas que utilizan al MTBE como única fuente de carbono y energía; aparentemente esta habilidad en *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Kane y col., 2007) es debida a la transferencia natural de un plásmido que codifica dicha capacidad. En el caso del TCE, Sun y Wood (1997) reportaron el uso de una mutante de *Burkholderia cepacia* G4 que expresa constitutivamente las enzimas que lo degradan.

Entre los hidrocarburos alifáticos clorados (HACs), el TCE es el que ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos debido a su amplio uso y distribución como contaminante; no obstante se sabe que los solventes clorados de uno o dos carbonos son transformados por cometabolismo (Arp y col. 2001).

Tabla 1. Hidrocarburos transformados por cometabolismo.

Cosustrato	Sustrato	Microorganismo	Referencia
n-alcanos	acetato	<i>Candida cloacae</i>	Uchio y Shiio (1972)
MTBE	Dietil éter	<i>Graphium</i> sp.	Hardison y col. (1997)
	Lactato y glicerol	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	Johnson y col. (2004)
	Pentano	Consorcio microbiano	Dupasquier y col. (2002)
Cloroformo	Butano	Flora nativa de agua subterránea y sólidos de acuíferos.	Kim y col. (1997).
1,1,1-Tricloroetano			
1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etileno	Bifenilo	<i>Pseudomonas acidovorans</i>	Hay y Focht (1998)
p, p' - diclorodifenil-metano	difenilmetano	<i>Hydrogenomonas</i> sp.	Focht y Alexander (1970)
1,1-difenil-2,2,2-tricloro-etano			
Tolueno	Fenantreno		Ortiz y col. (2003)
	Hidrocarburos del petróleo	Población microbiana del suelo	Ortiz y col. (2006)
HAP	n-hexadecano	<i>Nocardia corallina</i>	Jamison y col. (1969)
	HPAs	Bacterias	Bouchez y col. (1995)
4-metil-benzo-tiofeno	1-metil naftaleno	<i>Pseudomonas</i>	Saftic y col. (1992)
5-metilbenzotiofeno			
6-metilbenzotiofeno			
2,3-dimetilbenzotiofeno			
7-metilbenzotiofeno			
Aroclor 1254	BPCs	<i>Acinetobacter</i> sp.	Koler y col. (1988)

Hasta 1990, no existían reportes de cultivos axénicos microbianos que utilizaran hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) de cuatro o más anillos como única fuente de carbono y energía. En los años posteriores surgió información sobre la transformación de fluoranteno (Bouchez y col., 1995) y pireno (Jiménez y Bartha, 1996), e incluso existen algunos datos de transformaciones cometabólicas de estos compuestos por bacterias (Heitkamp y Cerniglia, 1988; Ho y col., 2000). Aunque los reportes de la utilización de HPAs más complejos (cinco o más anillos) son escasos, se tiene información de que sólo son degradados mediante transformaciones cometabólicas por bacterias tales como *Beijerinckia* y hongos como *Phanerochaete chrysosporium* (Kanaly y Bartha, 1999).

Los benzotiofenos y los bifenilos policlorados (PCBs) y se cometabolizan lentamente por bacterias (Koler y col., 1988; Saftic y col., 1992), produciendo principalmente clorobenzoatos como intermediarios (Furukawa, 1979) que pueden ser degradados por rutas metabólicas convencionales de compuestos aromáticos.

3. Cinética del cometabolismo.

Es conveniente aclarar que en un sistema donde coexisten el sustrato y el cosustrato, la tasa de consumo del cosustrato (cometabolismo) está ligada a la tasa de consumo del sustrato y tiende a disminuir con el agotamiento del sustrato o con la acumulación de productos tóxicos, según se muestra en la Fig. 1. En estas condiciones, la tasa del cometabolismo

depende de la energía generada por el decaimiento celular producido por el metabolismo endógeno, i.e. proteólisis que ocurre después del agotamiento de cofactores (Criddle, 1993).

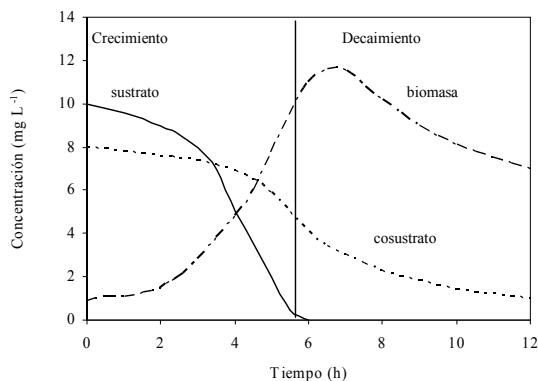


Fig. 1. Comportamiento típico de la transformación cometabólica de un cosustrato, en presencia y ausencia del sustrato. Los valores usados en el modelo de Criddle (1993) son $K_s = 1 \text{ mg L}^{-1}$, para el sustrato y el cosustrato; $K_{maxs} = 15 \text{ g sustrato g}^{-1} \text{ biomasa d}^{-1}$, $K_{maxc} = 2 \text{ g cosustrato g}^{-1} \text{ biomasa d}^{-1}$, $T_{cs} = 0.3 \text{ g cosustrato g}^{-1} \text{ sustrato}$, $T_{cb} = 1 \text{ g cosustrato g}^{-1} \text{ biomasa}$, $Y_{x/s} = 1.5 \text{ g biomasa g}^{-1} \text{ sustrato}$, $b = 0.5 \text{ d}^{-1}$. Datos tomados de Criddle (1993).

Partiendo de la descripción anterior, el tipo de modelo matemático que puede aplicarse dependerá del sistema de estudio, es decir, si ocurre un consumo simultáneo por que coexisten el sustrato y el cosustrato, o bien si la transformación del cosustrato ocurre por células en reposo en ausencia

del sustrato. La primera aproximación para explicar el cometabolismo es la ecuación de Monod, que permite describir la cinética de transformación del cosustrato por células en reposo, de manera independiente se puede aplicar para modelar el consumo de sustrato por células en crecimiento, en ausencia del cosustrato. En cualquiera de los dos casos, se hace uso de la ecuación en su forma tradicional para explicar el consumo de un sustrato único que no es tóxico usando sistemas de estudio que son independientes.

Para un cultivo por lotes, de manera general la ecuación es expresada, tanto para el sustrato como para el cosustrato en eventos independientes como:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{K_{\max} X S}{K_s + S} \quad (1)$$

Las variables se definen en la sección de nomenclatura.

Smith y col. (1998) utilizaron la Ec. (1) en su forma integrada para explicar el cometabolismo de TCE por un cultivo mixto metano-oxidante en reposo (en ausencia de metano). Para la aplicación de este método los autores despreciaron el decaimiento celular y las pérdidas de TCE debido a la volatilidad, además de suponer equilibrio entre la fase líquida y la fase gaseosa en el sistema. De otra forma la Ec. (1) no puede integrarse. Los resultados obtenidos con los valores de K_s y $K_{\max}$ reportados por Smith y col. (1998) se muestran en la Fig. 2., donde se puede observar que el consumo sigue el comportamiento típico de un sustrato único.

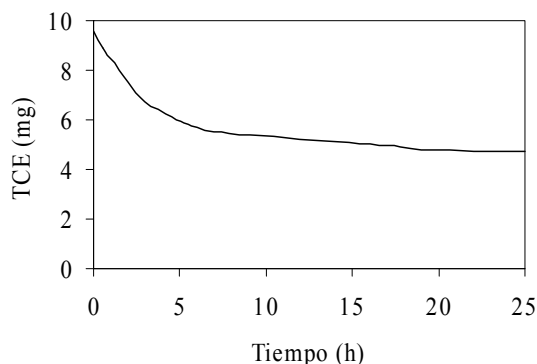


Fig. 2. Consumo de TCE por un cultivo metano-oxidante en reposo. Los valores de la constantes de la ecuación integrada de Monod son $K_{\max}/K_s = 0.35 \text{ L mg}^{-1} \text{ TCE d}^{-1}$ y $T_{cb} = 0.21 \text{ g TCE g}^{-1} \text{ biomasa}$. Datos tomados de Smith y col., (1998).

La ecuación tipo Monod se ha utilizado también en estudios comparativos de cultivos microbianos, por ejemplo, Liu y col. (2001) la emplearon con la finalidad de estimar K_s y $K_{\max}$ para la selección de cultivos puros butano-oxidantes que cometabolizan MTBE. Los microorganismos fueron crecidos en presencia de butano y posteriormente expuestos al MTBE. Adicionalmente uno de los principales productos de biodegradación: el alcohol

terbutílico, fue removido para evitar su efecto tóxico. Frascari y col. (2003) aplicaron ecuación la de Monod para estimar la K_s durante el cometabolismo del cloroformo, cis-dicloroetileno (c-DCE) y TCE, en un estudio comparativo de la habilidad de consorcios microbianos propano-oxidantes. Los microorganismos fueron expuestos de manera alternada al propano y a los hidrocarburos alifáticos clorados, de manera que en el sistema no estuvieron presentes de manera simultánea el sustrato y el cosustrato.

Las aplicaciones antes citadas se realizaron en condiciones ideales de cultivo, ya que la ecuación tipo Monod no explica el efecto de: i) la pérdida de actividad microbiana por el agotamiento del sustrato utilizado para el crecimiento, ii) la disminución de actividad microbiana por acumulación de productos tóxicos, iii) inhibición del consumo del sustrato por el cosustrato y viceversa y iv) decaimiento celular en ausencia del sustrato. Para incluir el efecto de las variables citadas es necesario recurrir a modelos más complejos, entre los cuales podemos citar los siguientes.

Gupta y col. (1996) modelaron la cinética del cometabolismo de cloroformo por microorganismos metanógenos utilizando acetato como sustrato. El cloroformo inhibe el consumo de acetato en un ambiente metanógeno y por tanto el cometabolismo del cloroformo se modeló como la suma de dos términos: debida al consumo del sustrato inhibitorio (representado por la ecuación modificada de Haldane) y debida al decaimiento celular (representado por la ecuación de Monod):

$$r_c = \frac{KC}{K_{sc} + C + C \left(\frac{C}{K_{ic}} \right)^n} + \frac{K'C}{K_{sc} + C} \quad (2)$$

Las variables se definen en la sección de nomenclatura.

El primer término de la Ec. (2) representa el consumo del cosustrato a expensas de la energía generada por el consumo del sustrato. El segundo termino de la Ec. (2) representa el consumo del cosustrato a expensas de la energía generada por el decaimiento celular que sucede cuando el sustrato se agota o en altas concentraciones de cosustrato, que pueden inhibir el consumo del sustrato. La constante K' tiene un valor menor que el de K por que el decaimiento celular proporciona una energía menor a la generada por el consumo del sustrato (Gupta y col., 1996).

En la Fig. 3 se muestra la tasa de cometabolismo de cloroformo obtenida con la Ec. (2) a partir de los parámetros reportados por Gupta y col., (1996). El perfil obtenido es explicado de la siguiente manera: en bajas concentraciones de cloroformo, la tasa de consumo depende de la energía obtenida por el consumo de acetato, mientras que en concentraciones altas de cloroformo, éste inhibe el consumo de acetato y por tanto el

cometabolismo depende del consumo de biomasa celular.

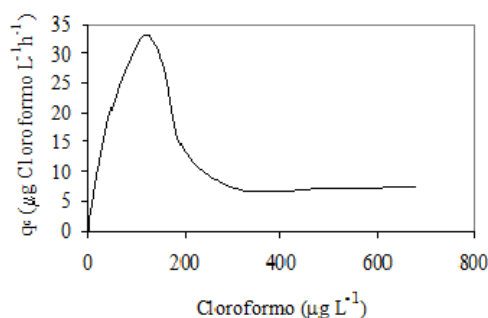


Fig. 3. Tasa de cometabolismo de cloroformo por microorganismos metanógenos crecidos en acetato. La tasa del cometabolismo se supone asociada al consumo de sustrato y al decaimiento celular, los valores de las constantes para la Ec. (2) son $K = 55 \mu\text{g cloroformo L}^{-1}\text{h}^{-1}$, $K_s = 100 \mu\text{g cloroformo L}^{-1}$, $K_i = 160 \mu\text{g cloroformo L}^{-1}$, $n = 8$ y $K' = 8.5 \mu\text{g cloroformo L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Datos tomados de Gupta y col., (1996).

En la Tabla 2 se muestran diferentes modelos matemáticos que pretenden explicar el consumo simultáneo del sustrato y del cosustrato. Destaca el modelo propuesto por Chang y col. (1993). En el modelo se acopla la transformación del cosustrato al consumo del sustrato y la biomasa, incorporando la pérdida de actividad debido al decaimiento endógeno.

La interacción entre la transformación del cosustrato y el consumo del sustrato típicamente se ha definido como una inhibición competitiva que puede tener variantes como son inhibición competitiva cruzada o de tipo mixto del sustrato sobre el cosustrato (Kim y col., 2002a). En la Tabla 2 se muestra el modelo de inhibición competitiva propuesto por Hao y col., (2002) para explicar el cometabolismo de 4-clorofenol, el modelo incluye inhibición por el sustrato (fenol) y el cosustrato. Es importante considerar que en ciertos casos el consumo simultáneo depende de la relación de concentración, por ejemplo Hao y col., (2002) encontraron que el cometabolismo de 4-clorofenol en presencia de fenol, por *Acetivobacter sp.*, ocurre cuando la relación inicial es de 50:200 mg/l, respectivamente.

A diferencia de esta propuesta, Verce y col., (2001) plantearon un modelo de inhibición competitiva que permite explicar además la disminución de la tasa del cometabolismo que ocurre a altas concentraciones de sustrato; el modelo fue aplicado para describir el cometabolismo de cloruro de vinilo (CV) por células en reposo crecidas en eteno. La inhibición cruzada observada en la transformación de vapor de MTBE en presencia de pentano en un biofiltro, fue modelada con una ecuación general de balance (Dupasquier y col.,

2002), que permite explicar el consumo simultáneo del sustrato y el cosustrato.

Un patrón poco común de inhibición es la completa inactivación de la transformación del cosustrato, *cis*-1,2-dicloroeteno (*cis*-DCE) en presencia de CV (Verce y col., 2002). El modelo propuesto (mostrado en la Tabla 3) para explicar esta inactivación se basa en la ecuación de Monod e incluye coeficientes de inactivación y de inhibición.

Adicionalmente, el cosustrato puede mostrar un efecto tóxico sobre la actividad microbiana (Hyman y col., 1995; Shingleton y col., 2001), que puede atenuarse en sistemas ternarios: por ejemplo, con una mezcla de fenol y glutamato de sodio, como sustratos, se promueve el cometabolismo del 4-clorofenol que es muy tóxico e inhibe de manera competitiva el crecimiento celular usando fenol (Wang y Loh, 2000). Una respuesta similar fue observada por Verce y Freedman (2001) en el cometabolismo de CV en presencia de etano, donde al adicionar eteno se incrementa la tasa de degradación de CV. No obstante que la inhibición del crecimiento por sustrato es el patrón común, se ha sugerido (Verce y col., 2002) que el agotamiento del poder reductor durante el cometabolismo de *cis*-DCE es una causa prioritaria de la inactivación del consumo del *cis*-DCE, más que la acumulación de intermediarios tóxicos.

El estudio de la cinética del cometabolismo es fundamental en la evaluación de los coeficientes de la transformación microbiana, sea con el fin de seleccionar cultivos o condiciones ambientales. Adicionalmente, el estudio de la cinética del cometabolismo proporciona los parámetros necesarios para el diseño y escalamiento de los tratamientos de biorremediación.

Por otra parte, identificar las condiciones en las cuales ocurre la inhibición o inactivación es importante para garantizar el funcionamiento del sistema: la provisión de una cantidad suficiente de sustrato cuando ocurre una inhibición competitiva puede permitir superar ese efecto (Kim y Hao, 1999) y el uso de sistemas multisustrato puede eliminar el efecto de inactivación.

4. Enzimas del cometabolismo

El mecanismo de acoplamiento entre el cometabolismo del cosustrato y consumo del sustrato puede diferir dependiendo del sustrato y de las especies microbianas involucradas. En general las transformaciones cometabólicas ocurren cuando la enzima de un microorganismo que crece a partir de un sustrato "A" reconoce al compuesto "B" como sustrato y lo transforma en un producto. La transformación es generalmente limitada por que las siguientes enzimas de la ruta metabólica suelen tener una especificidad mayor y no reconocen al producto de "B" como sustrato (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 2. Modelos cinéticos que explican algunos casos del cometabolismo

Modelo	Ventajas-desventajas	Referencia
Consumo simultáneo sustrato-cosustrato $q_s = k_{\max S} \left\{ \frac{S}{K_{sC} + S} \right\}$ $q_C = (T_{cs} + k_{\max C}) \left\{ \frac{C}{KC + C} \right\}$ $\mu = Y_{x/s} q_s - b - \frac{q_C}{T_{cb}}$	El modelo no distingue entre la muerte celular debida a toxicidad y la inactivación debida a la pérdida de poder reductor.	Chang y col., (1993)
Inhibición competitiva $\frac{dS}{dt} = \frac{-K_{\max S} X S}{K_{sS} + S + \frac{S^2}{K_i}}$ $\frac{dX}{dt} = Y_{x/s} \left(\frac{-dS}{dt} \right) + bX$ $\frac{dC}{dt} = \frac{-K_{\max C} X C}{K_{sC} + C + \frac{C^2}{K_i}}$	La ecuación que describe el consumo del sustrato no explica adecuadamente el comportamiento con altas concentraciones de fenol. El modelo usado es capaz de describir la tendencia de la transformación del cosustrato.	Hao y col., (2002)
Inhibición competitiva y efecto de concentraciones elevadas de sustrato $-\frac{dS}{dt} = \left[K_{ss} - K_{inC} (C_0 - C) + K_{IN} S_0 e^{\frac{S_0}{K_{ss}}} \right. \\ \left. - K_{inS} (S_0 - S) \left(1 - e^{\frac{-C_0}{C_0 + S}} \right) \right] \left[\frac{S}{K_{ss} \left(1 + \frac{C}{K_{IC}} \right) + S} \right] X$ $-\frac{dC}{dt} = \left(\frac{K_{\max C}}{K_{\max S}} \right) \left[K_{\max S} - K_{inC} (C_0 - C) + K_{IN} S_0 e^{\frac{S_0}{K_{ss}}} \right. \\ \left. - K_{in} (S_0 - S) \left(1 - e^{\frac{-C_0}{C_0 + S}} \right) \right] \left[\frac{C}{K_{sC} \left(1 + \frac{C}{K_{IS}} \right) + C} \right] X$ $-\frac{dX}{dt} = Y_{x/s} \left(\frac{-dS}{dt} \right) + bX$	El modelo hace distinción entre la inhibición competitiva y la disminución de la transformación del cosustrato a altas concentraciones de sustrato.	Verce y col., (2001)
Inhibición cruzada $r_s = K_{\max S} X \frac{S}{S + K_{ss} + \left(1 + \frac{C}{K_{sC}} \right)}$ $r_C = K_{\max C} X \frac{C}{C + K_{sC} + \left(1 + \frac{S}{K_{ss}} \right)} \left(\frac{S}{S + K_{ss}} \right)$	Se requieren determinaciones relativamente precisas de los parámetros cinéticos y físicos para minimizar errores en las estimaciones	Dupasquier y col., (2002)
Inhibición competitiva e inactivación	Los términos de inhibición competitiva por sí mismos, no describen satisfactoriamente las interacciones observadas entre el sustrato y el cosustrato.	Verce y col., (2002)

$-\frac{dS}{dt} = \left[k_{\max} - k_{inS} \left(\frac{C_0}{C_0 + K_I} \right) \right] \left(\frac{S}{K_{sS} \left(1 + \frac{C}{K_{sC}} \right) + S} \right) X$ $-\frac{dC}{dt} = (k_{\max C} - k_{inS} (C_0 - C)) \left(\frac{\left(\frac{K_s}{K_s + S} \right) \left(\frac{C}{K_{sC} \left(1 + \frac{C}{K_{sS}} \right) + C} \right)}{X} \right)$		
---	--	--

Nota: los casos en los que fueron aplicados los modelos se describen en el texto.

Entre las enzimas más comúnmente asociadas al cometabolismo predominan las monooxigenasas, que tienen una dependencia estricta de oxígeno molecular, y catalizan la oxidación de *n*-alcanos. Estas enzimas actúan reduciendo el O₂ e incorporando un átomo de oxígeno en el alcano, produciendo un alcohol primario que posteriormente puede oxidarse hasta CO₂, o bien quedarse en un aldehído o alcohol intermedio. Existen varios ejemplos de compuestos oxidados por monooxigenasas; el cometabolismo de TCE es catalizado por una amoníaco monooxigenasa no específica (Ely y col., 1995b; Hyman y col., 1995), en tanto que el dicloroetileno y PCBs se transforman cometabólicamente por una metano monooxigenasa (Lontoh y Semrau, 1998). Así mismo, la transformación de las cadenas laterales de tolueno, etilbenceno y xileno es catalizada por una monooxigenasa fúngica (Prenafeta-Boldú y col., 2002). El MTBE puede ser oxidado cometabólicamente por una monooxigenasa que es inducida por *n*-alcanos en condiciones aeróbicas (Hyman y col., 1988 y Johnson y col., 2004), o por el citocromo P450, monooxigenasa no-hémica, que participa en la primera reacción de biodegradación del MTBE (Fiorenza y Riafi, 2003). La oxidación de alquenos clorados es catalizada por una alqueno monooxigenasa y la oxidación de fenoles clorados es catalizada por una tolueno-o-xileno monooxigenasa (Ryoo y col., 2001).

Otra enzima que puede actuar con una amplia variedad de sustratos es la dioxigenasa. En general las dioxigenasas reducen el O₂ para incorporar oxígeno molecular a los alcanos produciendo un hidroperóxido inestable que se reduce a un alcohol y agua con la participación de NADPH₂. Posteriormente el alcohol es oxidado a un aldehído y un ácido graso. Un ejemplo es la tolueno dioxigenasa, que oxida cometabólicamente al TCE una vez que el tolueno se agota en el medio (Shingleton y col., 2001). Entre los hidrocarburos alifáticos clorados, el TCE es el más ampliamente estudiado, pero existen varios reportes sobre la degradación cometabólica de otros HACs, por

ejemplo el 1,1-dicloro-1-propeno, y 1,1-dicloroeteno son degradados por una tolueno dioxigenasa (Arp y col., 2001).

Otros compuestos menos estudiados, con los cuales se han detectado otras actividades enzimáticas relacionadas con el cometabolismo, son los derivados del *ter*-butil éter, que son hidrolizados por una esterasa termoestable e inducible, la cual muestra afinidad por una amplia gama de sustratos: MTBE, alcohol *ter*-butílico y otros *ter*-butil ésteres (Smith y col., 2003). Los compuestos organofosforados sintéticos, por su parte, pueden ser biotransformados por un rompimiento reductivo del enlace S-C mediante una deshidrogenasa-oxidoreductasa (Girbal y col., 2000).

4.1. Cinética enzimática del cometabolismo

El consumo del sustrato y el cosustrato, por células en reposo, puede explicarse por el modelo de Michaelis-Menten cuando la degradación ocurre como en un sistema donde sólo está presente el sustrato o el cosustrato, la ecuación general es la siguiente:

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (3)$$

Las variables se definen en la sección de nomenclatura.

Algunas aplicaciones de la ecuación son las siguientes: Hori y col. (2005) utilizaron el Modelo de Michaelis-Menten asumiendo que el TCE es transformado por la tolueno dioxigenasa. Los resultados obtenidos con suspensiones de células crecidas en tolueno, demostraron que el modelo de Michaelis-Menten es adecuado para explicar la actividad de la tolueno dioxigenasa durante el cometabolismo de TCE y que no todas las cepas que poseen la actividad tolueno dioxigenasa cometabolizan el TCE. Prenafeta-Boldú y col. (2002) emplearon la ecuación en un estudio de la caracterización de la capacidad de *Cladophialophora* sp. para degradar BTEX por una monooxigenasa. Los autores reportaron que el modelo de Michaelis-Menten proporciona una buena descripción de la

cinética de biodegradación de BTEX cuando se utilizan células resuspendidas en buffer de fosfatos. Los bajos valores de K_m obtenidos en el consumo de tolueno, etilbenceno y xileno sugieren que el microorganismo puede utilizarse en la eliminación de esos compuestos en biofiltros o “bio-venteo” en suelos.

Lonton y Semrau, (1998) aplicaron la ecuación de Michaelis-Menten para determinar los parámetros cinéticos de degradación de TCE por una metano oxigenasa producida por *Methylosinus trichosporium* OB3b. Dado que la ecuación no puede aplicarse cuando se emplean compuestos tóxicos, los autores usaron concentraciones de TCE menores a las consideradas como tóxicas. En ensayos realizados con células en reposo crecidas en metano, encontraron que la concentración del cobre es determinante en la oxidación de sustratos por microorganismos metanotrófos que poseen actividad metano oxigenasa; adicionalmente los bajos valores de K_m estimados sugieren que el microorganismo podría aplicarse en casos de degradación de mezclas de solventes clorados que requieran largos periodos de tratamiento.

Cuando el sustrato y el cosustrato son consumidos de forma simultánea en una mezcla sustrato-cosustrato se puede suponer que compiten por el mismo sitio activo de la enzima y por tanto aplicar un modelo de inhibición competitiva:

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_m \left(1 + \left(\frac{I}{K_i} \right) \right) + S} \quad (4)$$

En la Ec. (4) el sustrato puede inhibir el consumo del cosustrato y viceversa. Las variables se definen en la sección de nomenclatura.

La Ec. (4) fue aplicada por Hori y col. (2005) que reportaron una inhibición competitiva de la tolueno dioxigenasa en el consumo de tolueno en presencia de TCE. Si bien la inhibición competitiva es la interacción característica entre el sustrato y el cosustrato, en altas concentración de cosustrato puede ocurrir la inactivación de la enzima, por ejemplo Hyman y col. (1995) en ensayos con células en reposo observaron una completa inactivación de la actividad amonio-oxidante en presencia de 4.2 μmol de TCE, en concentraciones menores de TCE sólo ocurre una inhibición competitiva.

Una alternativa para determinar el tipo de inhibición es emplear la ecuación de Michaelis-Menten linealizada y posteriormente determinar los coeficientes de inhibición por un análisis de regresión no-lineal de los datos. Aplicando esta metodología Kim y col. (2002b) determinaron los parámetros cinéticos y el coeficiente de inhibición durante el cometabolismo de hidrocarburos alifáticos clorados por células en reposo crecidas en butanol.

En interacciones sustrato-cosustrato más complejas se puede modelar el cometabolismo incluyendo inhibición competitiva e inhibición

cruzada (Hao y col., 2002). Para explicar el cometabolismo de TCE, Ely y col. (1995a) describieron un modelo que incorpora la *inhibición* enzimática (causada por la presencia del cometabolito), la *inactivación* (resultado de la toxicidad de un cometabolito), y la *recuperación* (asociada a la síntesis bacteriana de enzimas en respuesta a la inactivación). Posteriormente el grupo de Ely (Ely y col., 1997) empleó el modelo para explicar la inhibición de la oxidación de amoníaco e inactivación enzimática por efecto de diferentes HACs (TCE, 1,1-dicloroetileno, cloroformo, 1,2-dicloroetano y tetracloruro de carbono).

5. Aplicación del cometabolismo para biorremediación *in situ*

Entre los primeros reportes de aplicación en campo se encuentran los trabajos del grupo de McCarty, quienes a principios de los 90's propusieron la biorremediación de agua subterránea contaminada con TCE en un sistema de “bio-venteo”, como sustrato emplearon metano suministrado en una mezcla con aire (Atlas y Bartha, 2002). El grupo de McCarty observó que en algunos casos la adición del cosustrato intensificaba la degradación del TCE, pero en otros casos el mismo tratamiento no daba los resultados esperados.

Los resultados que obtuvo el grupo de McCarty no son sorprendentes, porque se requiere de un intenso trabajo para determinar la factibilidad de aplicación del cometabolismo *in situ*. Algunas variables que deben determinarse son: i) identificar y explicar los factores limitantes, de manera que sea posible mantener el cometabolismo durante el tiempo requerido para el tratamiento. ii) Buscar un sustrato que proporcione la mayor tasa de cometabolismo; iii) Definir la forma adecuada de dosificación del sustrato con respecto al tiempo y concentración; iv) Determinar las concentraciones de cosustrato que pueden ser tratadas y vi) Evitar la estimulación de una flora microbiana indeseable al aplicar el sustrato.

Algunos de los trabajos que han sido orientados a esclarecer algunos de los planteamientos antes citados son los siguientes, Jitnuyanont y col. (2001) en microcosmos de agua subterránea y material de un acuífero contaminado con 1,1,1-tricloroetano demostraron que la bioaumentación con cultivos enriquecidos, que utilizan butano como fuente de carbono, puede ser una buena alternativa para un tratamiento *in situ*.

Dupasquier y col., (2002) demostraron que el MTBE puede ser cometabolizado por una bacteria-pentano oxidante en un biofiltro de 2.4 L empacado con vermiculita, sugirieron además que el sistema puede mejorarse incrementando la concentración de biomasa activa. Arp y col., (2002) emplearon como sistema modelo columnas de vidrio empacadas con el material de un acuífero para obtener información

sobre la tasa de reacción y mantenimiento del cometabolismo para modelar el consumo de HACs. Los parámetros cinéticos obtenidos en cultivo batch son similares a los que se han reportado previamente, pero se requiere probar el sistema en un cultivo continuo y conocer la distribución espacial de los microorganismos.

Kim y col. (2004) desarrollaron un estudio de la aplicación *in situ* del cometabolismo de HACs que incluyó pruebas de transporte o movilidad de los compuestos, bioestimulación de la flora nativa y determinación de las tasas de consumo de HACs. Los resultados obtenidos demostraron que la bioestimulación permitió incrementar la tasa de consumo de HACs y determinar la degradabilidad de los compuestos ensayados, sugiriendo que el tratamiento es una alternativa de bajo costo para el tratamiento *in situ*.

Entre los estudios piloto *in situ* que han sido reoportados para comprobar la factibilidad del cometabolismo en campo se pueden mencionar los siguientes: Azizian y col. (2005) realizaron pruebas en un acuífero contaminado para evaluar el cometabolismo de HACs, demostrando que la bioestimulación de la flora nativa es efectiva para promover la degradación de HACs por microorganismos que oxidan tolueno, se determinó que el 1-butino inhibe la actividad de la orto-tolueno monooxigenasa, por tanto controlando esos factores se podrían mejorar los resultados obtenidos. Kou y col. (2004) demostraron en un acuífero el cometabolismo aerobio de TCE usando como sustrato primario tolueno; se logró degradar un 90% del TCE cuando el tolueno fue inyectado en estado gaseoso por medio de una corriente de aire para evitar la saturación de los puertos de inyección por acumulación de biomasa. El cometabolismo del TCE fue más eficiente cuando el tolueno es aplicado en concentraciones menores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. En un trabajo similar, Mysona y Hughes (2003) propusieron un sistema de aspersión de aire y extracción de vapor para el tratamiento de suelo y agua subterránea contaminados con solventes clorados. Cuando se realizó la inyección continua de propano, acoplada a la aspersión de aire, en el sistema se lograron degradaciones significativas de los hidrocarburos clorados.

Como se señaló anteriormente el cometabolismo aeróbico de HACs ha sido ampliamente estudiado, lo que ha permitido su aplicación en campo mediante el uso de consorcios comerciales. "CI-solutions" dispone de una tecnología consistente en aplicar un consorcio microbiano y suministrar dextrosa como sustrato primario. Esta tecnología fue exitosamente probada en suelo y agua contaminada de una planta de producción (CI-solutions).

Finalmente, los avances en el estudio del cometabolismo de hidrocarburos se han centrado básicamente en MTBE y HACs, en estos últimos

destaca el TCE. Se dispone de modelos que pueden predecir el cometabolismo en ausencia o presencia del sustrato incluyendo el efecto tóxico de los compuestos. Estos modelos son la base para estudios comparativos o de selección de cepas y contaminantes y extienden sus aplicaciones a las pruebas piloto *in situ* para modelar la cinética y predecir resultados.

Nomenclatura

b	constante de decaimiento endógeno, d^{-1} .
C	concentración de cosustrato, g L^{-1} .
I	concentración del inhibidor, g L^{-1} .
K	tasa máxima de consumo del cosustrato debida al consumo del sustrato, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.
K'	tasa máxima de consumo del cosustrato debida al decaimiento celular, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.
K _i	constante de inhibición, g L^{-1} .
k _{in}	constante específica de inactivación, $\text{L g}^{-1} \text{biomasa d}^{-1}$.
K _{IN}	constante específica de incremento debido a la presencia del sustrato, $\text{L g}^{-1} \text{biomasa d}^{-1}$.
K _m	constante de Michaelis, g L^{-1} .
K _{max}	tasa específica máxima de transformación, $\text{gg}^{-1} \text{biomasa h}^{-1}$.
K _s	constante de saturación, g L^{-1} .
n	orden de inhibición.
q	tasa específica de consumo, $\text{gg}^{-1} \text{biomasa h}^{-1}$.
r	tasa de consumo, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.
S	concentración de sustrato, g L^{-1} .
t	tiempo, h.
T _{cs}	capacidad de transformación del cosustrato debida al consumo del sustrato, $\text{g cosustrato g}^{-1} \text{sustrato}$.
T _{cb}	capacidad de transformación del cosustrato por la biomasa en ausencia de metabolismo endógeno, $\text{g cosustrato g}^{-1} \text{biomasa}$.
v	tasa específica de consumo del cosustrato, $\text{gg}^{-1} \text{biomasa h}^{-1}$.
V _{max}	tasa específica máxima de consumo, $\text{g g}^{-1} \text{biomasa h}^{-1}$.
X	concentración de biomasa activa, g L^{-1} .
Y _{x/s}	rendimiento máximo de biomasa, $\text{g biomasa g}^{-1} \text{sustrato}$.

Subíndices

0	al inicio
S	sustrato
C	cosustrato

Referencias

- Alexander M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press. U.S.A.
- Arp, D., Bottomley, P., Cuiffetti, L., Giovannoni, S., Semprini, L. y Williamson, K. (2002). Aerobic cometabolism of chlorinated aliphatic hydrocarbon compounds with butane-grown microorganisms. Hazardous

- Research Center, Western Region. Project I-OSU-02. (<http://www.hsrb.org/wr-aerobic.html>)
- Arp, D., Yeager, C. y Hyman, M. (2001). Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation* 12, 81-103.
- Atlas, R.M y Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Addison Wesley. España.
- Azizian, M.F., Istok, J.D. y Semprini L. (2005). Push-pull test evaluation of the in situ aerobic cometabolism of chlorinated ethenes by toluene-utilizing Microorganisms. *Water Science & Technology* 52, 35-40.
- Bouchez M., Blanchet D. y Vandecasteele. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 156-164.
- Bruns, M.A., Hanson, J.R., Mefford, J. y Scow, K.M. (2001). Isolate PM1 populations are dominant and novel methyl tert-butyl ether-degrading bacterial in compost biofilter enrichments. *Environmental Microbiology* 3, 220-225.
- Cl-solutions. Aerobic cometabolism of halogenated aliphatic hydrocarbons. (<http://www.cl-solutions.com/pages/products-clout.html>).
- Criddle C.S. (1993). The kinetics of cometabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 1048-1056.
- Chang, W., Voice, T.C. y Criddle, C.S. (1993). Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 1057-1065.
- Dupasquier, D., Revah, S. y Auria, R. (2002). Biofiltration of Methyl tert-Butyl Ether Vapors by Cometabolism with Pentane: Modeling and Experimental Approach. *Environmental Science Technology* 36, 247 - 253.
- Ely, R.L., Hyman, M.R., Arp, D.J., Guenther, R.B. y Williamson, K.J. (1995a). A cometabolic kinetics model incorporating enzyme inhibition, inactivation, and recovery: II. Trichloroethylene degradation experiments. *Biotechnology and Bioengineering* 46, 232-245.
- Ely, R.L., Williamson, K.J., Guenther, R.B., Hyman, M.R. y Arp, D.J. (1995b). A cometabolic kinetics model incorporating enzyme inhibition, inactivation, and recovery: I. Model development, analysis, and testing. *Biotechnology and Bioengineering* 46, 218-231.
- Ely, R.L., Williamson, K.J. Hyman, M.R. y Arp, D.J. (1997). Cometabolism of chlorinated solvents by nitrifying bacteria: Kinetics, substrate interactions, toxicity effects, and bacterial response. *Biotechnology and Bioengineering* 54, 520-534.
- Fiorenza, S. y Rifai, H. (2003). Review of MTBE biodegradation and bioremediation. *Bioremediation Journal* 7, 1-35.
- Focht, D. D. y Alexander, M. (1970). Bacterial degradation of diphenylmethane, a DDT model substrate. *Applied Microbiology* 20, 608-611.
- Frasconi, D., Kim, Y., Dolan, M. y Semprini, L. (2003). A kinetics study of aerobic propane uptake and cometabolic degradation of chloroform, *cis*-dichloroethylene and trichloroethylene in microcosms with groundwater/aquifer solids. *Water Science Soil Pollution* 3, 285-298.
- Fritzsche, J.D. (1985). Nature and significance of Microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of Basic Bacteriology* 25, 603-619.
- Furukawa, K., Tomikuza, N. y Kamibayashi, A. (1979). Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 301-310.
- Girbal, L., Hilaire, D., Leduc, S., Delery, L., Rols, J. y Lindley, L. (2000). Reductive cleavage of Demeton-S-Methyl by *Corynebacterium glutamicum* in cometabolism of more readily metabolizable substrate. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1202-1204.
- Gupta, M., Suidan, M. y Sayles, G. (1996). Modeling kinetics of chloroform cometabolism in methanogenic and sulfate-reducing environments. *Water Science Technology* 34, 403-410.
- Hao O.J., Kim, M.H., Seagren, E.A. y Kim, H. (2002). Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species. *Chemosphere* 46, 797-807.
- Hardison, L.K., Curry, S.S. Ciuffetti, L.M. y Hymann, M.R. (1997). Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl ter-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3059-3067.
- Hay, A.G. y Focht, D.D. (1998). Cometabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene by *Pseudomonas acidovorans* M3Gy grown on biphenyl. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2141-2146.
- Heitkamp, M.A. y Cerniglia, C.E. (1988). Mineralization of Polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1612-1614.
- Ho, Y., Jackson, M., Yang, Y., Mueller, J.G., Pritchard, P.H. (2000). Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria

- isolated from PAH-contaminated soils and sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24, 110-112.
- Hori, K., Mii, J., Morono, Y., Tanji, Y. y Unno, H. (2005). Kinetic analyses of trichloroethylene cometabolism by toluene-degrading bacteria harboring a tod homologous gene. *Biochemical Engineering Journal* 26, 59-64.
- Huesemann M.H. (1997). Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils: limitations in bioavailability or inherent recalcitrance? *Bioremediation Journal* 1, 27-39.
- Hyman, M.R. Murton, I.B. y Arp, D.J. (1988). Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes and alkynes. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3187-3190.
- Hyman, M., Russell, A., Ely, R., Williamson, K. y Arp, D. (1995). Inhibition, inactivation and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Biotechnology Bioengineering* 61, 1480-1487.
- Jamison, V. W., Raymond, R. L. y Hudson, J. O. (1969). Microbial hydrocarbon co-oxidation. III. Isolation and characterization of an α,α' -dimethyl-cis,cis-muconic acid-producing strain of *Nocardia corallina*. *Applied Microbiology* 17, 853-856.
- Janke, D. y Fristche, W. (1985). Nature and significance of Microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of Basic Microbiology* 25, 603-61
- Jitnuyanont, P., Sayavedra-Soto, L. y Semprini, L. (2001). Bioaugmentation of butane-utilizing microorganisms to promote cometabolism of 1,1,1-trichloroethane in groundwater microcosms. *Biodegradation* 12, 11-22.
- Jiménez, I. y Bartha, R. (1996). Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 2311-2316.
- Johnson, E., Smith, C., O'Reilly, K., y Hyman, M. (2004). Induction of methyl tertiary butyl ether (MTBE)-Oxidizing Activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1023-1030.
- Kanally, R.A. y Bartha R. (1999). Cometabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil. *Environmental and Toxicology Chemistry* 18, 2186-2190.
- Kane, S.R., Chakicherla, A.Y., Chain, P.S., Schmidt, R., Shin, M., Legler, T., Scow, K., Larimer, F., Lucas, S.M., Richardson, P.M. y Hristova, K.R. (2007). Whole-Genome Analysis of the Methyl *tert*-Butyl Ether-Degrading Beta-Proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1. *Journal of Bacteriology* 189, 1931-1945.
- Kim, Y., Semprini, L. y Arp D.J. (1997). Aerobic cometabolism of chloroform and 1,1,1-trichloroethane by butane-grown microorganisms. *Bioremediation Journal* 2, 135-148.
- Kim, Y., Arp D.J. y Semprini, L. (2002a). A combined method for determining inhibition type, kinetic parameters, and inhibition coefficients for aerobic cometabolism of 1,1,1-trichloroethane by a butane-grown mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 77, 569-576.
- Kim, Y., Arp D.J. y Semprini, L. (2002b). Kinetic and inhibition studies for the aerobic cometabolism of 1,1,1-trichloroethane, 1,1-dichloroethylene, and 1,1-dichloroethane by a butane-grown mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 80, 498-508.
- Kim, M., Hao, O. (1999). Cometabolic degradation of chlorophenols by *Acinetobacter* species. *Water Research* 33, 562-574.
- Kim, Y., Istok, J.D., y Semprini, L. (2004). Push-pull tests for assessing in situ aerobic cometabolism. *Ground Water* 42, 329-337.
- Koler, H.P., Koler-Stabu, D. y Focht, D. (1988). Cometabolism of polychlorinated biphenyls: enhanced transformation Arochlor 1254 by growing bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1940-1945.
- Kou, M., Liang, K., Han, Y. y Fan, K. (2004). Pilot studies for in-situ aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene-vapor as the primary substrate. *Water Research* 38, 4125-4134.
- Leadbetter, E.R. y Foster, J.W. (1959). Oxidation products formed from gaseous alkanes by the bacterium *Pseudomonas methanica*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 491-492.
- Liu, C., Speitel, G., y Georgiou, G. (2001). Kinetics of methyl *t*-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure culture of butane-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2197-2201
- Lontoh, S y Semrau, H. (1998). Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1106-1114.
- Mysona, E S, y Hughes, W D. (2003). Field-scale remediation of PCE and TCE in ground water using air sparging and propane injection. Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds; Monterey, CA; USA.
- Nelson, M., Montgomery, O., O'Neill y Pritchard. (1986). Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate.

- Applied and Environmental Microbiology* 52, 383-384.
- Ortiz I., Auria R., Sigoillot J.C., Revah, S. (2003) Enhancing phenanthrene bio-mineralization in a polluted soil using gaseous toluene as a cosubstrate. *Environmental Science Technology* 37, 805- 810.
- Ortiz, I., Velasco, J.A., Revah, S. (2006) Effect of toluene as cosubstrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. *Journal of Hazardous Materials* 131, 112-117.
- Perry J.J. (1979). Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiology Reviews* 43, 59-72.
- Prenafeta-Boldú, F.X., Vervoort, J., Grotenhuis, J.T. y Groenestijn. (2002). Substrate interaction during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons and the fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2660-2665.
- Ryoo, D., Shim, H., Arengi, P., Barbieri, P. y Wood, T. (2001). Tetrachloroethylene, trichloroethylene, and chlorinated phenols induce toluene- o-xylene monooxygenase activity in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Applied Microbiology Biotechnology* 56, 545-549.
- Saftic, S., Fedorak, P.M. y Anderson, J.T. (1992). Diones, sulfoxides and sulfones from the aerobic cometabolism of methylbenzothiophenes by *Pseudomonas* strain BT1. *Environmental and Science Technology* 26, 1759-1764.
- Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M. e Imboden D.M. (1993). *Biological transformations reactions*. En: *Environmental Organic Chemistry*. pp. 491-494. Wiley-Interscience Publication. E.E.U.A.
- Shingleton, J., Applegate, B., Baker, A. Saylor, G. y Bienkowski, P. (2001). Quantification of toluene dioxygenase induction and kinetic modeling of TCE cometabolism by *Pseudomonas putida* TVA. *Biotechnology and Bioengineering* 76, 341-380.
- Smith, L., McCarty, P. y Kitanidis, P. (1998). Spreadsheet method for evaluation for biochemical reaction rate coefficients and their uncertainties by weighted nonlinear least-squares analysis of integrated Monod Equation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2044-2050.
- Smith, L., Reylli, K.T., y Hyman, M.R. (2003). Characterization of the initial reactions during the cometabolic oxidation of Methyl *ter*-butyl ether by propane-grown *Mycobacterium vaccae* JOB5. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 796-804.
- Solano-Serena, F. Marchal, R. Vandecasteele, J.P. (2001) Biodegradation of Gasoline in the Environment: From Overall Assessment to the Case of Recalcitrant Hydrocarbons. *Oil and Gas Science and Technology* 56, 479-498.
- Steffan, R. J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C. W. y Zhang, D. (1997). Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *ter*tert-butyl ether, ethyl *ter*tert-butyl ether, and *ter*tert-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4216-4222.
- Sun, A.K., y Wood T.K. (1997). Trichloroethylene mineralization in a fixed-film bioreactor using a pure culture expressing constitutively toluene ortho-monooxygenase. *Biotechnology and Bioengineering* 55, 674-685.
- Uchio, R. y Shiio, I. (1972). Tetradecane 1,14-dicarboxylic acid production from n-hexadecane by *Candida cloacae*. *Agriculture and Biological Chemistry* 36, 1389-1397.
- Verce, M., Gunsch, A., Danko, A. y Freedman, D. (2002). Cometabolism of *cis*-1,2-dichloroethene by aerobic cultures grown on vinyl chloride as primary substrate. *Environmental and Science Technology* 36, 2171-2177.
- Verce, M.F., Freedman, D. (2001). Modeling the kinetics of vinyl chloride cometabolism by an ethane-grown *Pseudomonas* sp. *Biotechnology and Bioengineering* 71, 274-285.
- Verce, M., Ulrich, R.y Freedman, D. (2001). Transition from Cometabolic to Growth-Linked Biodegradation of Vinyl Chloride by a *Pseudomonas* sp. Isolated on Ethene. *Environmental Science Technology* 35,4242-4251.
- Wang, S-J. y Loh, K-Ch. (2000). Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of a conventional carbon source. *Biotechnology and Bioengineering* 68, 437-447.