



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Ingeniería genética aplicada en biorremediación

Alumno/a: **Sofía Gómez Fernández**

Junio, 2021



UNIVERSIDAD
DE JAÉN



Trabajo Fin de Grado

Ingeniería genética aplicada en biorremediación

Sofía Gómez Fernández

Jaén, Junio de 2021.

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. INGENIERÍA GENÉTICA.....	6
2.1. Técnicas de modificación genética	6
2.2. Ingeniería genética con CRISPR/Cas9.....	8
2.3. Sistemas basados en <i>Agrobacterium</i>	10
3. BIORREMEDIACIÓN.....	12
3.1. Técnicas de biorremediación ex situ	13
3.1.1. Biopilas.....	14
3.1.2. Hileras	15
3.1.3. Biorreactor.....	16
3.1.4. Land Farming	18
3.2. Técnicas de biorremediación in situ.....	19
3.2.1. Biorremediación mejorada	19
3.2.1.1. Bioventing.....	19
3.2.1.2. Bioslurping.....	20
3.2.1.3. Biosparging.....	21
3.2.1.4. Fitorremediación	22
3.2.2. Biorremediación intrínseca.....	24
3.3. Barrera reactiva permeable	25
4. EMPLEO DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE PARA LA MITIGACIÓN DE CONTAMINANTES	26
4.1. Relación ecológica de los microorganismos en la biorremediación	29
4.2. Productos químicos agrícolas: herbicidas, pesticidas y fertilizantes	29
4.3. Contaminantes peligrosos a base de colorantes	30

4.4. Metales pesados potencialmente tóxicos	31
4.5. Petróleo y compuestos aromáticos	32
4.6. Bifenilos policlorados	34
4.7. Fenazinas	35
5. CONCLUSIONES	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

La ingeniería genética representa uno de los mayores avances en la degradación de los contaminantes, su aplicación en la biorremediación ha conllevado una mejora en la eficacia de la restauración de los ambientes contaminados con diferentes tipos de contaminantes.

En esta revisión se estudia el papel que presentan los organismos modificados genéticamente (OMG) en la mitigación de los contaminantes, así como la reducción de los efectos que causan los contaminantes al medio ambiente.

ABSTRACT

Genetic engineering represents one of the greatest advances in the degradation of pollutants, its application in bioremediation has led to an improvement in the effectiveness of the restoration of environments contaminated with different types of pollutants.

This review studies the role of genetically modified organisms (GMOs) in the mitigation of pollutants, as well as the reduction of the effects that pollutants on the environment.

1. INTRODUCCIÓN.

La rápida industrialización, el aumento de las actividades antropogénicas, las prácticas agrícolas modernas y los métodos defectuosos de eliminación de residuos han aumentado las concentraciones de contaminantes elementales en el medio ambiente.

El reconocimiento de los peligros ecológicos y para la salud humana ha llevado al desarrollo de varias tecnologías para su remediación (Eapen y Souza, 2004). Sin embargo, debido al coste prohibitivo de algunas de estas tecnologías, la atención se ha desviado hacia el desarrollo de tecnologías alternativas/complementarias como la biorremediación (Schneegurt, 2001).

Desde la identificación del ADN como unidad de la herencia y la base del dogma central de la biología molecular (Crick, 1970) de que el ADN produce ARN y el ARN produce proteínas, los científicos han realizado experimentos y métodos para comprender cómo el ADN controla la herencia. Con el descubrimiento de herramientas de biología molecular como las enzimas de restricción, la secuenciación del ADN y la clonación del ADN, los científicos se dedicaron rápidamente a realizar experimentos para modificar el ADN cromosómico en células y animales (Lanigan *et al.*, 2020).

2. INGENIERÍA GENÉTICA.

La ingeniería genética es el uso de tecnología de biología molecular para modificar la/s secuencia/s de ADN en genomas. Aquí describimos los principios de la ingeniería genética, con el foco puesto sobre las metodologías de principal aplicación en la biorremediación.

2.1. Técnicas de modificación genética.

La biotecnología se utiliza comúnmente para referirse a los nuevos métodos de ingeniería genética de organismos mediante el uso de ADN recombinante o ADNr (rDNA su acrónimo en inglés es *Recombinant DNA*). El término OMG (GMO, es el acrónimo en inglés de *Genetically Modified organism*) se usa para referirse a un organismo modificado genéticamente, que ha sido diseñado utilizando ADNr. El término OVM (LMO, es el acrónimo en inglés de *Living Modified Organism*), organismo vivo modificado, se refiere a un organismo

modificado genéticamente (GE es el acrónimo en inglés de *Genetically Engineered*) que está vivo, como una fruta fresca, vegetales o una semilla que ha sido creada utilizando ADNr (Lemaux, 2008).

Hay muchos tipos de modificaciones genéticas que pueden realizarse en el genoma. La capacidad de apuntar específicamente a la ubicación del genoma ha ampliado nuestra capacidad para realizar cambios, incluyen “knockouts” (deleciones de secuencias de ADN), “knockins” (inserciones de secuencias de ADN) y reemplazos (sustitución de secuencias de ADN por secuencias exógenas). Las deleciones cortas en el genoma se pueden utilizar para eliminar elementos reguladores que anulen la expresión génica (Allan *et al.*, 2019), activar la expresión génica (Min *et al.*, 2019) o cambiar la estructura/función de las proteínas mediante el cambio de las secuencias de codificación (Xiong *et al.*, 2018).

La inserción de nueva información genómica se puede utilizar para introducir diversos elementos genéticos. Al igual que las deleciones genómicas pueden utilizarse para cambiar la función del gen, los “knockins” pueden usarse para bloquear la función de los genes insertando genes reporteros fluorescentes, de tal manera que eliminen el gen en el punto de inserción (Mizunashi *et al.*, 2018; van Hummel *et al.*, 2016). También es posible introducir genes reporteros de proteínas fluorescentes sin anular el gen objetivo (Gu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2013). Al igual que las proteínas fluorescentes pueden utilizarse para etiquetar proteínas y células, las etiquetas epitópicas cortas pueden utilizarse para etiquetar proteínas para su detección con anticuerpos (Yang *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2017).

El reemplazo de secuencias de ADN en el genoma puede utilizarse para lograr dos propósitos al mismo tiempo, el bloqueo de la función de un gen y activar la función de un nuevo gen como el lacZ reportero (Lai *et al.*, 2015).

Las sustituciones de secuencias de gran tamaño son posibles con la tecnología de células madre embrionarias (ES, es el acrónimo en inglés de *Embryonic Stem*) de ratón, como el reemplazo del locus de inmunoglobulina de ratón por el locus de inmunoglobulina humana para producir un ratón “humanizado” (Macdonal *et al.*, 2014). Además, los reemplazos muy pequeños de nucleótidos individuales pueden utilizarse para modelar mutaciones puntuales

que se sospecha que causan enfermedades humanas (Cui *et al.*, 2000; de Ligt *et al.*, 2013; Lubeck *et al.*, 2014).

Un tipo especial de reemplazo de secuencia de ADN es el alelo condicional. Los alelos condicionales permiten la expresión normal del gen hasta que la Cre recombinasa, específica del sitio, elimina un exón crítico flanqueado por loxP (locus de recombinación) para producir un exón "floxado" (flanqueado por loxP). Por lo tanto, la delección del exón crítico provoca la aparición de un codón de terminación prematuro en la transcripción del ARNm, desencadenando su descomposición y su incapacidad para producir una proteína (Skarnes *et al.*, 2011; Popp *et al.*, 2016).

Otras recombinasas específicas del sitio, como la FLP, la Dre y la Vika, que funcionan según el mismo principio también se han aplicado a modelos de ratón (Anastassiadis *et al.*, 2009; Karimova *et al.*, 2018; Raymond *et al.*, 2007). Los knockins de recombinasa pueden diseñarse para anular el gen endógeno o preservar su función (Cacioppo *et al.*, 2016; Pettibone *et al.*, 2019). Una variación del alelo condicional es el alelo inducible, que permanece en silencio hasta que su expresión es activada por Cre recombinasa (Raymond *et al.*, 2007).

2.2. Ingeniería genética con CRISPR/Cas 9.

La edición del genoma con nucleasas específicas del sitio permite llevar a cabo experimentos de genética inversa, ingeniería del genoma e integración de transgenes dirigidos de manera eficiente y precisa. Consiste en la introducción de roturas de doble hebra en el ADN (DSBs, es el acrónimo en inglés de *Double-Strand Breaks*) mediante una nucleasa de ingeniería, que estimula los mecanismos de reparación del ADN celular (Bortesi y Fischer, 2014).

Hasta 2013, las herramientas de edición del genoma dominantes eran las nucleasas de dedos de zinc (ZFNs, es el acrónimo en inglés de *Zinc Finger Nucleases*) (Kim *et al.*, 1996) y las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs, es el acrónimo en inglés de *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) (Christian *et al.*, 2010). Ambas son proteínas de fusión artificiales que comprenden un dominio de unión al ADN fusionado con el dominio de la nucleasa inespecífica de la enzima de restricción FokI. Se han

utilizado con éxito en muchos organismos, incluidas las plantas (revisado en Jankele y Svoboda, 2014; Palpant y Dudzinski, 2013).

El sistema más utilizado actualmente es el sistema de repetición palindrómica corta agrupada regularmente interespaciada (CRISPR)/Cas9 (asociado a CRISPR) en clústeres de tipo II de *Streptococcus pyogenes* (CRISPR, es el acrónimo en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) (Jinek et al., 2012).

El sistema CRISPR/Cas forma parte del sistema inmunológico adaptativo de bacterias y arqueas, protegiéndolas contra los ácidos nucleicos invasores como los virus, al escindir el ADN extraño de manera dependiente de la secuencia. La inmunidad se adquiere mediante la integración de fragmentos cortos del ADN invasor conocidos como espaciadores entre dos repeticiones adyacentes en el extremo proximal de un locus CRISPR. Las matrices CRISPR, incluidos los espaciadores, se transcriben durante encuentros posteriores con ADN invasor y se procesan en pequeños ARN CRISPR (crRNA, es el acrónimo en inglés de *CRISPR RNA*), que se combinan con el ARN CRISPR transactivante (tracrRNA, es el acrónimo en inglés de *Transactivating CRISPR RNA*) para activar y guiar la nucleasa Cas9 (Barrangou et al., 2007). Esto escinde secuencias homologas de ADN de doble hebra conocidas como protoespaciadores en el ADN invasor (Barrangou et al., 2007).

Un requisito previo para la escisión es la presencia de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM, es el acrónimo en inglés de *Protospacer-adjacent Motif*) posterior del ADN diana, que normalmente tiene la secuencia 5'-NGG-3' (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012) pero menos frecuentemente NAG (Hsu et al., 2013). La especificidad viene dada por la denominada "secuencia semilla", aproximadamente 12 bases antes de la PAM, que debe coincidir entre el ARN y el ADN diana (Fig. 2.1).

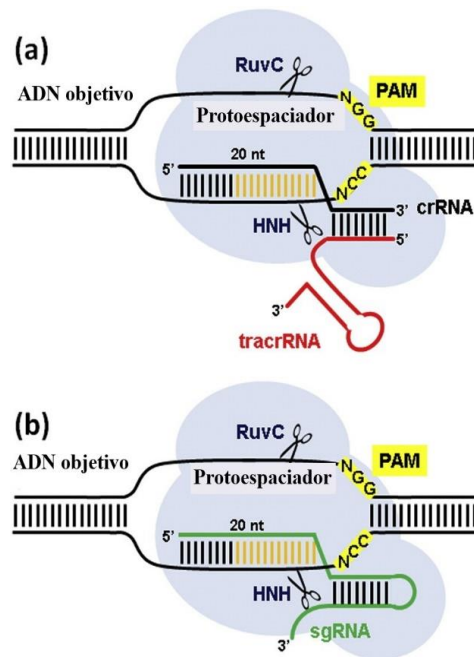


Figura 2.1. Escisión de ADN guiado por ARN mediante Cas9. (a) En el sistema nativo, la proteína Cas9 (azul claro) está guiada por una estructura formada por un ARN CRISPR (crRNA, en negro), que contiene un segmento de 20 nucleótidos (nt) que determina la especificidad del objetivo, y un ARN CRISPR trans-activador (tracrRNA, en rojo), que estabiliza la estructura y activa a Cas9 para que corte el ADN objetivo (protoespaciador). La presencia de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM, en amarillo), es decir, una secuencia NGG (o menos frecuentemente NAG) posterior del ADN diana. Entre los 20 nt del ARN que determinan la especificidad del objetivo, la denominada secuencia semilla de aproximadamente 12 nt (en naranja) posterior del PAM se considera especialmente importante para el emparejamiento entre el ARN y el ADN diana. (b) Cas9 puede reprogramarse para escindir el ADN mediante una única molécula de ARN guía (gRNA, en verde), una quimera generada por la fusión del extremo 3' del crRNA con el extremo 5' del tracrRNA (Bortesi y Fischer, 2014).

2.3. Sistemas basados en *Agrobacterium*.

La especie bacteriana gramnegativa fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens* es un agente causante de la enfermedad de la agalla en la corona de las plantas, que va acompañada de la formación de tumores en las raíces de las plantas (Krennek *et al.*, 2015). *Agrobacterium* emplea una estrategia de virulencia única para inducir tumores; entrega la molécula de ADN virulento (ADN transferido o ADN-T) a las células vegetales donde finalmente se integra en el genoma del huésped (Chilton *et al.*, 1977).

La capacidad de *Agrobacterium* para integrar su propio ADN en el genoma del huésped está determinada predominantemente por un plásmido Ti (inductor

de tumores) (Gelvin, 2003). Dos regiones distintas albergadas por el plásmido Ti, designadas como región ADN-T y región vir, son esenciales para la inducción de tumores. Estas regiones contienen genes que codifican para las proteínas involucradas en la biosíntesis de las hormonas de tipo vegetal y de la opina (Zupan *et al.*, 2000).

En las plantas transformadas, la expresión de los genes de ADN-T induce un desequilibrio hormonal que conduce a la hiperproliferación celular y a la producción de opina. Las opinas son la única fuente de nitrógeno y energía de la *Agrobacterium*, lo que proporciona una ventaja selectiva sobre los parásitos competidores (Chumakov, 2013). La región vir del plásmido Ti no se transfiere a la célula huésped. Contiene siete loci (virA, virB, virC, virD, virE, virD y virG) que codifican la mayoría de las proteínas de virulencia (proteínas vir) necesarias para el transporte del ADN-T y la integración en el genoma del huésped (Zupan y Zambryski, 1995).

Inmediatamente después de su descubrimiento, la estrategia de virulencia única de *Agrobacterium* atrajo la atención de los biotecnólogos de plantas y condujo a la adaptación de *Agrobacterium* como una herramienta sin precedentes para la transformación genética de plantas. Esta adaptación implicó el desarrollo de un sistema de vectores binarios que consiste en un plásmido Ti desarmado y sin región de ADN-T y un plásmido pequeño y fácilmente manejable al que se asigna la región de ADN-T desprovista de genes de *Agrobacterium* (Gelvin, 2003). Dado que la región del ADN-T se determina solo delimitando los bordes izquierdo y derecho y no por ninguna otra secuencia de ADN, se puede colocar prácticamente cualquier tipo de ADN entre los bordes y utilizarlo para la transformación de la planta.

La transformación estable de plantas mediada por *Agrobacterium* es heredable en el caso de la transmisión de transgenes por la línea germinal, lo que proporciona una base para el desarrollo de plantas totalmente transgénicas, en las que cada célula contiene una copia de ADN-T integrada en su genoma. Además, las plantas transformadas de manera estable pueden utilizarse a lo largo de muchas generaciones (Fagard y Vaucheret, 2000).

En las últimas décadas se ha dedicado un gran esfuerzo en el desarrollo de protocolos de transformación estable basados en *Agrobacterium* para diversas especies vegetales, incluidos los cultivos. En consecuencia, la gran

mayoría de los cultivos agrícolas modificados genéticamente aprobados se han desarrollado utilizando *Agrobacterium* (Hemmer, 2002). Los cultivos transgénicos están muy extendidos en EE.UU. y Asia, mientras que, en la Unión Europea, donde la normativa sobre los OMG es más estricta, el maíz MON 810 es el único cultivo transgénico aprobado para su comercialización (Davinson, 2010; James, 2014). Un reciente y extenso análisis de metadatos global mostró que el uso de cultivos transgénicos redujo sustancialmente el uso de pesticidas químicos mientras aumentaba el rendimiento de los cultivos y las ganancias de los agricultores (Klümpler y Qaim, 2014).

3. BIORREMEDIACIÓN.

La biorremediación es un proceso espontáneo o controlado en el que se utilizan métodos biológicos, principalmente microbiológicos, para degradar o transformar contaminantes en productos no tóxicos o menos, reduciendo la contaminación ambiental (Moreno *et al.*, 2004).

En las últimas dos décadas se han producido avances en las técnicas de biorremediación con el objetivo final de restaurar eficazmente los ambientes contaminados con un enfoque ecológico y a un coste muy bajo (Azubuike *et al.*, 2016). Los parámetros para definir un sitio contaminado son: biodegradabilidad, distribución de contaminantes, grado de lixiviación, reactividad química de los contaminantes, tipo y propiedades del suelo, disponibilidad de oxígeno y presencia de sustancias inhibitoras.

Los microorganismos autóctonos presentes en los ambientes contaminados son la clave para resolver la mayoría de los problemas relacionados con la biodegradación y la biorremediación de las sustancias contaminantes (Verma y Jaiswal, 2016) siempre que las condiciones ambientales sean adecuadas para su crecimiento y metabolismo.

La biorremediación se puede definir también como un proceso que se basa en mecanismos biológicos para reducir (degradar, desintoxicar, mineralizar o transformar) la concentración de contaminantes a un estado inocuo. El proceso de eliminación de contaminantes depende principalmente de la naturaleza del contaminante, que incluyen: agroquímicos, compuestos clorados, colorantes,

gases de efecto invernadero, metales pesados, hidrocarburos, residuos nucleares, plásticos y aguas residuales.

Según se informa, teniendo en cuenta el lugar de aplicación, las técnicas de biorremediación pueden clasificarse como: ex situ o in situ (Fig 3.1). La naturaleza del contaminante, la profundidad y el grado de contaminación, el tipo de ambiente, la ubicación, el coste y las políticas medioambientales son algunos de los criterios de selección que se tienen en cuenta al elegir cualquier técnica de biorremediación (Frutos *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2015). Además de los criterios de selección, los criterios de rendimiento (concentraciones de oxígeno y nutrientes, temperatura, pH y otros factores abióticos) que determinan el éxito de los procesos de biorremediación también se tienen en cuenta antes del proyecto de biorremediación.

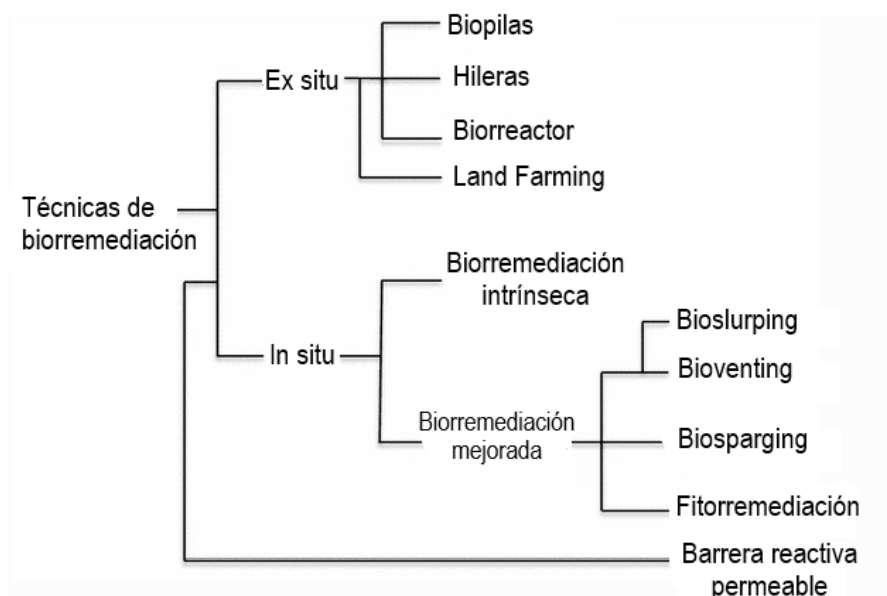


Figura 3.1. Técnicas de biorremediación.

3.1. Técnicas de biorremediación ex situ.

Estas técnicas implican la excavación de los contaminantes de las zonas contaminadas y su posterior transporte a otro lugar para su tratamiento. Las técnicas de biorremediación ex situ suelen considerarse en función del coste del tratamiento, la profundidad de la contaminación, el tipo de contaminante, el grado de contaminación, la ubicación geográfica y la geología del lugar contaminado.

Una de las principales ventajas de las técnicas de biorremediación ex situ es que no requieren una amplia evaluación preliminar del lugar contaminado

antes de la remediación; esto hace que la etapa preliminar sea corta, menos laboriosa y menos costosa. En la mayoría de los casos, estas técnicas requieren un gran espacio para su funcionamiento. En general, las técnicas de biorremediación ex situ tienden a ser más rápidas, más fáciles de controlar y pueden utilizarse para tratar una amplia gama de contaminantes (Prokop *et al.*, 2000).

3.1.1. Biopilas.

La biorremediación mediada por biopilas implica el apilamiento en la superficie de la tierra contaminada excavada, seguido de la enmienda de nutrientes y, ocasionalmente, de la aireación para potenciar la biorremediación aumentando la actividad microbiana (Fig 3.2). Los componentes de esta técnica son: aireación, irrigación, sistemas de recogida de nutrientes y lixiviados y un lecho de tratamiento.

El uso de esta técnica se está considerando cada vez más debido a sus características constructivas, incluyendo la rentabilidad, que permite una biodegradación efectiva a condición de que los nutrientes, la temperatura y la aireación se controlen adecuadamente (Whelan *et al.*, 2015). La aplicación de las biopilas en lugares contaminados puede ayudar a limitar la volatilización de contaminantes de bajo peso molecular (LMW, es el acrónimo en inglés de *Low Molecular Weight*); también puede utilizarse eficazmente para remediar entornos extremos contaminados, como en regiones muy frías (Dias *et al.*, 2015; Gómez y Sartaj, 2014; Whelan *et al.*, 2015).

En relación con esto, Gómez y Sartaj (2014) estudiaron los efectos de diferentes tasas de aplicación (3 y 6 ml/m^3) de consorcios microbianos y compost maduro (5 y 10%) sobre la reducción de hidrocarburos totales de petróleo (TPH, es el acrónimo en inglés de *Total Petroleum Hydrocarbon*). Al final del periodo de estudio (94 días), se obtuvo una reducción del 90,7% de TPH en las pilas bioaumentadas y bioestimuladas, en comparación, con las pilas de control con un 48% de eliminación promedio de TPH. El alto porcentaje de reducción de TPH se atribuyó a la interacción sinérgica entre la bioaumentación (introducir o aumentar la población microbiana con capacidad de degradación) y la bioestimulación (añadir nutrientes o sustratos a una muestra contaminada para

estimular la actividad de los microbios autóctonos), demostrando así la flexibilidad de las biopilas para la biorremediación.

Aunque los sistemas de biopila ahorran espacio, la ingeniería robusta, el coste de mantenimiento y operación, la falta de suministro de energía, son algunas de las limitaciones de las biopilas. Además, un calentamiento excesivo del aire puede provocar la desecación del suelo sometido a biorremediación, lo que provocará la inhibición de las actividades microbianas y promoverá la volatilización en lugar de la biodegradación (Scanscartier *et al.*, 2009).



Figura 3.2. Ejemplo de Biopila (Germaine *et al.*, 2015).

3.1.2. Hileras.

Las hileras se basan en el volteo periódico del suelo contaminado apilado para mejorar la biorremediación mediante el aumento de las actividades de degradación de las bacterias hidrocarbonoclásticas autóctonas y/o transitorias presentes en el suelo contaminado.

El volteo periódico del suelo contaminado, junto con la adición de agua, produce un aumento de la aireación, la distribución uniforme de los contaminantes, los nutrientes y las actividades de degradación microbiana, acelerando así la tasa de biorremediación, que puede llevarse a cabo mediante la asimilación, la biotransformación y la mineralización (Barr, 2002).

No obstante, debido a los giros periódico asociados al tratamiento de hileras, puede que no sea la mejor opción a adoptar para remediar suelos contaminados con volátiles tóxicos. El uso del tratamiento en hileras se ha visto implicado en la liberación de CH₄ (gas de efecto invernadero) debido al

desarrollo de una zona anaeróbica dentro del suelo contaminado apilado, que suele producirse tras la reducción de la aireación (Hobson *et al.*, 2005).



Figura 3.3. Ejemplo de hilera (Díaz et al., 2005).

3.1.3. Biorreactor.

El biorreactor, como su nombre indica, es un tanque en el que las materias primas se convierten en productos específicos tras una serie de reacciones biológicas. Las condiciones de un biorreactor apoyan el proceso natural de las células imitando y manteniendo su entorno natural para proporcionar unas condiciones de crecimiento óptimas. Las muestras contaminadas pueden introducirse en un biorreactor como materia seca o como lodo (Fig 3.4).

El excelente control de los parámetros del bioproceso (temperatura, pH, tasas de agitación y aireación, concentraciones de sustrato e inóculo) es una de las principales ventajas de la biorremediación basada en biorreactores.

Las aplicaciones de diferentes biorreactores para el proceso de biorremediación han dado lugar a la eliminación de una amplia gama de contaminantes (Tabla 3.1). La naturaleza flexible de los diseños de biorreactores permite la máxima degradación biológica a la vez que minimiza las pérdidas abióticas (Mohan *et al.*, 2004).

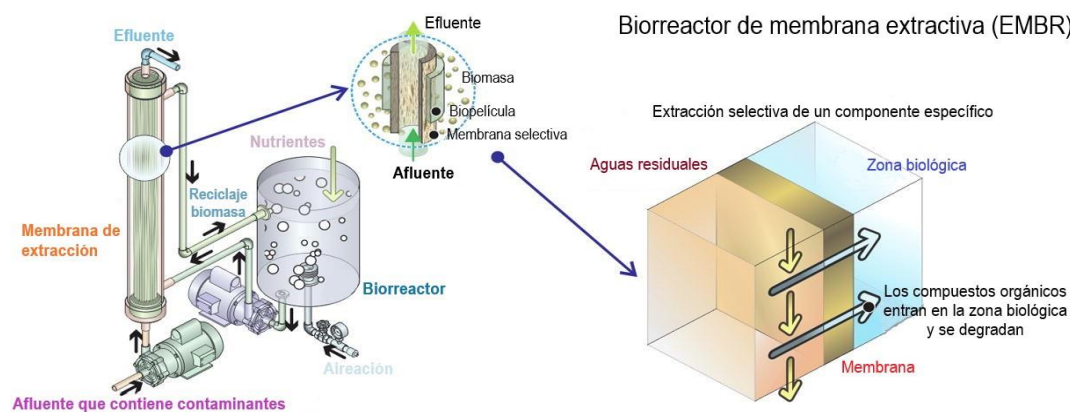


Figura 3.4. Ejemplo de un biorreactor (Gede et al., 2019).

El biorreactor es un sistema cerrado, por lo que los microorganismos modificados genéticamente (GEM, es el acrónimo en inglés de *Genetically Engineered Microorganism*) se pueden utilizar para la bioaumentación, tras lo cual el organismo (GEM) debe ser destruido antes de que los suelos tratados sean devueltos al campo para su vertido. Este mantenimiento del GEM seguido de su destrucción ayudará a garantizar que ningún gen extraño se escape al medio ambiente después de la biorremediación.

La biorremediación basada en biorreactores presenta varios motivos que pueden reducir su eficiencia: 1) el volumen del suelo contaminado u otras sustancias a tratar puede ser demasiado grande, requiriendo más mano de obra, capital y medidas de seguridad para transportar el contaminante al lugar de tratamiento (Philp y Atlas, 2005), 2) cualquier parámetro que no se controle y/o mantenga en un nivel óptimo, puede reducir las actividades microbianas y 3) los contaminantes pueden responder de forma distinta dependiendo del biorreactor.

Tabla 3.1. Algunos contaminantes eliminados por la biorremediación basada en biorreactores.

Tipo/modo de funcionamiento del biorreactor	Naturaleza de la muestra	Naturaleza del contaminante	Concentración inicial	% de eliminación	Referencias
Biorreactor de tanque de agitación (2,5 L)	Sedimento contaminado con petróleo crudo	Hidrocarburos poliaromáticos totales de petróleo (TPH)	19 y 3,1 ppm respectivamente	82-97	Chikere et al., (2016)

Manta de lodos anaeróbicos de flujo continuo (3,3 L)	Agua contaminada con BTEX sintético	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX)	50 g VSS/L	51-86	Firmino <i>et al.</i> , (2015)
Reactor de lecho compacto (PRB, 100 cm × 5 cm)	Lodos farmacéuticos	Vapor de xileno	0,2-1.2 g / m ³	95-99	Saravanan <i>et al.</i> , (2015)
Biorreactor de membrana (MBR, 8 L)	Aguas residuales de la gasificación del carbón	Naftalina y nitrógeno total	10-200 mg/L	48-98	Xu <i>et al.</i> , (2015)

3.1.4. Land farming.

“Land farming” es una de las técnicas de biorremediación más sencillas debido a su bajo coste y a que requiere menos equipamiento para su funcionamiento. Consiste en excavar y/o labrar los suelos contaminados, provocando la aireación y la adición de nutrientes (nitrógeno, fosforo y potasio), y junto con el riego son las principales operaciones que estimulan la actividad microbiana.

Por lo general, los suelos contaminados excavados se aplican cuidadosamente sobre un soporte de capa fija por encima de la superficie del suelo para permitir la biodegradación aeróbica del contaminante por parte de los microorganismos autóctonos (Paudyn *et al.*, 2008; Silva-Castro *et al.*, 2015).

Del mismo modo, en un ensayo de campo, Paudyn *et al.*, (2008) informaron de la eliminación del 80% de contaminantes (diésel) mediante la aireación utilizando un método de arado en una ubicación remota del Ártico canadiense durante un período de estudio de 3 años; esto demuestra que en la técnica de “land farming”, la aireación juega un papel crucial en la eliminación de contaminantes.

En general, esta técnica es muy simple de diseñar e implementar, requiere poco capital y puede utilizarse para tratar grandes volúmenes de suelo contaminado con un impacto ambiental y un requerimiento de energía mínimo (Maila y Colete, 2004).

A pesar de ser la técnica de biorremediación más sencilla, tiene algunas limitaciones, que incluyen: un gran espacio de operación, la reducción de las actividades microbianas debido a condiciones ambientales desfavorables, el coste adicional debido a la excavación y una eficacia reducida en la eliminación de contaminantes inorgánicos (Khan *et al.*, 2004; Maila y Colete, 2004).



Figura 3.5. Ejemplo de Land Farming (Eten, 2013).

3.2. Técnicas de biorremediación in situ.

Estas técnicas tratan las zonas y/o sustancias contaminadas en el lugar de la contaminación. No requiere ninguna excavación; por lo tanto, se acompaña de poca o ninguna alteración de la estructura del suelo.

Algunas técnicas de biorremediación in situ pueden ser mejoradas (bioventing, biosparging y fitorremediación), mientras que otras podrían proceder sin ningún tipo de mejora (biorremediación intrínseca o atenuación natural). Las técnicas de biorremediación in situ se han utilizado con éxito para tratar disolventes clorados, tintes, metales pesados e hidrocarburos (Folch *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).

3.2.1. Biorremediación in situ mejorada.

3.2.1.1. Bioventing.

Esta técnica, denominada bioventilación, implica la estimulación controlada del flujo de aire mediante el suministro de oxígeno a la zona insaturada (vadosa) con el fin de aumentar la biorremediación, incrementando las actividades de los microbios autóctonos. En este proceso, las enmiendas se realizan mediante la adición de nutrientes y humedad con el objetivo final de lograr la transformación microbiana de los contaminantes a un estado inocuo (Philp y Atlas, 2005).

La bioventilación ha ganado popularidad entre otras técnicas de biorremediación in situ, especialmente para la restauración de zonas contaminadas con productos petrolíferos ligeramente derramados (Höhener y Ponsin, 2014).

Un estudio realizado por Sui y Li (2011) modeló el efecto de la tasa de inyección de aire de un sitio contaminado con tolueno. Se observó que una alta tasa de flujo de aire no produce un aumento de la tasa de biodegradación ni hace más efectiva la biotransformación del contaminante. Sin embargo, una baja tasa de inyección de aire resultó en un aumento significativo de la biodegradación.

Esto demuestra que, la tasa de inyección de aire es uno de los parámetros básicos para la dispersión, redistribución y pérdida de superficie de los contaminantes. Resultando evidente que, el éxito de la biorremediación depende del número de puntos de inyección de aire, que ayuda a conseguir una distribución uniforme de los contaminantes.

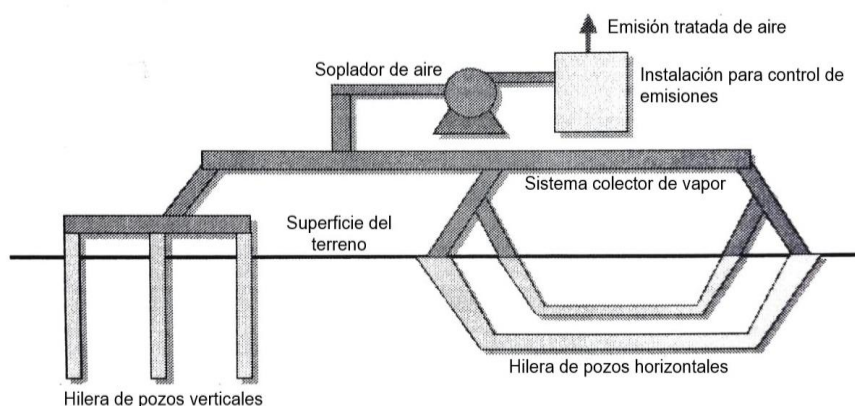


Figura 3.6. Proceso de bioventing.

3.2.1.2. Bioslurping.

Esta técnica combina el bombeo mejorado por vacío, la extracción de vapores del suelo y la bioventilación para lograr la recuperación del suelo y las aguas subterráneas mediante el suministro indirecto de oxígeno y la estimulación de la biodegradación de contaminantes (Gidarakos y Aivalioti, 2007) (Fig 3.7).

La técnica está diseñada para la recuperación de productos libres, como líquidos ligeros en fase no acuosa (LNAPLs, es el acrónimo en inglés de *Light Non-Aqueous Phase Liquids*), remediando así zonas capilares, insaturadas y saturadas. También puede utilizarse para remediar suelos contaminados con compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles.

El sistema utiliza un "sorbedor" que se extiende en la capa de producto libre, que extrae los líquidos (productos libres y gas del suelo) de esta capa de forma similar a como una pajita extrae líquido de cualquier recipiente. El mecanismo de bombeo provoca el movimiento ascendente de los LNAPL hacia la superficie, donde se separan del agua y del aire. Tras la eliminación completa de los productos libres, el sistema puede funcionar fácilmente como un sistema de "bioventing" convencional para completar el proceso de remediación (Kim *et al.*, 2014).

En esta técnica, el exceso de humedad del suelo limita la permeabilidad del aire y disminuye la tasa de transferencia de oxígeno, reduciendo a su vez las actividades microbianas. Aunque la técnica no es adecuada para remediar suelos con baja permeabilidad, ahorra costes debido a la menor cantidad de agua subterránea resultante de la operación, lo que minimiza los costes de almacenamiento, tratamiento y eliminación (Philp y Atlas 2005).

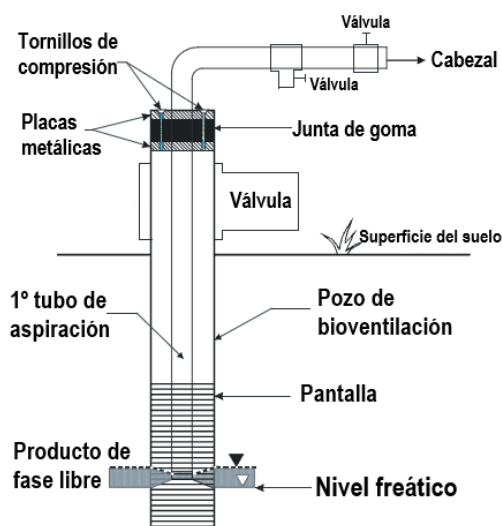


Figura 3.7. Sistema de bioslurping (Kittel *et al.*, 1994).

3.2.1.3. Biosparging.

Esta técnica es muy parecida a la bioventilación en el sentido de que se inyecta aire en el subsuelo para estimular las actividades microbianas. Sin embargo, a diferencia de la bioventilación, el aire se inyecta en la zona saturada, lo que puede provocar un movimiento ascendente de los compuestos orgánicos volátiles hacia la zona no saturada para promover la biodegradación (Fig 3.8).

La eficacia depende de dos factores principales: la permeabilidad del suelo, que determina la biodisponibilidad del contaminante para los microorganismos, y la biodegradabilidad del contaminante (Philp y Atlas 2005). La biodispersión se ha utilizado ampliamente en el tratamiento de acuíferos contaminados con productos derivados del petróleo, especialmente diésel y queroseno.

Kao *et al.*, (2008) informaron de que el “biosparging” de una pluma de un acuífero contaminado con benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) dio lugar a un cambio de las condiciones anaeróbicas a aeróbicas. El descenso generalizado de la reducción de BTEX (>70%) indica además que este proceso se puede utilizar para remediar las aguas subterráneas contaminadas con BTEX. Sin embargo, la principal limitación es la predicción de la dirección del flujo de aire.

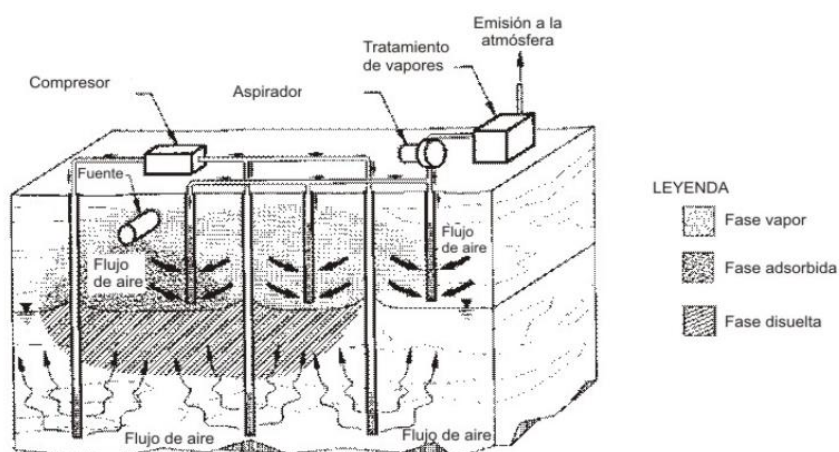


Figura 3.8. Técnica de biosparging (EPA, 2006).

3.2.1.4. Fitorremediación.

Esta técnica se basa en el uso de interacciones vegetales (físicas, bioquímicas, biológicas, químicas y microbiológicas) en sitios contaminados para mitigar los efectos tóxicos de los contaminantes. Dependiendo del tipo de contaminante (elemental u orgánico), existen varios mecanismos (acumulación o extracción, degradación, filtración, estabilización y volatilización) involucrados en la fitorremediación. Los contaminantes elementales (metales pesados tóxicos y radionucleidos) se eliminan principalmente por extracción, transformación y secuestro. Por otro lado, los contaminantes orgánicos (hidrocarburos y

compuestos clorados) se eliminan predominantemente por degradación, rizorremediación, estabilización y volatilización (Meagher, 2000; Kuiper *et al.*, 2004).

Algunos factores importantes a tener en cuenta a la hora de elegir una planta como fitorremediador son: el sistema radicular, la biomasa aérea, la toxicidad del contaminante para la planta, la supervivencia de la planta y su adaptabilidad a las condiciones ambientales imperantes, la tasa de crecimiento de las plantas, la monitorización del lugar y, sobre todo, el tiempo necesario para alcanzar el nivel de limpieza deseado.

El éxito de cualquier enfoque de fitorremediación depende principalmente de optimizar los potenciales de remediación de las plantas nativas que crecen en sitios contaminados, ya sea por bioaumentación con rizobacterias vegetales endógenas o exógenas, o por bioestimulación. Se ha informado de que el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, es el acrónimo en inglés de *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) podría desempeñar un papel importante en la fitorremediación, ya que las PGPR tienden a mejorar la producción de biomasa y la tolerancia de las plantas a los metales pesados y otras condiciones edáficas desfavorables (Yancheshmeh *et al.*, 2011; de-Bashan *et al.*, 2012).

Por ejemplo, durante la fitorremediación de estuarios contaminados por metales con *Spartina maritima*, la bioaumentación con rizobacterias endógenas dio lugar a un aumento de la biomasa subsuperficial de las plantas, de la acumulación de metales y de la eliminación de éstos (Mesa *et al.*, 2015). Se ha informado de que diferentes especies de plantas tienen la capacidad innata para eliminar los contaminantes orgánicos y elementales de sitios contaminados (Tabla 2).

Tabla 3.2. Algunas plantas con potencial de fitorremediación.

Planta	Naturaleza del contaminante	Concentración inicial	Mecanismo de remoción	% de eliminación	Referencias
<i>Ludwigia octovalvis</i>	Gasolina	2,07,800 mg / kg de TPH	Rizodegradación mejorada	93.5	Almansoori <i>et al.</i> , (2015)

<i>Amaranto paniculatus</i>	Ni	25-150 µM	Fitoacumulación	25-60	Iori <i>et al.</i> , (2013)
<i>Spartina maritima</i>	As, Cu, Pb, Zn	5-2153 mg / kg	Rizoacumulación bioaumentada	19-65	Mesa <i>et al.</i> , (2015)
<i>Phragmites australis</i>	PAHs	229 ± 15,56 µg / g	Rizodegradación	58,47	Gregorio <i>et al.</i> , (2014)

La tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante se ha utilizado para regular la expresión de algunos genes específicos de las plantas con el fin de aumentar el metabolismo y la tolerancia a los metales pesados (Dowling y Doty, 2009).

Algunas ventajas de la fitorremediación incluyen: el bajo coste, el respeto por el medio ambiente, operaciones a gran escala, el bajo coste de instalación y mantenimiento, la conservación de la estructura del suelo, la prevención de la erosión y la lixiviación de metales (Van Aken, 2009; Ali *et al.*, 2013).

3.2.2. Biorremediación intrínseca.

La biorremediación intrínseca, también conocida como atenuación natural, consiste en la remediación pasiva de lugares contaminados, sin ninguna fuerza externa (intervención humana). Esta técnica se basa en procesos microbianos aeróbicos y anaeróbicos para biodegradar las sustancias contaminantes, incluidas las recalcitrantes. La ausencia de fuerza externa implica que la técnica sea menos costosa en comparación con otras técnicas. Sin embargo, el proceso debe ser monitoreado para establecer que la biorremediación es continua y sostenible, de ahí el término atenuación natural monitoreada (MNA, es el acrónimo en inglés de *Monitored Natural Attenuation*).

Según el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (US NRC, es el acrónimo en inglés de *United States National Research Council*), hay tres criterios que deben cumplirse: 1) demostrar la pérdida de contaminantes de las zonas contaminadas, 2) demostrar mediante un análisis de laboratorio de que los microorganismos aislados de las zonas contaminadas tienen el potencial innato de biodegradar o transformar los contaminantes presentes en la zona y, 3) evidencia de la realización del potencial de biodegradación en el campo (Philp y Atlas, 2005).

De acuerdo con estos criterios, M'rassi *et al.* (2015) aislaron bacterias degradantes de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo de refinerías, y demostraron el potencial de biodegradación de los aislados cultivándolos en un medio de sales minerales con sustratos de hidrocarburos saturados e insaturados como únicas fuentes de carbono, y también por su capacidad para reducir las concentraciones de hidrocarburos.

Una de las principales limitaciones de la biorremediación intrínseca es que puede llevar más tiempo alcanzar el nivel objetivo de concentración de contaminantes, dado que no se incorpora ninguna fuerza externa para acelerar el proceso de remediación. Por lo tanto, antes de aplicar la atenuación natural, es necesario realizar una evaluación de riesgos para garantizar que el tiempo de remediación sea inferior al tiempo estipulado para que el contaminante alcance el punto de exposición en relación con las poblaciones humanas y animales más cercanas.

3.3. Barrera reactiva permeable (PRB).

Esta técnica se utiliza para remediar las aguas subterráneas contaminadas, debido a su diseño y mecanismo de eliminación de contaminantes (Tabla 3.3). Se compone de una barrera reactiva permanente o semipermanente compuesta principalmente por un hierro cero-valente (ZVI, es el acrónimo en inglés de *Zero-valent Iron*) (García *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014) se sumerge en la trayectoria de las aguas subterráneas contaminadas. A medida que el agua contaminada fluye a través de la barrera bajo su gradiente natural, los contaminantes quedan atrapados y sufren una serie de reacciones que dan como resultado agua limpia en el flujo de paso (Thiruvengkatachari *et al.*, 2008; Obiri-Nyarjo *et al.*, 2014).

La eficacia de esta técnica depende sobre todo del tipo de medio utilizado, en el que influyen: el tipo de contaminantes, las condiciones biogeoquímicas e hidrogeológicas, la influencia ambiental y sanitaria, la estabilidad mecánica, y el coste (Obiri-Nyarko *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015).

Recientemente, los investigadores se han centrado en acoplar la PRB y otros métodos como la electrocinética para el tratamiento de diferentes clases de contaminantes (García *et al.*, 2014; Ramírez *et al.*, 2015).

Se informó que el 90% de la eliminación de nitrato de un suelo arcilloso contaminado se logró en una semana cuando se combinaron las técnicas de electrocinética y PRB (García *et al.*, 2014). Apparently, the combined techniques allowed the contaminated soil to maintain the environmental conditions (pH, temperature, nutrients) for microbial growth.

Tabla 3.3. Algunos contaminantes eliminados mediante la técnica de barreras reactivas permeables (PRB).

Reactivo	Naturaleza del contaminante	Concentración inicial	Mecanismo de eliminación	% de eliminación	Referencias
Arcilla	Cs-137	10^5 Bq / m^3	Sorción	-	De Pourcq <i>et al.</i> , (2015)
Hierro de valencia cero junto con polihidroxibutirato	1,2-dicloroetano	10 mg / L	Degradación biológica	20-80	Baric <i>et al.</i> , (2014)
Biobarrera (<i>Arthrobacter viscosus</i>)	Hidrocarburos poliaromáticos	100 μ M	Biodegradación	>80	Ferreira <i>et al.</i> , (2013)
Sustratos orgánicos y hierro cero-valente (ZVI)	Metales pesados (Al, Zn y Cu)	15, 20 y 1,2 mg / L	Precipitación	>95	Gilbert <i>et al.</i> , (2013)

4. EMPLEO DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE PARA LA MITIGACIÓN DE CONTAMINANTES.

Las últimas décadas han sido testigo de un crecimiento demográfico acelerado y un nivel sin precedentes de la revolución industrial que no solo ha mejorado el nivel de vida, sino que también ha comprometido la calidad de nuestro medio ambiente (Zhao *et al.*, 2017a; Jacob *et al.*, 2018). Además, la rápida industrialización exhibe desventajas en la liberación de una serie de contaminantes nocivos en el medio ambiente como pesticidas, petróleo, hidrocarburos, metales pesados, bifenilos policlorados y colorantes sintéticos (Fulekar *et al.*, 2009; Bilal *et al.*, 2017a, 2019a; Rasheed *et al.*, 2018a).

Debido a las características de difícil degradación, alta toxicidad y acumulación biológica, estos contaminantes no solo pueden causar efectos tóxicos, cancerígenos, teratogénicos y mutagénicos en humanos u organismos, sino que también representan una seria amenaza para la sostenibilidad ambiental (Bilal *et al.*, 2019b). Por lo tanto, es muy deseable degradar estos contaminantes y evitar su dispersión en el entorno para mantener un medio ambiente más saludable.

La biorremediación asistida por microbios depende principalmente de la secreción de enzimas que participan en las vías metabólicas (Dangi *et al.*, 2019) para la degradación eficiente de contaminantes peligrosos (Tabla 4.1). En biorremediación, varios géneros de bacterias como *Achromobacter*, *Dehalococcoides*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Comamonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* y *Ralstonia*, pueden convertir los contaminantes en compuestos no tóxicos y, por tanto, reducir o eliminar finalmente los contaminantes del medio ambiente (Lloyd *et al.*, 2003).

Con el desarrollo de las tecnologías de ADN recombinante e ingeniería genética en la cría de microbios, se construyó un gran número de bacterias de ingeniería con capacidades aumentadas para mejorar la eficiencia de degradación de los contaminantes (Tropel y Van Der Meer, 2004; Zhao *et al.*, 2017b). Además del cribado de cepas por mutagénesis natural o fisicoquímica, se han utilizado diversas estrategias para construir cepas de ingeniería para acelerar el proceso de gobernanza ambiental: 1) cribado y clonación de genes degradadores altamente eficaces; 2) aumento de la expresión de enzimas con funciones de degradación en los microorganismos; 3) expresión de genes de degradación de diferentes contaminantes en un recipiente para construir bacterias de ingeniería; y 4) la fusión de protoplastos combinando las ventajas de ambos progenitores para la degradación de la contaminación (Fig 4.1).

Tabla 4.1. Hoja de ruta conceptual paso a paso que puede aplicarse para los análisis de evaluación del riesgo ambiental y la degradación del contaminante de alta preocupación relacionada con el medio ambiente utilizando bacterias modificadas genéticamente.

Pasos a seguir	Observaciones
----------------	---------------

01	Identificación	La identificación es un proceso cuidadoso y sistemático que permite encontrar las bacterias con los rasgos requeridos.
02	Evaluación	Este paso evalúa la eficiencia del gen de interés a partir de los rasgos identificados y su tasa de supervivencia en presencia del contaminante.
03	Modificación	Este paso promueve el uso de estrategias de ingeniería para modificar el gen bacteriano de interés para inducir la degradación y la supervivencia.
04	Reevaluación	Este paso reevalúa la eficacia de la degradación del contaminante, la tasa de eliminación y la tasa de supervivencia de las bacterias modificadas genéticamente.
05	Detección	Se trata de herramientas analíticas para detectar y/o cuantificar los productos de reacción. Los elementos importantes son la exactitud, la precisión y la fiabilidad.

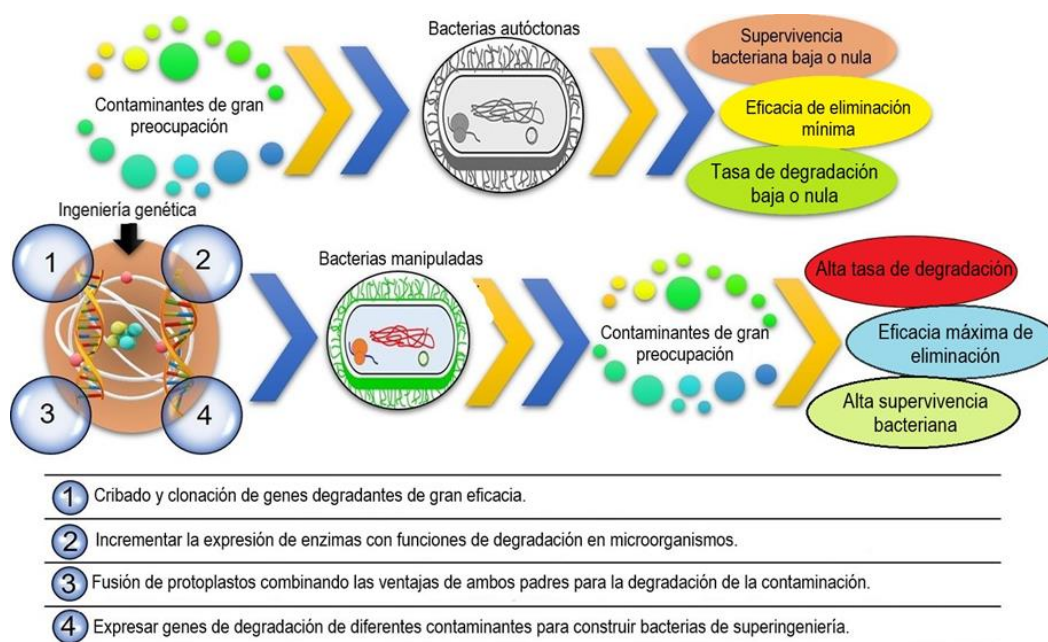


Figura 4.1. Inducir la degradación de contaminantes de gran preocupación por microbios modificados genéticamente. Los números 1 a 4 muestran estrategias de ingeniería genética.

4.1. Relación ecológica de los microorganismos en la biorremediación.

Los microorganismos, como parte de la comunidad ecológica superior, tienen una relación compleja con otros organismos. Un microorganismo no puede utilizar directamente la energía producida por su propio metabolismo en la mayoría de los casos, por lo que el co-metabolismo es el principal mecanismo de degradación de contaminantes (Mekuto *et al.*, 2018).

La estructura de la población microbiana contribuye a predecir el destino de los contaminantes en el medio ambiente, a diseñar diferentes esquemas de biorremediación en función de los diferentes contaminantes del medio ambiente y a cultivar comunidades microbianas degradadas especiales.

4.2. Productos químicos agrícolas: herbicidas, pesticidas y fertilizantes.

En la actualidad, los plaguicidas se emplean ampliamente en la producción agrícola para prevenir y controlar las plagas de los cultivos y las enfermedades asociadas para mantener una alta calidad del producto con una pérdida mínima de rendimiento (Damalas y Eleftherohorinos, 2011). Sin embargo, el uso excesivo de plaguicidas/fertilizantes químicos en las prácticas agrícolas modernas ha llevado a la contaminación de diferentes medios, incluyendo el aire, la tierra y el agua (Craig, 2019; Li, 2018), y las consecuencias negativas para la salud humana y los animales (Fig 4.2).

En la actualidad se han descubierto varios genes con capacidad de degradación de plaguicidas en diferentes especies (Tabla 4.2), lo que ha proporcionado la posibilidad de construir bacterias de ingeniería genética. Por ejemplo, la clorhidrolasa de atrazina codificada por el gen *atzA* tiene una alta actividad de degradación hacia la atrazina, uno de los herbicidas más utilizados y potencialmente peligroso para los organismos (Neumann *et al.*, 2004).

Para la sostenibilidad medioambiental y el crecimiento armonioso entre el ser humano y la naturaleza, el desarrollo de pesticidas biológicos (productos ecológicos que contienen células vivas que se utilizan para controlar plagas y enfermedades, Torracchi *et al.*, 2020) se han convertido en

una tendencia importante para salvaguardar la salud humana y el desarrollo sostenible de la agricultura.

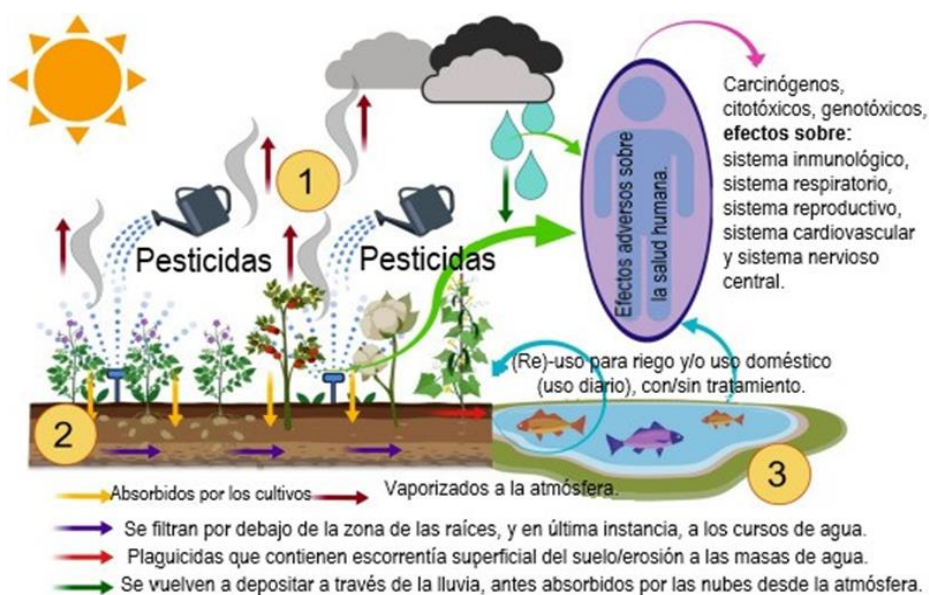


Figura 4.2. La deriva de plaguicidas y las consecuencias adversas del uso excesivo de plaguicidas/fertilizantes químicos en las prácticas agrícolas modernas que pueden llevar a la contaminación de diferentes medios, incluyendo (1) el aire, (2) la tierra y (3) el agua.

Tabla 4.2. Lista de genes de diferentes especies implicados en la degradación de plaguicidas.

Enzima	Gen	Especie	Sustrato de degradación	Referencia
Atrazina clorohidrolasa	<i>atzA</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa ADP	Atrazina	Neumann <i>et al.</i> , (2004)
Oxigenasa	<i>CndA</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. DC-6	Acetocloro	Chen <i>et al.</i> , (2014)
Organofósforo hidrolasa	<i>mph</i>	<i>Burkholderia</i> cepacia	Organofósforos	Ekkhunnathan <i>et al.</i> , (2012)
Organofosfatosa	<i>ophc2</i>	<i>Pseudomonas</i> pseudoalcaligenes	Metil paratión	Gotthard <i>et al.</i> , (2013)

4.3. Contaminantes peligrosos a base de colorantes.

Numerosas industrias, como la textil, la del cuero, la alimentaria, la de los productos farmacéuticos, los detergentes, la de los cosméticos, etc., utilizan diversos tipos de materiales y/o tintes sintéticos. Aproximadamente entre el 10 y

el 15% de los colorantes empleados en las industrias se vierten en las aguas residuales durante las maniobras de teñido (Selvakumar *et al.*, 2013; Bilal *et al.*, 2017a, 2018d).

Se ha demostrado que los colorantes sintéticos, junto con sus productos intermedios y metabolitos de degradación, son capaces de generar compuestos aromáticos altamente tóxicos, cancerígenos, mutagénicos o teratogénicos (Bilal *et al.*, 2016a, 2018d; Ahmed *et al.*, 2017). Debido al alto nivel de DQO (COD es el acrónimo en inglés de *Chemical Oxygen Demand*), demanda química de oxígeno, la presencia de colorante reduce la transparencia del agua y la solubilidad del oxígeno, lo que a su vez interfiere potencialmente con la evolución y el desarrollo de la biota acuática y el equilibrio ecológico del agua (Bilal *et al.*, 2016a).

Un ejemplo como, la enzima azobenceno reductasa o azorreductasa codificada por el gen *azoA* es una enzima clave para degradar los colorantes azoicos, la categoría principal de las aguas residuales tintóreas (Saratale *et al.*, 2011). Para degradar los tintes de forma más meticulosa y completa, se ha aplicado el consorcio mixto de bacterias autóctonas en la decoloración de tintes, que mostró mejores efectos en el proceso de decoloración en comparación con las bacterias individuales (Kurade *et al.*, 2012; Sylvine y Veenagayathri, 2016). Por lo tanto, el consorcio bacteriano de bacterias modificadas genéticamente puede tener una mayor perspectiva de aplicación en la decoloración de los contaminantes de los tintes.

4.4. Metales pesados potencialmente tóxicos.

La emisión de metales pesados a la atmosfera, debido a la rápida expansión de la tecnología industrial, se ha convertido en una amenaza global, ya que la contaminación por metales pesados está amenazando seriamente la salud y la supervivencia de la humanidad (Fig 4.4) (Jacob *et al.*, 2018).

El uso de bacterias modificadas genéticamente, para la eliminación de metales pesados, se caracterizan por tener una gran adaptabilidad y una alta eficiencia de tratamiento. Los metales pesados presentes en el medio ambiente, como el Cu, el Co, el Cr, el Ni, el Mo, el Fe, el Zn y el Mn, pueden producir diversos efectos bioquímicos, fisiológicos o genotóxicos en todo tipo de

microorganismos (Emamverdian *et al.*, 2015; Rasheed *et al.*, 2019b), cuando se supera una determinada concentración, inhibiendo sus funciones metabólicas, el proceso de transcripción o dañando los materiales genéticos (Guandacker *et al.*, 2010; Sobol y Schiestl, 2012).

Sin embargo, algunos microorganismos pueden desarrollar resistencia a la toxicidad de los metales pesados mediante la desintoxicación biológica. Como por ejemplo, la metalotioneína de la levadura y de los mamíferos y la exo-proteína Lamb se expresaron en E.coli para desarrollar una cepa modificada genéticamente, cuya capacidad de captación de iones de cadmio (Cd^{2+}) era 15-20 veces superior a la de las cepas madre (Sousa *et al.*, 1998).

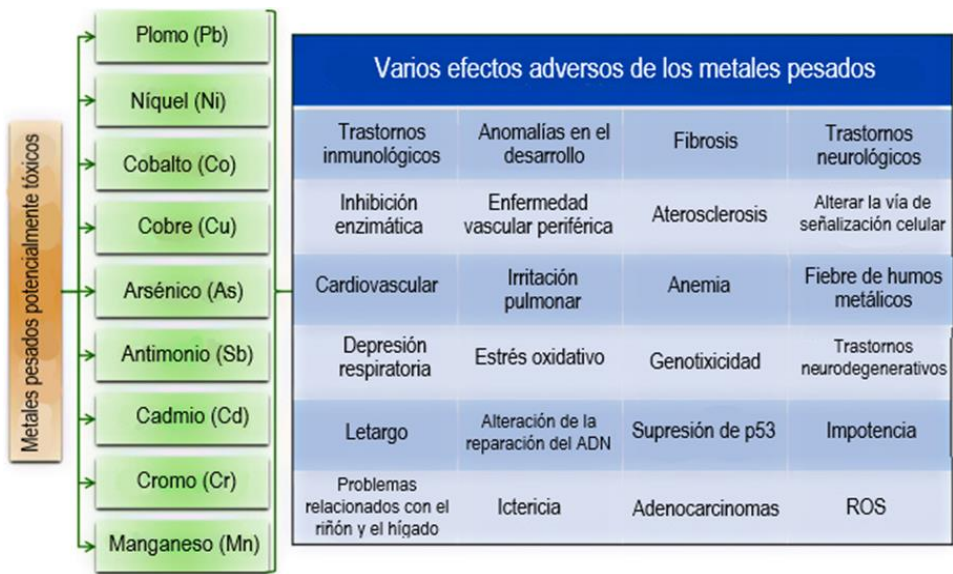


Figura 4.4. Varios efectos adversos de los metales pesados.

4.5. Petróleo y compuestos aromáticos.

Con el desarrollo del transporte marítimo y la continua explotación de petróleo en alta mar, la contaminación por petróleo ha afectado gravemente al medio ambiente marino y se ha convertido en una de las preocupaciones mundiales (Carpenter, 2018).

El vertido de petróleo crudo o hidrocarburos de petróleo en el medio ambiente, es decir, en las aguas costeras y en la tierra, suele ser el resultado de actividades antropogénicas cotidianas, influyen en el medio ambiente al provocar cambios físicos y ecológicos, así como toxicidad química. Los efectos de la toxicidad pueden ser breves o duraderos para los seres vivos y dependen de la

concentración y la duración de la exposición al derrame de petróleo (Ndimele, 2017).

Debido a los daños del suelo y la vegetación por el petróleo crudo, se ha convertido en una cuestión crucial la limpieza de estos suelos. Dado que el petróleo es una mezcla de varios hidrocarburos (n-alcanos, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos), la construcción de bacterias de ingeniería capaces de degradar varios hidrocarburos del petróleo mediante la tecnología de ingeniería genética es una dirección de desarrollo para controlar la contaminación del petróleo en alta mar.

La degradación de algunos componentes del petróleo por parte de los microorganismos está controlada por un plásmido extracromosómico; por lo tanto, se pueden construir superbacterias introduciendo plásmidos con capacidad para degradar diferentes componentes en una sola célula. Se construyó un *Acinetobacter baumannii* S30 pJES recombinante insertando el gen *lux* en el cromosoma del *A.baumannii* S30, una cepa con la eficiencia de biodegradación para el hidrocarburo total del petróleo (TPH) del crudo. Así, la persistencia de la cepa *A.baumannii* S30 pJES puede ser monitoreado en el sitio de biorremediación (Mishra *et al.*, 2004).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, es el acrónimo en inglés de *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) son compuestos orgánicos hidrofóbicos predominantes, que constan de dos o más anillos de benceno fusionados, y compuestos aromáticos heterocíclicos (HACs, es el acrónimo en inglés de *Heterocyclic Aromatic Compounds*), en los que el oxígeno y el nitrógeno sustituyen a uno o más átomos de carbono del anillo de benceno. Estos compuestos aromáticos suscitan una profunda preocupación medioambiental debido a sus potenciales efectos tóxicos, cancerígenos y mutagénicos sobre los seres humanos y otros organismos (Hu *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, se ha avanzado en la investigación para la exclusión de estos compuestos hidrocarburos aromáticos (PAHs y HACs) de los sitios contaminados. Se han recogido y analizado una gran variedad de aislados bacterianos con marcadas capacidades de degradación de PAHs en aguas y suelos. Entre un conjunto de aislados bacterianos, las cepas pertenecientes a los géneros *Sphingobium* y *Sphingomonas* han recibido una amplia consideración debido a su potencial capacidad de biodegradación y sus diversas

adaptaciones ecológicas (Aylward *et al.*, 2013). Las cepas pertenecientes a estos dos géneros han demostrado un gran potencial para degradar una serie de compuestos aromáticos, incluyendo dioxinas, bifenilo, naftaleno, m-xileno, tolueno, etc., y muchos otros compuestos metilo-, cloro- hidroxilo y nitroaromáticos (Zhao *et al.*, 2017a).

Tabla 4.3. Lista de cepas modificadas genéticamente para la biodegradación del petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Sustrato de degradación	Cepas de ingeniería	Gen/enzima	Referencia
TPH	<i>A. baumannii</i> S30 pJES	-	Mishra <i>et al.</i> , (2004)
n-alcanos	<i>Streptomyces</i> <i>coelicolor</i> M145-AH	<i>alkB</i> / alqueno hidroxilasa	Gallo <i>et al.</i> , (2012)
PAHs	F14	-	Lu <i>et al.</i> , (2014)
PAHs	<i>E. coli</i>	<i>bphA2cA1c</i> / salicilato oxigenasa	Cho <i>et al.</i> , (2005)

4.6. Bifenilos policlorados.

Los bifenilos policlorados (PCBs, es el acrónimo en inglés de *Polychlorinated biphenyls*) son productos sintéticos compuestos por un grupo de hidrocarburos aromáticos clorados. Debido a las características recalcitrantes, la fuerte capacidad de acumulación, la contaminación generalizada y los potenciales efectos biológicos cancerígenos, los PCB causan una destrucción duradera de la ecología y la salud humana (Aldhafiri *et al.*, 2018).

La aparición de cepas de degradación altamente eficientes construidas mediante ingeniería genética puede mejorar en gran medida la eficiencia de la degradación de los PCB. La bifenil 2,3- dioxigenasa (BDO) codificada por el gen *bphA* es una importante enzima responsable de la biodegradación de los PCB (Shumkova *et al.*, 2015). Dada su capacidad de utilizar el bifenilo como única fuente de carbono/energía, *Sphingobium yanoikuyae* B1 puede descomponer eficazmente una serie de PAHs monocíclicos y heterocíclicos (antraceno, bifenilo, naftaleno, tolueno, etc.) como única fuente (Cho *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2017b).

4.7. Fenazinas.

Las fenazinas son metabolitos secundarios bacterianos que contienen nitrógeno con un amplio espectro antibiótico y una extensa aplicación como agentes de control biológico frente a un conjunto de patógenos fúngicos de las plantas (Pierson y Pierson, 2010; Jin *et al.*, 2015).

Sin embargo, estos compuestos han presentado un impacto tóxico y peligroso para la salud humana y su destino de degradación en el medio ambiente sigue siendo desconocido. Tiene una notable capacidad para unirse y fotoclavar el ADN genético. Por consiguiente, es significativo explotar las características de biodegradación y biotransformación de los derivados de la fenazina (Peng *et al.*, 2018d).

Joyce *et al.*, (2010) revelaron que la fenazina tiene efectos tóxicos hacia los fibroblastos de la piel y Zhou *et al.*, (2013) en las células del hígado y la vejiga, cuando se utilizaron como subproducto desinfectante en la cloraminación del agua. Zhao *et al.*, (2017b) informaron de que la cepa B1 de *S. yanoikuyae* puede consumir fenazina como única fuente de energía de carbono para su crecimiento y desarrollo.

5. CONCLUSIONES.

El avance de la biotecnología ambiental ha conllevado la identificación de una gran cantidad de genes con potencial aplicado en la degradación de los contaminantes ambientales. Esto supone un gran progreso en la eficacia de las técnicas y/o tratamientos de biodegradación.

Con el crecimiento de las industrias están surgiendo nuevos contaminantes, y con ello la necesidad de utilizar técnicas que sean respetuosas con el medio ambiente y que ahorren en costes. Estas técnicas denominadas de biorremediación ayudan a restaurar las zonas contaminadas degradando y reduciendo la toxicidad de los contaminantes, para mejorarlas. Dado el espectacular avance en las técnicas de Ingeniería Genética, hoy día se pueden desarrollar organismos modificados genéticamente (OMG) que contribuyan al proceso de biorremediación. Así, contaminantes, como el petróleo, metales pesados, pesticidas, herbicidas, etc., que generan efectos negativos al ser humano, a organismos y a los ecosistemas, pueden ser extraídos y/o eliminados

mediando los OMGs. Concreto los OMG presentan capacidades aumentadas para minimizar estos efectos.

A pesar de que las investigaciones del desarrollo y utilización de los organismos modificados genéticamente sean positivas, su aplicación todavía presenta algunas dudas, ya que son vulnerables a los cambios y todavía generan controversias sobre su posible impacto sanitario, social y ambiental.

Por lo tanto, la ingeniería genética aplicada en la biorremediación ha mejorado considerablemente la situación en la que se encontraba el medio ambiente. Estas tecnologías siguen en continuo estudio, por lo que se seguirán mejorando y actualizando conforme mejoren las nuevas herramientas de edición genética, así como nuestra comprensión sobre el funcionamiento de los genes y genomas en múltiples especies.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Ahmed I, Iqbal HM, Dhama K (2017) Enzyme-based biodegradation of hazardous pollutants-an overview. *J. Exp. Biol. Agric. Sci* 5 (4), 402-411.

Aldhafiri S, Qayyum S, Husain Q (2018) Natural attenuation potential of polychlorinated biphenyl-polluted marine sediments. *Pol. J. Microbiol.* 67:37-48.

Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications, *Chemosphere* 91: 869-881, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.

Allan, C.M.; Heizer, P.J.; Tu, Y.; Sandoval, N.P.; Jung, R.S.; Morales, J.E.; Sajti, E.; Troutman, T.D.; Saunders, T.L.; Cusanovich, D.A.; et al. An upstream enhancer regulates Gpihbp1 expression in a tissue-specific manner. *J. Lipid Res.* 2019, 60, 869–879.

Almansoori AF, Hasan HA, Idris M, Abdullah SRS, Anuar N (2015) Potential application of a biosurfactant in phytoremediation technology for treatment of gasoline-contaminated soil, *EcoL Eng*, 84:113-120, ISSN 0925-8574, <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.08.001>.

Anastassiadis, K.; Fu, J.; Patsch, C.; Hu, S.; Weidlich, S.; Duerschke, K.; Buchholz, F.; Edenhofer, F.; Stewart, A.F. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Dis. Model. Mech.* 2009, 2, 508–515.

Aylward FO, McDonald BR, Adams SM, Valenzuela A, Schmidt RA, Goodwin LA, Woyke T, Currie CR, Suen G, Poulsen M. Comparison of 26 sphingomonad genomes reveals diverse environmental adaptations and biodegradative capabilities. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jun;79(12):3724-33. doi: 10.1128/AEM.00518-13.

Azubuike C.C.; Chikere C.B.; Okpokwasili G.C. (2016). "Biorremediation techniques-classification base don site of application: principles, advantages, limitations and prospects", *World J Microbiol Biotechnol* 32, (180). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>.

Baric M, Pierro L, Pietrangeli B, Papini MP (2014) Polyhydroxyalkanoate (PHB) as a slow-release electron donor for advanced in situ bioremediation of chlorinated solvent-contaminated aquifers, *New BiotechnoloGY* 31:377-382. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.008>.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007 Mar 23;315(5819):1709-12. doi: 10.1126/science.1138140.

Barr D (2002) Biological methods for assessment and remediation of contaminated land: case studies. Construction Industry Research and Information Association, London.

Bilal M, Adeel M, Rasheed T, Zhao Y, Iqbal HMN. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation - A review. *Environ Int.* 2019 Mar;124:336-353. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.011.

Bilal M, Asgher M, Parra-Saldivar R, Hu H, Wang W, Zhang X, Iqbal HMN. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants - A review. *Sci Total Environ.* 2017 Jan 15;576:646-659. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.137.

Bilal M, Iqbal HMN, Hussain Shah SZ, Hu H, Wang W, Zhang X. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. *J Environ Manage.* 2016 Dec 1;183(Pt 3):836-842. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.09.040.

Bilal M, Rasheed T, Iqbal HMN, Yan Y. Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction

mechanisms of industrial dyes. *Sci Total Environ.* 2018 Dec 10;644:1-13. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.274.

Bilal M, Rasheed T, Nabeel F, Iqbal HMN, Zhao Y. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation - A review. *J Environ Manage.* 2019 Mar 15;234:253-264. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.01.001.

Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv.* 2015 Jan-Feb;33(1):41-52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.

Cacioppo, J.A.; Koo, Y.; Lin, P.C.; Osmulski, S.A.; Ko, C.D.; Ko, C. Generation of an estrogen receptor beta-iCre knock-in mouse. *Genesis* 2016, 54, 38–52.

Carpenter A (2018) Oil pollution in the North Sea: the impact of governance measures on oil pollution over several decades. *Hydrobiologia* 1-19.

Chen Q, Wang CH, Deng SK, Wu YD, Li Y, Yao L... (2014) 418 Novel three-component Rieske non-heme iron oxigenase system catalyzing the 419 N-dealkylation of chloroacetanilide herbicides in sphingomonads DC-6 and DC-2. In *Apple* (Vol. 420, pp. 5078-5085).

Chikere CB, Okoye AU, Okpokwasili GC (2016) Microbial community profiling of active oleophilic bacteria involved in bioreactorbased crude-oil polluted sediment treatment. *J Appl Environ Microbiol* 4:1–20. doi:[10.12691/jaem-4-1-1](https://doi.org/10.12691/jaem-4-1-1).

Cho O, Choi KY, Zylstra GJ, Kim YS, Kim SK, Lee JH, Sohn HY, Kwon GS, Kim YM, Kim E. Catabolic role of a three-component salicylate oxygenase from *Sphingomonas yanoikuyae* B1 in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Feb 18;327(3):656-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.060.

Chumakov MI. Protein apparatus for horizontal transfer of agrobacterial T-DNA to eukaryotic cells. *Biochemistry (Mosc).* 2013 Dec;78(12):1321-32. doi: 10.1134/S000629791312002X.

Craig K. (2018) A Review of the Chemistry, Pesticide Use, and Environmental Fate of Sulfur Dioxide, as Used in California. In: de Voogt P. (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 246. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Continuation of Residue Reviews)*, vol 246. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/398_2018_11.

Cui, J.; Eitzman, D.T.; Westrick, R.J.; Christie, P.D.; Xu, Z.J.; Yang, A.Y.; Purkayastha, A.A.; Yang, T.L.; Metz, A.L.; Gallagher, K.P.; et al. Spontaneous

thrombosis in mice carrying the factor V Leiden mutation. *Blood* 2000, 96, 4222–4226.

Damalas, CA; Eleftherohorinos, IG Exposición a pesticidas, cuestiones de seguridad e indicadores de evaluación de riesgos. En t. J. Environ. Res. Salud pública 2011 , 8 , 1402-1419. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>.

Dangi AK, Sharma B, Hill RT, Shukla P. Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. *Crit Rev Biotechnol*. 2019 Feb;39(1):79-98. doi: 10.1080/07388551.2018.1500997.

de-Bashan L, Hernandez JP, Bashan Y (2012) The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation– A comprehensive evaluation, *Applied Soil Ecology*, Volume 61, Pages 171-189, ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>.

de Lig, J.; Veltman, J.A.; Vissers, L.E. Point mutations as a source of de novo genetic disease. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2013, 23, 257–263.

De Pourcq K, Ayora C, García-Gutiérrez M, Missana T, Carrera J (2015) A clay permeable reactive barrier to remove Cs-137 from groundwater: Column experiments, *J Environ Radioact* 149:36-42. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.06.029>.

Dias RL, Ruberto L, Calabro´ A, Balbo AL, Del Panno MT, Mac Cormack WP (2015) Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. *Polar Biol* 38:677–687. doi:[10.1007/s00300-014-1630-7](https://doi.org/10.1007/s00300-014-1630-7).

Dowling DN, Doty SL (2009) Improving phytoremediation through biotechnology, *Curr Opin Biotechnol* 20:204-206. Doi:10.1016/j.copbio.2009.03.007.

Eapen, S.; D’Souza, S.F. (2005). “Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals”, *Biotechnology Advances*, 23, pp. 97-114.

Ekkhunnatham, A., Jongsareejit, B., Yamkunthong, W. et al. Purification and characterization of methyl parathion hydrolase from *Burkholderia cepacia* capable of degrading organophosphate insecticides. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 1739–1746 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0985-y>.

Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:756120. doi: 10.1155/2015/756120.

ETec Environmental Technologies LLC (2013). "El cultivo de la tierra". ETec LLC.

Fagard M, Vaucheret H. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000;51:167-94.

Ferreira, L., Cobas, M., Tavares, T. et al. Evaluación de *Arthrobacter viscosus* como medio reactivo para la formación de una biobarrera reactiva permeable aplicada a la remediación de HAP. *Environ Sci Pollut Res* 20, 7348–7354 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1750-6>.

Firmino PIM, Farias RS, Barros AN, Buarque PMC, Rodríguez E, Lopes AC, dos Santos AB (2015) Understanding the anaerobic BTEX removal in continuous-flow bioreactors for ex situ bioremediation purposes. *Chem Eng J* 281:272–280. doi: [10.1016/j.cej.2015.06.106](https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.06.106).

Folch A, Vilaplana M, Amado L, Vicent R, Caminal G (2013) Fungal permeable reactive barrier to remediate groundwater in an artificial aquifer. *J Hazard Mater* 262:554–560. doi: [10.1016/j.jhazmat.2013.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.004).

Frutos FJG, Pérez R, Escolano O, Rubio A, Gimeno A, Fernandez MD, Carbonell G, Perucha C, Laguna J (2012) Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: evaluation of bioremediation technologies. *J Hazard Mater* 199:262–271. doi: [10.1016/j.jhazmat.2011.11.017](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.017).

Fulekar MH., Singh A., Bhaduri AM (2009) Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals. *Afr. J. Biotechnol.* 8 (4), 529-535.

Gallo, G., Lo Piccolo, L., Renzone, G. et al. Differential proteomic analysis of an engineered *Streptomyces coelicolor* strain reveals metabolic pathways supporting growth on n-hexadecane. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 1289–1301 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4046-8>.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25;109(39):E2579-86. doi: [10.1073/pnas.1208507109](https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109).

Gede Wenten I, Friatnasary DL, Khoiruddin K, Setiadi T, Boopathy R. Extractive membrane bioreactor (EMBR): Recent advances and applications. *Bioresour Technol.* 2020 Feb;297:122424. doi: [10.1016/j.biortech.2019.122424](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122424).

Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Mar;67(1):16-37, table of contents. doi: [10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003](https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003).

Germaine KJ, Byrne J, Liu X, Keohane J, Culhane J, Lally RD, Kiwanuka S, Ryan D, Dowling DN. Ecopiling: a combined phytoremediation and passive biopiling system for remediating hydrocarbon impacted soils at field scale. *Front Plant Sci.* 2015 Jan 5;5:756. doi: 10.3389/fpls.2014.00756.

Gibert, O., Cortina, JL, de Pablo, J. et al. Desempeño de una barrera reactiva permeable a escala de campo basada en sustrato orgánico y hierro de valencia cero para la remediación in situ de drenaje ácido de mina. *Environ Sci Pollut Res* 20, 7854–7862 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1507-2>.

Gidarakos E, Aivalioti M (2007) Large scale and long term application of bioslurping: the case of a Greek petroleum refinery site. *J Hazard Mater* 149:574–581. doi: [10.1016/j.jhazmat.2007.06.110](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.110).

Gomez F, Sartaj M (2014) Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *Int Biodeterior Biodegradation* 89:103–109. doi: [10.1016/j.ibiod.2014.01.010](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.010).

Gotthard G, Hiblot J, Gonzalez D, Elias M, Chabriere E. Structural and enzymatic characterization of the phosphotriesterase OPHC2 from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e77995. doi: 10.1371/journal.pone.0077995.

Gregorio SD, Gentimi A, Siracusa G, Becarelli S, Azaizeh H, Lorenzi R (2014) Phytomediated biostimulation of the autochthonous bacterial community for the acceleration of the depletion of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated sediments, *BioMed Res Int*. Doi: 10.1155/2014/891630.

Gu, B.; Posfai, E.; Rossant, J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. *Nat. Biotechnol.* 2018, 36, 632–637.

Guermouche M'rassi, A., Bensalah, F., Gury, J. et al. Aislamiento y caracterización de diferentes cepas bacterianas para la biorremediación de n-alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Environ Sci Pollut Res* 22, 15332-15346 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4343-8>.

Gundacker C, Gencik M, Hengstschläger M. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutat Res.* 2010 Oct;705(2):130-140. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.06.003.

Hemmer W. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/gmo_food.pdf, 2002.

Hobson A.M, Frederickson J, Dise NB (2005) CH₄ and N₂O from mechanically turned windrow and vermicomposting systems following in-vessel pre-treatment, Waste Manag 25, Issue 4, 2005, Pages 345-352, ISSN 0956-053X, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.015>.

Höhener P, Ponsin V (2014) In situ vadose zone bioremediation, Current Opinion in Biotechnology, Volume 27, Pages 1-7, ISSN 0958-1669, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.018>.

Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guid-Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* **31**, 827–832 (2013). <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.

Hu J, Adrion AC, Nakamura J, Shea D, Aitken MD. Bioavailability of (Geno)toxic Contaminants in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil Before and After Biological Treatment. *Environ Eng Sci*. 2014 Apr 1;31(4):176-182. doi: 10.1089/ees.2013.0409.

Iori, V., Pietrini, F., Cheremisina, A. *et al.* Respuestas al crecimiento, acumulación de metales y capacidad de fitoremediación en plantas de amaranto expuestas al níquel bajo hidroponía. *Agua, aire, suelo, Pollut* 224, 1450 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1450-3>.

Jacob JM, Karthik C, Saratale RG, Kumar SS, Prabakar D, Kadirvelu K, Pugazhendhi A. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. *J Environ Manage*. 2018 Jul 1;217:56-70. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.03.077.

James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA Brief, No. 49 Ithaca, NY. : ISAAA; 2014.

Jin K, Zhou L, Jiang H, Sun S, Fang Y, Liu J, Zhang X, He YW. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metab Eng*. 2015 Nov;32:30-38. doi: 10.1016/j.ymben.2015.09.003.

John Davison, GM plants: Science, politics and EC regulations, *Plant Science*, Volume 178, Issue 2, 2010, Pages 94-98, ISSN 0168-9452, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.12.005>.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829.

Joyce LE, Aguirre JD, Angeles-Boza AM, Chouai A, Fu PK, Dunbar KR, Turro C. Photophysical properties, DNA photocleavage, and photocytotoxicity of a series of dppn dirhodium(II,II) complexes. *Inorg Chem*. 2010 Jun 21;49(12):5371-6. doi: 10.1021/ic100588d.

JR Zupan, P. Zambryski, Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell, *Plant Physiology*, Volumen 107, Número 4, abril de 1995, páginas 1041–1047, <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1041>.

Kao CM, Chen CY, Chen SC, Chien HY, Chen YL (2008) Application of in situ biosparging to remediate a petroleumhydrocarbon spill site: field and microbial evaluation. *Chemosphere* 70:1492–1499. doi: [10.1016/j.chemosphere.2007.08.029](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.029).

Karimova, M.; Baker, O.; Camgoz, A.; Naumann, R.; Buchholz, F.; Anastassiadis, K. A single reporter mouse line for Vika, Flp, Dre, and Cre-recombination. *Sci. Rep.* 2018, 8, 14453.

Khan FI, Husain T, Hejazi R (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *J Environ Manag* 71:95–122. doi: [10.1016/j.jenvman.2004.02.003](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.003).

Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1 156-60.

Kim S, Krajmalnik-Brown R, Kim J-O, Chung J (2014) Remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated sites by DNA diagnosis-based bioslurping technology. *Sci Total Environ* 497:250–259. doi: [10.1016/j.scitotenv.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.002).

Kittel, J.A., R.E. Hinchee, R. Hoeppel, and R. Miller, 1994. Bioslurping - vacuum enhanced free product recovery coupled with bioventing: A case study, *Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals*.

Klümper W, Qaim M (2014) A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLOS ONE* 9(11):e111629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111629>.

Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2004) Rhizoremediation: a Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 7:6-15, doi: 10.1094/MPMI.2004.17.1.6.

Kurade MB, Waghmode TR, Kagalkar AN, Govindwar SP (2012) Decolorization of textile industry effluent containing disperse dye Scarlet RR by a newly developed bacterial-yeast consortium BL-GG. *Chem. Eng J.* 184, 33-41.

Lai, K.M.; Gong, G.; Atanasio, A.; Rojas, J.; Quispe, J.; Posca, J.; White, D.; Huang, M.; Fedorova, D.; Grant, C.; et al. Diverse phenotypes and specific transcription patterns in twenty mouse lines with ablated LincRNAs. *PLoS ONE* 2015, 10, e0125522.

Lanigan T.M.; Kopera H.C.; Saunders T.L. (2020). "Principles of Genetic Engineering", *Genes (Basel)*, 11(3):291. doi: 10.3390/genes11030291.

Lemaux P.G. (2008). "Genetically Engineered plants and foods: A Scientist's Analysis of the Issues (Part I)", *Annual Review of Plant Biology*, 59, pp. 771-812.

Li Z. Health risk characterization of maximum legal exposures for persistent organic pollutant (POP) pesticides in residential soil: An analysis. *J Environ Manage.* 2018 Jan 1;205:163-173. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.09.070.

Liu L.; Bilal M.; Duan X.; Iqbal H.MN. (2019). "Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria - Current challenges and future perspectives". *Sci Total Environ* 667, pp. 444-454. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.390>.

Liu Y, Mou H, Chen L, Mirza ZA, Liu L (2015) Cr (VI)-contaminated groundwater remediation with simulated permeable reactive barrier (PRB) filled with natural pyrite as reactive material: Environ factors and effectiveness, *J Hazard Mater* 298:83-90. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.007>.

Lloyd JR, Lovley DR, Macaskie LE (2003) Biotechnological Application of Metal-reducing Microorganisms, *Adv. Appl. Microbiol.* 53:85-128. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(03\)53003-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(03)53003-9).

Lu J, Guo C, Li J, Zhang H, Lu G, Dang Z (2014) Biodegradation of single pyrene and mixtures of pyrene by a fusant bacterial strain F14. *International Biodeterioration & Biodegradation* 87, 75-80.

Lubeck, B.A.; Lapinski, P.E.; Bauler, T.J.; Oliver, J.A.; Hughes, E.D.; Saunders, T.L.; King, P.D. Blood vascular abnormalities in *Rasa1*(R780Q) knockin mice:

Implications for the pathogenesis of capillary malformation-arteriovenous malformation. *Am. J. Pathol.* 2014, 184, 3163–3169.

Macdonald, L.E.; Karow, M.; Stevens, S.; Auerbach, W.; Poueymirou, W.T.; Yasenchak, J.; Friendewey, D.; Valenzuela, D.M.; Giallourakis, C.C.; Alt, F.W.; et al. Precise and in situ genetic humanization of 6 Mb of mouse immunoglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 5147–5152.

Maila MP, Colete TE (2004) Bioremediation of petroleum hydrocarbons through land farming: are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Rev Environ Sci Bio/Technol* 3:349–360. doi:[10.1007/s111157-004-6653-z](https://doi.org/10.1007/s111157-004-6653-z).

Martín Moreno C, González Becerra A, Blanco Santos MJ. (2004). “Tratamientos biológicos de suelos contaminados; contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación”, [Biological treatments for contaminated soils: hydrocarbon contamination. Fungal applications in bioremediation treatment]. *Rev Iberoam Micol*, 21(3), pp.103-20.

Mary-Dell Chilton, Martin H. Drummond, Donald J. Merlo, Daniela Sciaky, Alice L. Montoya, Milton P. Gordon, Eugene W. Nester, Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis, *Cell*, Volume 11, Issue 2, 1977, Pages 263-271, ISSN 0092-8674, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5).

Meagher B (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants, *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 3, Issue 2, Pages 153-162, ISSN 1369-5266, [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00054-0).

Mekuto L, Ntwampe SKO, Mudumbi JBN (2018) Microbial communities associated with the co-metabolism of free cyanide and thiocyanate under alkaline conditions, *3 Biotech*, 8 (2), 93.

Mesa J, Rodríguez-Llorente ID, Pajuelo E, Barcia Piedras JM, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E (2015) Moving closer towards restoration of contaminated estuaries: Bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metal rhizoaccumulation in native *Spartina maritima*, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 300, Pages 263-271, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.006>.

Michelle Christian, Tomas Cermak, Erin L Doyle, Clarice Schmidt, Feng Zhang, Aaron Hummel, Adam J Bogdanove, Daniel F Voytas, Targeting DNA Double-

Strand Breaks with TAL Effector Nucleases, *Genetics*, Volume 186, Issue 2, 1 de octubre de 2010, Páginas 757-761, <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>.

Min, Y.L.; Li, H.; Rodriguez-Caycedo, C.; Mireault, A.A.; Huang, J.; Shelton, J.M.; McAnally, J.R.; Amoasii, L.; Mammen, P.P.A.; Bassel-Duby, R.; et al. CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci. Adv.* 2019, 5, eaav4324.

Mishra S, Sarma PM, Lal B. Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Jun 15;235(2):323-31. doi: 10.1016/j.femsle.2004.05.002.

Mizuhashi, K.; Ono, W.; Matsushita, Y.; Sakagami, N.; Takahashi, A.; Saunders, T.L.; Nagasawa, T.; Kronenberg, H.M.; Ono, N. Resting zone of the growth plate houses a unique class of skeletal stem cells. *Nature* 2018, 563, 254–258.

Mohan SV, Sirisha K, Rao NC, Sarma PN, Reddy SJ (2004) Degradation of chlorpyrifos contaminated soil by bioslurry reactor operated in sequencing batch mode: bioprocess monitoring. *J Hazard Mater* 116:39–48. doi:10.1016/j.jhazmat.2004.05.037.

Ndimele PE (2017) *The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem*. Academic Press.

Neumann G, Teras R, Monson L, Kivisaar M, Schauer F, Heipieper HJ. Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: effects of toxicity and adaptation. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Apr;70(4):1907-12. doi: 10.1128/AEM.70.4.1907-1912.2004.

Nguyen TC, Loganathan P, Nguyen TV, Vigneswaran S, Kandasamy J, Slee D, Stevenson G, Naidu R. Polycyclic aromatic hydrocarbons in road-deposited sediments, water sediments, and soils in Sydney, Australia: Comparisons of concentration distribution, sources and potential toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014 Jun;104:339-48. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.010.

Obiri-Nyarko F, Grajales-Mesa SJ, Malina G (2014) An overview of permeable reactive barriers for in situ sustainable groundwater remediation, *Chemosphere* 111:243-259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.112>.

Palpant, N., Dudzinski, D. Nucleasas de dedos de zinc: mirando hacia la traducción. *Gene Ther* 20, 121-127 (2013). <https://doi.org/10.1038/gt.2012.2>.

Paudyn K, Rutter A, Rowe RK, Poland JS (2008) Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. *Cold Reg Sci Technol* 53:102–114. doi:[10.1016/j.coldregions.2007.07.006](https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2007.07.006)

Pavel Krenek, Olga Samajova, Ivan Luptovciak, Anna Daskocilova, George Komis, Jozef Samaj, Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications, *Biotechnology Advances*, Volume 33, Issue 6, Part 2, 2015, Pages 1024-1042, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>.

Peng H, Huan Q, Bilal M, Wang W, Zhang X (2018) Kinetics, mechanism, and identification of photodegradation products of phenazine-1-carboxylic acid. *Environ. Technol.* 1-31.

Pettibone, J.R.; Yu, J.Y.; Derman, R.C.; Faust, T.W.; Hughes, E.D.; Filipiak, W.E.; Saunders, T.L.; Ferrario, C.R.; Berke, J.D. Knock-in rat lines with Cre recombinase at the dopamine D1 and adenosine 2a receptor loci. *eNeuro* 2019,6.

Philp JC, Atlas RM (2005) Bioremediation of contaminated soils and aquifers. In: Atlas RM, Philp JC (eds) *Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, pp 139–236.

Pierson, L.S., Pierson, E.A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1659–1670 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3>.

Prokop G, Schamann M, Edelgaard I (2000) Management of contaminated sites in western Europe. European Environment Agency, Copenhagen.

Popp, M.W.; Maquat, L.E. Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine. *Cell* 2016, 165, 1319–1322.

Radek Jankele, Petr Svoboda, TAL effectors: tools for DNA Targeting, *Briefings in Functional Genomics*, Volumen 13, Número 5, septiembre de 2014, páginas 409–419, <https://doi.org/10.1093/bfpg/elu013>.

Ramírez EM, Jiménez CS, Camacho JV, Rodrigo MAR, Cañizares P (2015) Feasibility Of Coupling Permeable Bio-Barriers And Electrokinetics For The Treatment Of Diesel Hydrocarbons Polluted Soils, *Electrochim Acta* 181:192-199. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.02.201>.

Rasheed T, Bilal M, Nabeel F, Iqbal HMN, Li C, Zhou Y. Fluorescent sensor based models for the detection of environmentally-related toxic heavy metals. *Sci Total Environ*. 2018 Feb 15;615:476-485. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.126.

Rasheed T, Nabeel F, Adeel M, Bilal M, Iqbal HM (2019b) "Turn-on" fluorescent sensor.based probing of toxic Hg (II) and Cu (II) with potential intracellular monitorin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 17: 696-701.

Raymond, C.S.; Soriano, P. High-e ciency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS ONE* 2007, 2, e162.

Sanscartier D, Zeeb B, Koch I, Reimer K (2009) Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates, *Cold Regions Science and Technology*, 55:167-173. ISSN 0165-232X, <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2008.07.004>.

Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *J Taiwan Inst. Chem Eng*. 42 (1), 138-157.

Saravanan V, Rajasimman M, Rajamohan N (2015) Performance of packed bed biofilter during transient operating conditions on removal of xylene vapour. *Int J Environ Sci Technol* 12:1625–1634. doi:[10.1007/s13762-014-0521-3](https://doi.org/10.1007/s13762-014-0521-3)

Schneegurt MA, Jain JC, Menicucci Fr JA, Brown SA, Kemner KM, Garofalo DF *et al.*, Biomass byproducts for the remediation of waste Waters contaminated with toxic metals. *Environ Sci Technol* 2001; 35:3786.

Selvakumar, S., Manivasagan, R. & Chinnappan, K. Biodegradation and decolourization of textile dye wastewater using *Ganoderma lucidum*. *3 Biotech* 3, 71–79 (2013). <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0073-5>.

Silva-Castro GA, Uad I, Rodríguez-Calvo A, González-López J, Calvo C (2015) Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land- farming treatments. *Environ Res* 137:49–58. doi:[10.1016/j.envres.2014.11.009](https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.009).

Skarnes, W.C.; Rosen, B.; West, A.P.; Koutsourakis, M.; Bushell, W.; Iyer, V.; Mujica, A.O.; Thomas, M.; Harrow, J.; Cox, T.; et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 2011, 474, 337–342.

Smith E, Thavamani P, Ramadass K, Naidu R, Srivastava P, Megharaj M (2015) Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments:

evaluation of bioslurry and biopiling techniques. *Int Biodeterior Biodegradation* 101:56–65. doi:[10.1016/j.ibiod.2015.03.029](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.029).

Sobol Z, Schiestl RH. Intracellular and extracellular factors influencing Cr(VI) and Cr(III) genotoxicity. *Environ Mol Mutagen*. 2012 Mar;53(2):94-100. doi: 10.1002/em.20679.

Su D.;Wang, M.; Ye, C.; Fang, J.; Duan, Y.; Zhang, Z.; Hua, Q.; Shi, C.; Zhang, L.; Zhang, R.; et al. One-step generation of mice carrying a conditional allele together with an HA-tag insertion for the delta opioid receptor. *Sci. Rep.* 2017, 7, 44476.

Sui H, Li X (2011) Modeling for Volatilization and Bioremediation of Toluene-contaminated Soil by Bioventing, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Volume 19, Issue 2, Pages 340-348, ISSN 1004-9541, [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60174-2](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60174-2).

Sylvine L, Veenagaythri K (2016) Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Braz. J. Microbiol.* 47:39-46.

Thiruvengkatachari R, Vigneswaran S, Naidu R (2008) Permeable reactive barrier for groundwater remediation. *J Ind Eng Chem* 14:145-156. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2007.10.001>.

Torracchi C JE, Morel MA, Tapia-Vázquez I, Castro-Sowinski S, Batista-García RA, Yarzabal R LA. Fighting plant pathogens with cold-active microorganisms: biopesticide development and agriculture intensification in cold climates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Oct;104(19):8243-8256. doi: 10.1007/s00253-020-10812-8.

Tropel D, van der Meer JR. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Sep;68(3):474-500, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.68.3.474-500.2004.

US.EPA. 2006. Off-Gas Treatment Technologies for Soil Vapor Extraction Systems: State of the Practice. EPA-542-R-05-028.

van Hummel, A.; Bi, M.; Ippati, S.; van der Hoven, J.; Volkerling, A.; Lee, W.S.; Tan, D.C.; Bongers, A.; Ittner, A.; Ke, Y.D.; et al. No overt deficits in aged tau-deficient C57Bl/6.Maptm1 (EGFP)Kit GFP knockin mice. *PLoS ONE* 2016, 11, e0163236.

Van Aken B (2009) Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives, *Curr Opin Biotechnol* 20:231-236, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.011>.

Verma JP, Jaiswal DK (2016) Book review: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. *Front Microbiol* 6:1-2. doi: 10.3389/fmicb.2015.01555.

Whelan MJ, Coulon F, Hince G, Rayner J, McWatters R, Spedding T, Snape I (2015) Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions. *Chemosphere* 131:232–240. doi:[10.1016/j.chemosphere.2014.10.088](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.088).

Xiong, J.; Cawley, K.; Piemontese, M.; Fujiwara, Y.; Zhao, H.; Goellner, J.J.; O'Brien, C.A. Soluble RANKL contributes to osteoclast formation in adult mice but not ovariectomy-induced bone loss. *Nat. Commun.* 2018, 9, 2909.

Xu P, Ma W, Han H, Jia S, Hou B (2015) Isolation of a Naphthalene- Degrading Strain from Activated Sludge and Bioaugmentation with it in a MBR Treating Coal Gasification Wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol* 94:358–364. doi:[10.1007/s00128-014-1366-7](https://doi.org/10.1007/s00128-014-1366-7).

Yancheshmeh JB, Khavazi K, Pazira E, Solhi M (2011) Evaluation of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on cadmium uptake by canola and barley. *Afr J Microbiol Res* 5:1747-1754. Doi:10.5897/AJMR10.625.

Yang, H.;Wang, H.; Shivalila, C.S.; Cheng, A.W.; Shi, L.; Jaenisch, R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013, 154, 1370–1379.

Zhao Q, Yue S, Bilal M, Hu H, Wang W, Zhang X. Comparative genomic analysis of 26 *Sphingomonas* and *Sphingobium* strains: Dissemination of bioremediation capabilities, biodegradation potential and horizontal gene transfer. *Sci Total Environ.* 2017 Dec 31;609:1238-1247. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.249.

Zhou Y, Wei J, Shao N, Wei D. Construction of a genetically engineered microorganism for phenanthrene biodegradation. *J Basic Microbiol.* 2013 Feb;53(2):188-94. doi: 10.1002/jobm.201100322.

Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 2000 Jul;23(1):11-28. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00808.