

**ESTADO ACTUAL DE LA BIORREMEDIACIÓN REALIZADA POR
MICROORGANISMOS SOBRE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS DERIVADOS DEL PETRÓLEO.**

LUIS LEONARDO LUGO MANCILLA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2014

**ESTADO ACTUAL DE LA BIORREMEDIACIÓN REALIZADA POR
MICROORGANISMOS SOBRE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS DERIVADOS DEL PETRÓLEO.**

**LUIS LEONARDO LUGO MANCILLA
BIÓLOGO**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
QUÍMICA AMBIENTAL**

**DIRECTOR:
WELLMAN RIBÓN
BACTERIÓLOGO
ESPECIALISTA EN QUÍMICA AMBIENTAL
MAGISTER CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2014

DEDICATORIA

A mi esposa e hijos por su apoyo y paciencia para la dedicación del tiempo en la elaboración de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo y buenos consejos.

A todos los investigadores del tema citados en el trabajo.

A mi director de la monografía, el profesor Wellman Ribón, por su apoyo y persistencia.

A la profesora Marianny Combariza por sus tutorías y recomendaciones en la elaboración de este trabajo.

A Martha Elena Concha por su apoyo para este postgrado.

A Elizabeth Bravo por la información de las indicaciones a seguir.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	19
2. METODOLOGÍA.....	22
3. BIORREMEDIACIÓN	23
3.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS, CONTAMINANTES TRATADOS POR BIORREMEDIACIÓN.....	25
8.2 ESTRATEGIAS Y MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN	27
8.3 FUNDAMENTO A NIVEL BIOQUÍMICO DE LA BIODEGRADACIÓN	30
8.4 PRINCIPIOS BIOQUÍMICOS DEL METABOLISMO DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HAP.....	31
3.4.1 Catabolismo de los HAP por bacterias	32
3.4.2 Catabolismo de los HAP por hongos	37
3.4.2.1 Enzimas extracelulares del catabolismo de la lignina en hongos ligninolíticos.	38
8.4.2.2 El sistema del citocromo P450	41
8.5 FACTORES QUE DETERMINAN LA EFICACIA DE LA BIORREMEDIACIÓN	43
8.6 AVANCES EN BIORREMEDIACIÓN	44
4. CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Número de publicaciones de elementos y de citas publicados por año en bases de datos, en los últimos años para el tema de biorremediación en HAP. Tomado de la base de datos WEB OF SCIENCE 2014.....25
- Figura 2. Esquema de reacciones para la degradación aerobia y anaerobia de hidrocarburos. Tomado de (Maroto and Rogel, 2007).31
- Figura 3. Reacción de catálisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos por hongos con la acción de las enzimas peroxidasa de lignina, manganeso peroxidasa y lacasa. Tomada de (Peng et al., 2008).....40
- Figura 4. Importancia de los genes implicados en la degradación de dioxigenasa en HAP con bacterias gram-negativas y gram-positivas, en el suelo durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico. Tomado y adaptado al español de (Winqvist, E et al., 2014).....47
- Figura 5. Muestra los cambios en las concentraciones de los 16 HAP (A) y de 2(B), 3(C), 4(D), 5(E) y 6(F), concentraciones de anillos de HAP en mg kg^{-1} suelo seco _ SE. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012).51
- Figura 6. Concentraciones de HAP durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico. Tomado y adaptado al español de (Winqvist, E et al., 2014).53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos e Hidrocarburos biodegradados. Tomado de (Oliveira, R and Alves F, 2013).....	45
--	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Valores del crecimiento exponencial (log C) en funcionamiento del número de anillos en HAP de 3, 4, 5 y 6 anillos. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012).	72
Anexo B. Propuesta de las vías catabólicas de naftaleno por bacterias aeróbicas. Tomado de (Peng et al., 2008).....	73
Anexo C. Propuesta de las vías catabólicas de pireno por bacterias aeróbicas. Tomado de (Peng et al., 2008).	75
Anexo D. Propuesta de las vías catabólicas de benzo [α] pireno por bacterias aerobias. Tomado de (Peng et al., 2008).....	77
Anexo E. Vías metabólicas similares de HAP por mamíferos y hongos P450 monooxigenasa. Tomado de (Peng et al., 2008).	79
Anexo F. Concentraciones, degradación y bioaccesibilidad en experimentos de laboratorio con suelo contaminado por HAP. Tomado y adaptado al español de (Winquist, E et al., 2014).....	81
Anexo G. Concentraciones de cada uno de los 16 HAP reportados por la EPA, en un suelo contaminado por HAP. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012). 82	

LISTA DE TÉRMINOS

Aceptor de electrones: sustancia que en una reacción química acepta electrones, generando una reducción.

Aeróbico: proceso que tiene lugar en presencia de oxígeno disuelto. (Microorganismos que usan O_2 en su proceso de respiración).

Anaeróbico: proceso que tiene lugar en ausencia de oxígeno disuelto. (Microorganismo que solamente crecen y metabolizan en ausencia de oxígeno molecular).

Biorremediación: proceso basado en la utilización de microorganismos que tienen la capacidad de biodegradar compuestos simples y complejos a sustancias menos inocuas como el CO_2 y H_2O , asimilables en el ambiente.

Bacterias: microorganismos unicelulares procariotas, de metabolismo aeróbico y anaeróbico.

Bioestimulación: se basa en el uso de nutrientes, sustratos o aditivos con actividad superficial para estimular el crecimiento y buen desarrollo de los organismos selectivos que son capaces de biodegradar diferentes tipos de compuestos contaminantes del medio ambiente.

Bioaugmentación: se basa en la adición de organismos o enzimas a un material con el propósito de eliminar las sustancias indeseables.

Biodisponibilidad del contaminante: representa la fracción actual, tomada por las células, y puede causar efectos tóxicos, o puede ser biodegrada por mecanismos intracelulares.

Bioaccesibilidad del contaminante: llamada también, disponibilidad del medio ambiente, considera la fracción que está potencialmente disponible para la biota en los suelos.

Biodegradable: material de residuo que puede ser fácilmente descompuesto en el ambiente por la acción de seres vivos.

Bitumen: mezcla de líquidos orgánicos altamente viscosa, color negro, pegajoso, completamente soluble en disulfuro de carbono y compuesto principalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Calidad de agua: conjunto de características organolépticas, físicas, químicas y microbiológicas propias del agua.

Contaminación del agua: alteración de las características del agua, como resultado de las actividades humanas o procesos naturales, que la hacen peligrosa para el medio ambiente y su biota.

Contaminación del suelo: alteración de las propiedades químicas y físicas de las capas del suelo, generando su infertilidad, degradación y desertificación, que lo hacen peligroso para el medio ambiente y su biota.

Degradación: transformación de sustancias complejas en sustancias simples.

Donador de electrones: sustancia que en una reacción química cede electrones, generando una oxidación.

Ecosistema: sistema que integra la comunidad biótica y el ambiente abiótico, que interactúan de tal forma que el intercambio entre materias vivas y no vivas sigue una vía circular.

Enzima: proteína catalizadora producida en el interior de un organismo vivo que acelera reacciones químicas específicas.

Ex situ: características de una muestra fuera del sitio de su afloramiento.

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Hongo: organismo unicelular y pluricelular de células eucariotas.

Impacto ambiental: alteración o cambio del medio ambiente que se da como resultado directo o indirecto de actividades humanas.

In situ: características de una muestra en el mismo sitio de su afloramiento.

Metabolismo: transformaciones físicas y químicas que permiten la utilización de la materia y energía por parte de un organismo.

Microorganismo o microbio: ser vivo de tamaño microscópico, incluyendo archaeas, bacterias, virus, levaduras, algunos hongos, protozoos y algunas algas.

Nutriente: sustancia disuelta que es requerida por los organismos para su metabolismo.

Toxicidad: capacidad de una sustancia de causar daños en la salud de los seres vivos.

RESUMEN

TÍTULO: Estado Actual de la Biorremediación Realizada por Microorganismos sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos derivados del Petróleo*

AUTOR: Luis Leonardo Lugo Mancilla**

Palabras Claves: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP); Biodegradación; Biorremediación; Suelo contaminado; microorganismos.

Descripción

La propuesta plantea la elaboración de una monografía sobre el estado actual de los procesos de biorremediación por acción de microorganismos en matrices de agua o suelos contaminados con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) derivados del petróleo.

La biorremediación se define como un proceso en el que se incluye el uso de organismos vivos, como microorganismos, para transformar, contener o atenuar los contaminantes ambientales peligrosos como son los hidrocarburos expuestos por derrames de petróleo, que afectan aguas, suelos y la biota que habita en ellos. Este proceso de la biorremediación ha demostrado ser efectivo en la remoción de contaminantes en diferentes ecosistemas, los estudios de campo demuestran su efectividad en compuestos de hidrocarburos de elevado y bajo peso molecular como los HAP, mediante el manejo adecuado de factores que necesitan los consorcios microbianos capaces de biodegradar estos contaminantes. Hay que tener en cuenta el proceso metabólico de transformación de un contaminante, las características específicas del mismo como su peso molecular, solubilidad y los posibles géneros de microorganismos que participarían de manera eficiente en los procesos cometabólicos del HAP. De acuerdo con la información recopilada y analizada que nos ofrecen las investigaciones, los autores también describen algunas posibles estrategias de ayuda para la biodegradación como la biorremediación por bioestimulación o bioaumentación, mediante métodos en biopilas, hileras, entre otros y se identifican mecanismos de uso en la biorremediación para futuras soluciones a los problemas que se generan en el medio ambiente por el manejo del crudo en la industria petroquímica y la minería.

Esta monografía se constituirá en una herramienta bibliográfica útil, que impactará en posteriores trabajos de investigación en ciencias ambientales, aportando conocimiento de las técnicas de biorremediación y dar a conocer el impacto ambiental que generan los hidrocarburos como contaminantes y el daño que pueden causar en los ecosistemas.

* Monografía

** Facultad de Ciencias, Escuela de química, Especialización en Química Ambiental.
Director. Wellman Antonio Ribón. Magister en Ciencias Básicas.

ABSTRACT

Title: Current Status of Bioremediation Microorganisms Carried by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Petroleum derivatives*

Author: Luis Lugo Leonardo Mancilla **

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs); biodegradation; bioremediation; contaminated soil; microorganisms.

Description

The proposal involves the preparation of a monograph on the current state of bioremediation processes by microorganisms in water and soil matrices contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) derived from petroleum. Bioremediation is defined as a process in which the use of living organisms, such as microorganisms included, to transform, contain or mitigate the hazardous environmental pollutants such as hydrocarbons exposed to oil spills affecting water, soil and biota inhabits them.

This bioremediation process has proven effective in the removal of pollutants in different ecosystems; field studies demonstrate effectiveness in high hydrocarbon compounds and low molecular weight PAHs, through proper management of factors that need to microbial consortia able to biodegrade these pollutants. We must take into account the metabolic transformation of a pollutant, the specific characteristics of the same as its molecular weight, solubility and possible genres of microorganisms that participate effectively in the process of HAP cometabólicos. According to the information gathered and analyzed research that we provide, we also describe some possible assistance strategies for bioremediation and biodegradation by biostimulation or bioaugmentation, by methods biopiles, rows, etc. and use mechanisms identified in bioremediation for future solutions to the problems caused by environmental management of oil in the petrochemical industry and mining.

This monograph will be a useful reference tool, which will impact on subsequent research in environmental sciences, providing knowledge of bioremediation techniques and publicize the environmental impact generated hydrocarbons as pollutants and the damage it can cause to ecosystems.

* Monograph

** Faculty of Science, School of Chemistry, Specialization in Environmental Chemistry.
Director. Wellman Antonio Ribón. Magister in Basic Sciences

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos y aguas con hidrocarburos constituye en la actualidad uno de los impactos ambientales más negativos de la industria del petróleo (Benavides, J et al., 2006). La problemática está relacionada íntimamente con pérdidas que ocurren durante los procesos tradicionales de extracción, transporte y refinación del petróleo. Continuos derrames de petróleo a fuentes de aguas (superficiales, subterráneas) y suelos ha causado la acumulación en los ecosistemas de hidrocarburos alifáticos, aromáticos, resinas, fracciones complejas como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) y asfáltenos (Pineda and Mesta, 2001). Estos últimos están compuestos de estructuras extremadamente complejas típicamente policondensados con presencia de heteroátomos como nitrógeno, azufre, oxígeno, y metales pesados como el Vanadio y el Níquel (Solanas A, M, 2009). Estos compuestos ocasionan según las investigaciones a nivel de la industria petroquímica dificultades con procesos de operación en la refinación, afectando la calidad del crudo y cuando son liberados al medio ambiente se convierten en contaminantes ambientales tóxicos para los ecosistemas. Existen en la actualidad estudios científicos encaminados a la degradación de compuestos contaminantes del crudo, sin embargo, la mayor parte se encuentra orientada a moléculas de bajo peso molecular. Al aumentar la complejidad del contaminante se hace más difícil su proceso de remoción en el ambiente.

La biorremediación es una práctica que está tomando importancia a nivel mundial porque el aumento de la actividad industrial está degradando cada vez más los recursos naturales. Este proceso también es visto como un fenómeno común en la naturaleza, cuando en el ambiente o el ecosistema se produce un desequilibrio que puede ser captado por la explotación no sostenible de los recursos y de los sistemas naturales (González P, M, 2009). La biorremediación ha generado

buenas expectativas por su bajo costo y eficiencia en la remoción de contaminantes, el proceso depende de la concentración, la composición del residuo y la intervención de factores físico-químicos que le brindan a los microorganismos las condiciones óptimas de crecimiento. Los hidrocarburos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular presentes en el crudo son los contaminantes que presentan mejores resultados en estos procesos de biorremediación (Rosenberg et al., 1992). Sin embargo, componentes presentes en el crudo, como los hidrocarburos de alto peso molecular (generalmente estructuras poli condensadas) también son fácilmente asimilados por microorganismos o consorcios microbianos de una forma más lenta (Alexander, 2004). Después de los procesos tradicionales utilizados en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, como la biodegradación, extracción por solventes, incineración, remoción de tierra implementada en los derrames de crudo, se estima que los compuestos más pesados como los HAP, continúan en el medio ambiente. Esta problemática va en aumento en el mundo debido a la abundancia de los crudos pesados, ante esta perspectiva Colombia no es la excepción, debido a su diversidad de suelos ricos en este combustible fósil y su constante explotación (Benavides, J et al., 2006).

Los HAP son contaminantes hidrófobos orgánicos también generados por la producción de coque y la mayoría de procesos que requieren combustión (Cerniglia, C, E, 1992), y se encuentran con frecuencia en los sitios de zonas industriales. Estos contaminantes orgánicos se reconocen entre los contaminantes ambientales más peligrosos debido a su toxicidad, carácter mutagénico y efectos carcinogénicos (Keith and Telliard, 1979; Shaw and Connell, 1994). Según las investigaciones en el medio natural, estos compuestos sufren transformaciones que implican procesos bióticos y abióticos, como por ejemplo la volatilización, la adsorción, la fotólisis, oxidación química y la degradación microbiana, respondiendo a esta última de manera eficiente pero con lapsos de tiempo entre

los tres, seis e incluso hasta 24 meses dependiendo de la complejidad de la estructura del HAP (Lors, C et al., 2012).

Esta revisión bibliográfica intenta reunir a criterio del autor los principales aspectos de la biorremediación y su potencial en el tratamiento de desechos industriales en fuentes de suelos o aguas. Por lo cual el objetivo de este plan de monografía es realizar revisiones bibliográficas que permitan ofrecer una visión actualizada de la técnica de biorremediación por microorganismos aplicada a hidrocarburos aromáticos de elevado peso molecular. En las que se recopile información sobre los procesos de biorremediación para estos contaminantes, posteriormente proceder al análisis de estos documentos e identificar los principales géneros de microorganismos y factores operacionales que afectan el proceso.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Algunos países en vía de desarrollo como Colombia, han encontrado en el petróleo una creciente fuente de riqueza. Por lo cual durante la extracción, transporte y refinación del crudo ocurren derrames accidentales o intencionales, como es el caso actual de los ataques terroristas generados a los ductos de conducción que en el País causan contaminación en aguas y suelos afectando los ecosistemas (Benavides, J et al., 2006). Es relevante para nuestra situación actual, que en los sitios contaminados con hidrocarburos hasta hace pocos años prácticamente no existía una conciencia del grado de dificultad y del enorme costo de la recuperación de suelos, cuerpos de agua y atmósfera contaminados representando hoy para la sociedad un gran costo económico (Schmidt ,W, 2000). La descomposición por vía microbiana de los hidrocarburos es de considerable importancia económica y ambiental por las problemáticas que ocasionan. En ejemplo el impacto ambiental que generó lo ocurrido en marzo de 1989 cuando el superpetrolero Exxon Valdez chocó con varios icebergs en el estrecho del Príncipe Guillermo en Alaska, derramando 11 millones de galones de petróleo en el agua ocasionando un impacto ecológico inimaginable cuyo gasto de limpieza se estimó en (U\$ 1500 millones) (González P, M, 2009).

Los hidrocarburos derivados del petróleo han conllevado a participar en el deterioro de los ecosistemas, inclusive en gran magnitud para aquellos con elevado peso molecular como los HAP y los asfáltenos que de manera natural tienden a presentar largos periodos de tiempo en su biodegradación por microorganismos nativos del medio. Por lo cual varios métodos para su descontaminación se implementan a nivel mecánico y químico por la industria, pero sus resultados no han reflejado gran eficacia y además tienden a generar elevados costos. El proceso de biorremediación por microorganismos facilita que

estos compuestos se conviertan en sustancias menos tóxicas para su recolección por el ambiente y los seres vivos.

Estos componentes policondensados de los hidrocarburos han sido conocidos por pertenecer a la familia de los carcinógenos y contaminantes orgánicos neurotóxicos (Das, N. and Chandran, P, 2010). Según la literatura pueden haber más de 70 compuestos clasificados como HAP, de los cuales entre mayor tamaño molecular contengan están asociados a estos procesos cancerígenos, actuando también en muchos casos como disruptores endocrinos que a la vez provocan un estrés oxidativo en las células, por lo que representan un importante peligro para la salud humana (Clemente, A et al., 2001). Hay que resaltar que los HAP se producen en grandes cantidades principalmente por los derrames de crudo, sin descartar los nombrados anteriormente y entre otros procesos de gasificación de carbón y el uso de fuentes de combustión incompleta, tales como tubos de escape de automóviles, plantas de generación de energía y emisiones de la quema de los combustibles fósiles (Cerniglia, C, E et al., 1985; Dipple, A et al., 1990).

Una investigación realizada en 1981 por el Instituto Americano de Petróleo (API) identificó entre las principales fuentes de contaminación: lodos de perforación de tipo inversa y recortes, suelos contaminados por derrames de tuberías corroídas, zonas de acumulación en desechos aceitosos semisólidos, sitios contaminados por descargas petroquímicas y refinerías (Benavides, J et al., 2006).

La biorremediación puede mostrar en algunos casos alcances limitados, por ejemplo cuando hay una alta concentración de HAP y principalmente de los asfáltenos (Pineda-Flores et al., 2001). El uso de microorganismos para la remediación de ecosistemas contaminados ha ganado especial interés como técnica promisoría en comparación con prácticas convencionales que todavía se llevan a cabo. De las cuales tenemos, el relleno en tierra, incineración, extracción por solventes, procesos químicos y físicos en general (Costa, 2011; Ferrari, 1996).

Gracias a las investigaciones en bioensayos o experimentos microcosmos se ha demostrado una posible solución a muchos contaminantes generados por esta actividad minera, se conoce que los consorcios microbianos utilizan estos contaminantes como fuente de energía y carbono, lo cual conlleva a pensar en una gran alternativa de manera viable o prometedora para biodegradar los derivados complejos del petróleo. En conjunto existen mecanismos que se destacan en apoyo a los consorcios microbianos como la fotooxidación, adición de enzimas, biosurfactantes generados por los mismos microbios, fitorremediación y uso de biorreactores en el suelo. (Pineda-Flores et al., 2001).

Estos procesos generan que de esta manera se puedan fraccionar las ramificaciones de hidrocarburos con anillos policondensados y puedan ser metabolizados por los microorganismos.

Actualmente los trabajos realizados para la degradación de los HAP han reflejado en metodologías como la estimulación o adición de consorcios microbianos un buen desarrollo más desde un punto de vista teórico que experimental para el caso de la industria, por lo cual se necesitan más evidencias que puedan servir como fundamentos de permanencia, claro está sin dejar de resaltar lo demostrado en las investigaciones.

Es importante generar una visión actualizada sobre el impacto de la biorremediación por los microorganismos en los HAP, que nos permita analizar algunos de los posibles mecanismos de mejor eficacia en la actualidad y con fácil uso para estos contaminantes a través de la industria y así puedan ser implementados en la práctica, iniciándose la disminución de las fuentes generadoras de contaminación a nivel mundial.

2. METODOLOGÍA

La elaboración de la monografía llevó a cabo los siguientes pasos:

- Realización de una búsqueda bibliográfica y estado del arte por medio de la biblioteca virtual con algunas de las bases de datos de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Empleando palabras claves para la búsqueda de información como: bioremediation, bioremediation of PAHs, bioremediation by microorganisms, biodegradation of PAHs, biorremediación de suelos, biorremediación de HAP.
- Análisis de la información, para evidenciar los productos orgánicos derivados del petróleo como los HAP, sus procesos de biorremediación y los principales microorganismos degradadores de los mismos. Mediante el apoyo de estudios publicados en artículos y *review* de revistas científicas en el idioma inglés, portugués y español, que comprenden un período entre los años 1980 y 2014. Estas obras son recopiladas a través de la búsqueda en las bases de datos de la (UIS) como: SCOPUS, CRCnetBASE, E-Libro, SCIENCE@DIRECT, WEB OF SCIENCE, entre otras y servidores externos como: PubMed y Google Scholar.
- Realización de reuniones periódicas de avances de la monografía con la asesoría de profesionales que conllevaron a un análisis y corrección de la información, el Docente Wellman Ribón y la Docente Marianny Combariza; Director de la monografía y Directora del Programa de Especialización.
- Elaboración del informe final que refleja la recopilación, redacción y análisis de la temática con el apoyo de los recursos y herramientas técnico-científicos que suministran la información.

3. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es un proceso basado en la utilización de microorganismos que tienen la capacidad de biodegradar compuestos simples y complejos a sustancias menos inocuas y asimilables en el ambiente (Solanas A, M, 2009).

El empleo de microorganismos conocidos experimentados para el tratamiento de los desechos potencialmente tóxicos ya es una práctica habitual en muchos países desarrollados. La metodología es una forma natural de degradación de compuestos químicos que se encuentran en la naturaleza y es la forma en que se reciclan los nutrientes en los ambientes naturales (González P, M, 2009). Los derrames de hidrocarburos constituyen una amenaza para la vida, sin embargo las investigaciones demuestran la existencia en la naturaleza de agentes microbianos capaces de metabolizarlos.

Históricamente una de las técnicas más antiguas utilizadas como biorremediación fue el compostaje, en donde los residuos y derivados de la recolección domiciliaria (restos orgánicos, inorgánicos, residuos industriales, etc.) eran incluidos en containers permitiendo que pudieran ser biodegradados por microorganismos (Senior and Balba, 1990). Actualmente el proceso de biorremediación se caracteriza por qué desintoxica y elimina los contaminantes en gran variedad mediante diferentes vías metabólicas de los microorganismos (Medina-Bellver et al., 2005). La biorremediación de suelos o zonas de aguas contaminadas con crudo, dependen de la capacidad para establecer y mantener las condiciones apropiadas en los microorganismos y así favorecer el proceso, de lo contrario la eficiencia disminuye. Un requisito importante es generar en estas poblaciones las tasas óptimas de crecimiento asegurando la concentración de nutrientes, oxígeno disuelto en el medio, un pH adecuado, las características físico-químicas del aceite en la zona, la cantidad y tipo de hidrocarburos que se puedan presentar (Das, N and Chandran, P, 2010). Los factores que intervienen en la

biorremediación son complejos y pueden variar dependiendo de la aplicación de la técnica. Tanto así que pueden llegar a ser difícil de distinguir entre los factores bióticos y abióticos que contribuyen con la biorremediación. (González P, M, 2009).

La biorremediación es una alternativa sostenible en comparación de otros métodos de tratamiento, como el tratamiento térmico y la estabilización del bitumen (Khan et al., 2004). La biorremediación requiere mucha menos energía que el tratamiento térmico. Además, la materia prima para la estabilización del bitumen se deriva del petróleo y la solución no puede ser considerada como final porque los contaminantes no se degradan totalmente. (Winqvist, E et al., 2014).

El Reglamento N° 850/2004 propuesta por la Comunidad Europea (2004) declara: "El contenido de contaminante orgánico persistente en los residuos debe ser destruido o irreversiblemente transformado en sustancias que no presenten características similares, salvo que sean preferibles otras operaciones con el medio ambiente." Por lo tanto, los métodos de tratamiento que en realidad destruyen los contaminantes deben ser siempre la primera opción.

La Biorremediación de la contaminación generada por residuos derivados del petróleo como las resinas, asfáltenos y los HAP principalmente, son una de las mayores problemáticas como se expone anteriormente, por lo cual es un tema de interés y de crecimiento en la actualidad. Según el informe que reflejan las citas de los elementos de origen indexados en todas las bases de datos reportado en la WEB OF SCIENCE, el tema de Biorremediación en Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), ha tenido bastante relevancia e interés por los investigadores, reportando cerca de 741 citas en todas las bases de datos según los estudios publicados en los últimos 20 años, con un promedio de 70 publicaciones por año entre el 2012-2013 y aproximadamente 25 publicaciones en lo corrido del 2014. Como lo evidencia la siguiente gráfica:

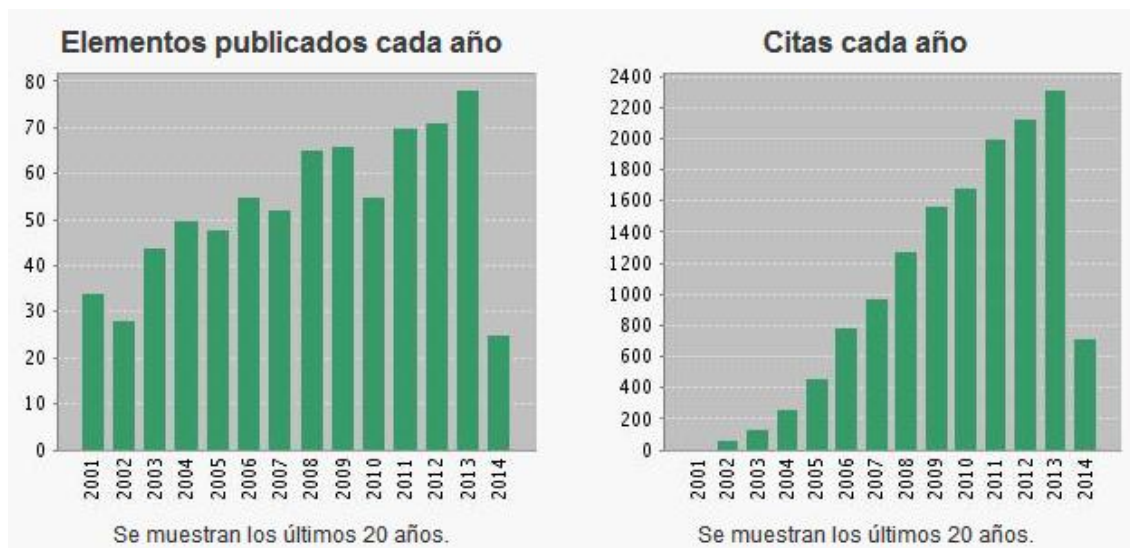


Figura 1. Número de publicaciones de elementos y de citas publicados por año en bases de datos, en los últimos años para el tema de biorremediación en HAP.

Tomado de la base de datos WEB OF SCIENCE 2014.

3.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS, CONTAMINANTES TRATADOS POR BIORREMEDIACIÓN

Los HAP, como compuestos químicos de átomos de carbono e hidrógeno, se disponen en forma de dos o más anillos aromáticos policondensados, que entre más anillos posean se hacen más complejos y difíciles de biodegradar, debido a la posibilidad de ramificación de un número variable de los constituyentes y de las diferentes posiciones en las que pueden unirse entre sí. Estas estructuras bencénicas que los forman ya sea de manera simple o múltiple forman cadenas o racimos y cuanto más anillos tengan el compuesto más resistente será a la actividad enzimática. (Atlas, 1981).

En la actualidad las investigaciones reportan más de 100 HAP reconocidos por la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) (Josemar, R et al., 2007). Sin embargo, sólo 16 HAP están clasificados por la US-EPA y se consideran con función importante en la industria minera y la toxicología

ambiental. De los cuales tenemos: Acenaftalenos, Acenaftilenos, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(g,h,i)pireleno, Criseno, Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Fluoranteno, Fluoreno, Indeno(1,2,3-c,d)pireno, Naftaleno y pireno (Potin et al., 2004). Estos compuestos varían en las zonas contaminadas principalmente por su estructura dispuesta nombrada anteriormente, desde 2, 3, 4, 5 en inclusive hasta 6 anillos de benceno enlazados, presentándose desde los de más bajo peso molecular hasta los de mayor peso molecular como es el caso del Benzo(g,h,i)perileno y el Indeno(1,2,3-c,d)pireno. Gran variedad de estos compuestos orgánicos no volátiles son encontrados en suelos contaminados en donde los niveles de estos varían, el suelo tiene la capacidad de absorber estos compuestos y muchos son volatilizados en la atmósfera, pero son los microorganismos los principales degradadores de aquellos no volátiles (Crawford et al., 1993).

Según los investigadores Cerniglia y Heitkamp (1989) sugirieron ocho principios aplicados a la degradación de los HAP:

1. Una gran variedad de microbiota entre bacterias, hongos y algas tienen la habilidad de degradarlos.
2. La hidroxylación de los HAP incorpora metabolismo aerobio.
3. Las bacterias metabolizan los HAP con un ataque inicial de una dioxigenasa para dar cis-dihydrodiol que además es oxidado para formar dihidroxidos.
4. HAP con más de 3 anillos de benceno, entre estos los fenantrenos, no sirven como sustrato para el crecimiento bacteriano lo que hace que deba estar sujeto a una transformación co-metabólica.
5. En consorcios microbianos manipulados genéticamente muchos de sus genes son codificados por plásmidos.
6. HAP de bajos pesos moleculares como el naftaleno de 2 anillos son degradados rápidamente, mientras que aquellos de alto peso como el antraceno o el benzopireno de 5 anillos o más son muy resistentes.

7. La biodegradación ocurre con mayor eficiencia en la interface sedimento/agua.
8. La adaptación microbiana puede ocurrir por continuas exposiciones a los HAP.

8.2 ESTRATEGIAS Y MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN

Las técnicas de biorremediación pueden ser clasificadas según el tratamiento y la fase usada. Diversas estrategias se han implementado para la biorremediación de suelos o aguas contaminadas con hidrocarburos por la acción de microorganismos, por lo cual los estudios han cubierto algunos factores que influyen en la velocidad de la biodegradación del petróleo (Ulrici, W, 2000), (Foght, J, M et al., 1987). La aplicación del proceso de biorremediación puede ser "*in situ*", cuando el tratamiento del suelo se realiza sin excavar o "*ex situ*", cuando se lleva a cabo la excavación del suelo. También "*on site*", dependiendo si se trata en el mismo lugar o "*off site*", al desplazarse a un laboratorio el material contaminado (Solanas A, M, 2009).

En la biorremediación para tener éxito los microorganismos o sus enzimas, necesitan estar en contacto físico con el contaminante orgánico. Las propiedades del suelo y del tipo de contaminante determinan la biodisponibilidad y bioaccesibilidad (Harms, 2011). Biodisponibilidad representa la fracción que está actualizada, tomada por las células, y puede causar efectos tóxicos, o puede ser biodegrada por mecanismos intracelulares. El término bioaccesibilidad, a menudo llamada también la disponibilidad del medio ambiente, considera la fracción que está potencialmente disponible para la biota en los suelos (Čvančarová et al., 2013).

Los procesos de biorremediación demuestran que han generado un mayor rendimiento de manera aerobia, por lo cual la zona debe estar completamente aireada y se desarrolla mediante técnicas implementadas en la bioestimulación y bioaumentación. La primera se basa en el uso de nutrientes, sustratos o aditivos con actividad superficial para estimular el crecimiento y buen desarrollo de los

organismos selectivos que son capaces de biodegradar diferentes tipos de compuestos contaminantes del medio ambiente (Baheri, H and Meysami, P, 2002; Núñez, R, 2003). Mientras que la técnica de bioaumentación se basa en la adición de organismos o enzimas a un material con el propósito de eliminar las sustancias indeseables (Shmaefsky, 1999). Esta bioaumentación asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado, en la biodegradación se reducen los contaminantes de bajo y alto peso molecular a escalas con resultados diferentes (Advanced BioTech, 2000).

En las zonas contaminadas por derrames, las fracciones de hidrocarburos más volátiles se evaporarán con facilidad dejando a los componentes alifáticos, aromáticos y polinucleares más complejos para ser oxidados por diversos grupos de microorganismos nativos presentes en la zona. Los procesos de biorremediación, tales como tratamiento en tierra, se pueden llevar a cabo por mecanismos de biotratamientos a nivel de biopilas, bio-lodos, por hileras entre otros, que se basan en el aumento de la actividad microbiana mediante la optimización de las condiciones de biodegradación, esto quiere decir que la biorremediación en estos métodos se genera por medio de bioestimulación (Atlas and Bartha, 1992; Namkoong et al., 2002; Sarkar et al., 2005).

Los estudios demuestran que las medidas biocorrectoras se emplean en la descontaminación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos desde hace décadas con importante éxito. Estas técnicas biológicas pueden ser de tipo aerobio (medio oxidante) o bien de tipo anaerobio (medio reductor). Existen tres tipos de medidas biocorrectoras de tipo aerobio: la ventilación forzada del aire en el suelo o *bioventing*, el compostaje de suelos o biopilas, anteriormente enunciada y la biorrecuperación natural del suelo o atenuación natural (Maroto and Rogel, 2007).

Cada uno de estas medidas precisa de unos parámetros de evaluación adecuados, que deben encontrarse en un intervalo óptimo para que la aplicación de dicha técnica sea factible y efectiva. También es importante la existencia de poblaciones de microorganismos autóctonos de la zona capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente carbono y de energía. A la vez, es necesario un determinado número de aceptores de electrones que enzimáticamente oxiden los carbonos procedentes de los hidrocarburos, así como unas condiciones óptimas del medio y la concentración de los contaminantes. (Maroto and Rogel, 2007). Según estudios llevados a cabo en los derrames de petróleo, demuestran que el número de bacterias oxidantes nativas aumenta de 10^3 a 10^6 veces en muy poco tiempo y con condiciones favorables, más del 80 % de los componentes no volátiles son oxidados entre 6 meses y un año del derrame. En el caso de los hidrocarburos de cadena ramificada y los policíclicos, permanecen mucho más tiempo en el ambiente principalmente si llegan a zonas anaerobias ocasionando perjuicios a largo plazo (González P, M, 2009).

Actualmente entre los mecanismos que se han implementado para la biodegradación de hidrocarburos derivados del petróleo, se cita el uso de biosurfactantes generados por los agentes microbianos, células inmovilizadas, técnicas *ex situ* como el “landfarming” y el uso de biorreactores en los suelos (Das, N. and Chandran, P, 2010). Hay que tener presente que la biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico (Benavides, J et al., 2004). Solo un número limitado de pruebas a escala piloto, a nivel de laboratorio y pruebas de campo han proporcionado las demostraciones más convincentes de esta tecnología de biorremediación (Benavides, J et al., 2004).

Se debe manejar un esquema de diseño y una aplicación de los sistemas de biotratamientos (Maroto and Rogel, 2007). En los cuales se establezca las etapas del trabajo, por ejemplo:

1. Realizar una investigación y caracterización de la contaminación y del emplazamiento.
2. Realizar un análisis y la elección de las medidas biocorrectivas.
3. Tener en cuenta la efectividad del sistema elegido.
4. Diseñar y desarrollar la evaluación del sistema.
5. Evaluación del control y seguimiento al sistema.
6. Generar un análisis e interpretación de resultados

8.3 FUNDAMENTO A NIVEL BIOQUÍMICO DE LA BIODEGRADACIÓN

El fundamento se basa en la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células o microorganismos, de la cual se produce una serie de reacciones redox cuyo fin es la obtención de energía. Y esta cadena la inicia un sustrato orgánico los cuales son los compuestos hidrocarbonados, que son externos a la célula y que actúan como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Maroto and Rogel, 2007).

Según las investigaciones los aceptores de electrones más comunes utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono (Maroto and Rogel, 2007). Por lo cual de esto depende si el proceso es aeróbico (con O₂) o anaeróbico (con SO₄⁻ o CO₂) (Figura 2).

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:

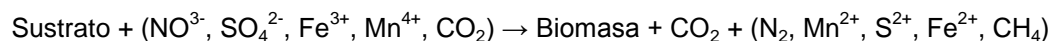


Figura 2. Esquema de reacciones para la degradación aerobia y anaerobia de hidrocarburos. Tomado de (Maroto and Rogel, 2007).

8.4 PRINCIPIOS BIOQUÍMICOS DEL METABOLISMO DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HAP.

Según las investigaciones existen especies de microorganismos como las bacterias que se consideran los agentes más activos en la degradación de los hidrocarburos del petróleo y funcionan como controladores de estas mezclas derramadas en el ambiente. Por lo cual existe la necesidad de aislar y seleccionar consorcios bacterianos óptimos, debido a que no todos los microorganismos del medio tienen la capacidad para biodegradar los hidrocarburos de alto peso molecular, lo cual justifica esta necesidad buscando un uso de biorremediación adecuado en la zona contaminada (Alexander, 1999).

Las bacterias se han implicado en la degradación de los HAP a través de procesos metabólicos o transformaciones de co-metabolismo. Las vías bioquímicas normales del metabolismo bacteriano de los HAP han sido una gran evidencia en la eficiencia del proceso de biodegradación. Los HAP de bajo peso molecular tales como naftaleno, fenantreno y antraceno, por lo general se degradan fácilmente por las bacterias en el suelo y en condiciones de laboratorio (Peng et al., 2008). Desde los estudios iniciales de Heitkamp et al., 1988a, en la degradación bacteriana del HAP de la familia del pireno, han habido numerosos informes que describen la oxidación microbiana de los HAP de cuatro anillos. En los últimos años según los estudios con bacterias del género *Sphingomonad*, se establece que son dotadas con una notable capacidad de crecer en HAP de cuatro anillos de la familia del criseno, utilizándolo como su única fuente de carbono y energía (Willison, 2004). Sin embargo, se conoce menos sobre las bacterias capaces de utilizar los HAP de alto peso molecular que contienen cinco o más anillos, como el benzo[α]pireno y benzo[α]antraceno entre otros. Los mecanismos

implicados en la degradación de los HAP con más de cinco anillos no están muy claros ya que estos requieren de mayor complejidad (Peng et al., 2008).

En otros organismos como los hongos se ha comprobado que son capaces de biodegradar los HAP. Dentro de estos se encuentran algunos hongos filamentosos como basidiomicetos, hongos de la pudrición blanca y deuteromicetes. Las investigaciones han demostrado que eliminan los HAP de una forma más competente que las bacterias. En la biodegradación de familias de HAP por hongos se incluyen el naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo[α]pireno, fluoreno, dibenzotiofeno, catecol, benzo[α]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, benzo[b]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno (Zheng and Obbard, 2003). Al menos dos mecanismos involucrados reportan los investigadores en la biodegradación por parte de los hongos: uno utiliza el sistema de citocromo P-450 (Yadav et al., 2006) y el otro utiliza enzimas extracelulares solubles del catabolismo de la lignina, en las que se incluyen peroxidasas de lignina (LiP), la peroxidasa de manganeso (MnP) y lacasas (Steffen et al., 2003).

En la última década, muchos microorganismos han sido aislados y son capaces de generar la mineralización de los HAP, lo cual ha llevado al conocimiento de muchos genes implicados en los procesos catabólicos de estos hidrocarburos por las bacterias y hongos.

3.4.1 Catabolismo de los HAP por bacterias

Las bacterias utilizan estos contaminantes como su fuente de energía y carbono, por lo cual las vías comunes bioquímicas para la degradación bacteriana de los HAP, tales como naftaleno, fenantreno, antraceno y acenaftaleno han sido de gran interés en las investigaciones (Dean-Ross et al., 2002; Pinyakong et al., 2004). Diversos mecanismos de Biodegradación requieren la presencia de oxígeno molecular para iniciar el ataque enzimático de los anillos del HAP. Inicialmente se

genera una oxidación catalizada por la enzima dioxigenasa que tiene lugar generalmente en sistemas bacterianos aerobios, produciendo vecinales cis-dihydrodiols como los primeros bioproductos de un sistema enzimático multicomponente (Peng et al., 2008). Estos intermediarios dihidroxilados pueden ser escindidos por intradiol o estradiol dioxigenasas en un anillo de escisión a través de una orto vía de la escisión o de una meta-vía de la escisión (Peng et al., 2008), dando lugar a intermediarios centrales como protocatechuates y catecoles que se convierten además en los ácidos tricarbóxicos (TCA) que son intermediarios del ciclo (Gibson and Parales, 2000).

Las dioxigenasas son enzimas responsables de la formación de cis-dihydrodiols en sustratos arenosos con los HAP, que parecen ser los más metabolizados por las bacterias. Por lo general, se han encontrado que estos microorganismos contienen sistemas de enzimas con múltiples componentes que implican varias proteínas, iones de hierro y además requieren de NADH deshidrogenasa (Peng et al., 2008).

Actualmente los microorganismos que contiene dioxigenasas tienen la obtención de una buena serie de fuentes de carbono, estas enzimas se han clasificado por ejemplo, en hidrocarburos aromáticos como el tolueno, en hidrocarburos polinucleares como el naftaleno y el bifenilo, entre otros. Los toluenos debido a su bajo peso molecular han sido los más adecuados para la cis-dihidroxiación. Sin embargo, hay una limitación de tamaño en la aceptabilidad del sustrato para el tolueno; por no ser una molécula voluminosa, muestra malos encajes en el sitio activo de esta enzima (Peng et al., 2008). Mientras que para los HAP como naftalenos y bifenilos, son capaces de catalizar la dihidroxilación, por enzimas que metabolizan HAP compuestos por tres o más anillos (Boyd and Sheldrake, 1998).

En los HAP de bajo peso molecular como el naftaleno, el sistema dioxigenasa bacteriano es particularmente útil para la oxidación de sustratos de HAP con dos y

tres anillos de benceno, tales como fenantreno, antraceno y el mismo naftaleno. Este sistema del naftaleno dioxigenasa es un sistema enzimático de varios componentes, que incluyen generalmente una oxido reductasa de NADH, una ferredoxina y un componente oxigenasa que contiene el sitio activo de la enzima (Boyd and Sheldrake, 1998). Hay que tener en cuenta que la oxidación de los compuestos reductores permiten la activación del oxígeno molecular, que es un requisito previo para la dihidroxilación de este sustrato (Ferraro et al., 2006). Las bacterias degradadoras de naftaleno se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Hasta ahora las dioxigenasas de naftaleno se han purificado y caracterizado ampliamente de diferentes cepas de bacterias y el control genético de las rutas implicadas en la degradación de naftaleno se ha estudiado en detalle, como lo muestra la figura (ver anexo 2) (Peng et al., 2008).

Como se describió anteriormente, muchas bacterias que contienen las enzimas implicadas en la conversión de naftaleno a salicilato pueden también degradar fenantreno (Seo et al., 2007). Dentro de las cuales encontramos las de genero *Sphingomonads* descritas anteriormente. Antraceno y fluoreno son otros de los HAP que se encuentra en altas cantidades en entornos contaminados y una variedad de especies bacterianas como las cepas de *Mycobacterium sp* y *Terrabacter sp*, tienen la capacidad de utilizarlos como su única fuente de carbono y energía (Wick et al., 2002).

Por otra parte al referirnos a los HAP de alto peso molecular, es posible afirmar que la relación entre los HAP persistentes en el medioambiente va de acuerdo con el creciente número de anillos de benceno que contengan estos contaminantes (Cerniglia, 1997). Es importante saber que la vida media de una molécula de tres anillos como el fenantreno en un suelo y sedimentos contaminados puede oscilar entre 16 y 126 días, mientras que la vida media de una molécula de cinco anillos como el benzo [α] pireno (BaP), pueden oscilar desde 229 hasta 1.400 días (Shuttleworth and Cerniglia, 1995). La estabilidad electroquímica y la

hidrofobicidad son dos factores cruciales para la acreción de los HAP de alto peso molecular en el medio ambiente (Harms and Bosma, 1997). El primer informe de la biodegradación de HAP de alto peso molecular se presentó en 1975 por Gibson et al, identificando dos productos del metabolismo del B α P a partir de una solución de cultivo de un mutante, el *Beijerinckia sp.* (Gibson et al., 2000). Sin embargo, en 1988 por primera vez las bacterias que podrían degradar los HAP con cuatro anillos aromáticos se aislaron debajo de los sedimentos de un campo de petróleo por Heitkamp y Cerniglia (Heitkamp and Cerniglia, 1988).

El Pireno es uno de los HAP compuesto por cuatro anillos que a menudo se ha utilizado como modelo para la biodegradación de HAP de alto peso molecular (Peng et al., 2008). Un número de cepas aisladas de bacterias se han demostrado que mineralizan Pireno, la mayoría de estas cepas son conocidas como *Nocardioform actinomicetos* y los miembros del género *Mycobacterium* y *Rhodococcus* (Peng et al., 2008).

Múltiples vías de degradación de pireno se han ofrecido para el *Mycobacterium vanbaalenii* de cepa PYR-1, incluyendo dioxigenación típica y monooxigenación (Brezna et al., 2005). Aunque cepas de *Mycobacterium* pueden oxidar pireno a través de dioxigenación, en las posiciones 1,2 y el metabolito forma derivados metilados de pireno-1,2-diol, el producto final será 4-hidroxi-perinaphthenone. La principal vía de degradación de Pireno es dioxigenación en las posiciones 4,5 para producir tanto cis y trans 4,5-pyrenediol por dioxigenasa y monooxigenasa, respectivamente. Como lo muestra la figura (ver anexo 3).

Sobre la base de datos genómicos y proteómicos según Kim et al., 2007. Se han identificado 27 enzimas necesarias para la construcción de una vía completa de la degradación de pireno. El análisis proteómico que se realiza en los cultivos también revela que 18 enzimas participan en la ruta de degradación y están reguladas por incremento de más del doble, tal como se indica mediante los

recuentos de péptidos, en microorganismos como *M. vanbaalenii*, *Nocardioides sp* y *Pseudomonas sp*, cuando se cultivan con pireno. Los estudios demuestran que las paredes de estas bacterias del suelo son ricas en ácidos micólicos lo cual puede ser un factor importante en la utilización de sustratos hidrófobos tales como los que proporcionan los HAP (Peng et al., 2008).

Recientemente ha sido descubierta otra vía de metabolismo de HAP de alto peso molecular, la vía de descripción de la biodegradación del fluoranteno que es un HAP de cuatro anillos en los que participa también la cepa *M. vanbaalenii* PYR-1 anteriormente descrita en la degradación del pireno. Se han obtenido Treinta y siete metabolitos de fluoranteno incluyendo isómeros potenciales que se aislaron del medio de cultivo y se analizaron usando HPLC, GC-MS, y absorción por UV-visible. Cincuenta y tres enzimas se determinaron probables de estar implicadas en la degradación de fluoranteno, con cuatro vías propuestas para la degradación de este HAP iniciando por reacciones de monooxigenación y dioxigenación (Kweon et al., 2007).

Sólo hay algunos estudios limitados que documentan la extensa mineralización de los HAP que tienen más de cuatro anillos (Kanaly and Harayama, 2000). Gran parte de las investigaciones realizadas se han centrado también en el benzo[α]pireno (B α P) de cinco anillos, debido a que es uno de los contaminantes ambientales más importantes, por su carácter mutagénico y carcinogénico que causa como agente xenobiótico en el medio (NTP, 2002). Según los informes de las investigaciones la oxidación de B α P por las bacterias ha ocurrido cuando estas bacterias se cultivan sobre otros sustratos, esto quiere decir que contengan hidrocarburos de bajo peso molecular o HAP menos densos que como resultado podrían inducir a los microorganismos a producir algunas enzimas que pueden degradar al B α P (Moody et al., 2004).

Una observación en la biodegradación del B α P para su oxidación a dihydrodiols se evidencio con la cepa *S. yanoikuyae* B8/36, que anteriormente se conocía como cepa *Beijerinckia sp.* B8/36, una cepa que puede ser inducida con bifenilo, xileno, o salicilato según (Gibson, 1999). No demostrando muy buenos resultados en la biodegradación y detección de los productos en la escisión de los anillos. En contraste, según Schneider et al., 1996 se identificó cis-7,8-dihidrodiol como producto final y con más eficiencia que el anterior en cultivos de crecimiento con la cepa modificada *Mycobacterium sp* RJGII-135, donde se utilizó pireno como substrato para mantener la degradación del HAP (Ver anexo 4). Se sugirió que el *Mycobacterium sp.* Cepa RJGII-135 fue capaz de transformar B α P y generar una oxidación enzimática inicial en sus anillos. En otras pruebas también se demuestra que cuando se cultiva una mezcla de extracto de levadura, peptona y almidón soluble, la cepa *M. vanbaalenii* PYR-1 participa de manera exitosa en el proceso y puede biotransformar por ejemplo, una cantidad de 0,5 mg de B α P a un 24,7% en estado acuoso y disponer metabolitos orgánicos extraíbles (Moody et al., 2004). Esta cepa también ha demostrado ser exitosa para degradar ligeramente B α P en una mezcla de seis componentes de HAP. Según Moody se puede utilizar *M. vanbaalenii* PYR-1 en cultivos inducidos con fenantreno para producir varios dihydrodiols y productos de escisión del anillo a partir de benzo [α] pireno (Moody et al., 2004).

3.4.2 Catabolismo de los HAP por hongos

Como se describe anteriormente varios estudios han demostrado que diversos hongos son capaces de llevar a un estado de mineralización los contaminantes como los HAP (Peng, R, H et al, 2008). Estos hongos se pueden clasificar en dos grupos: los hongos ligninolíticos y no lignolíticos (Cerniglia, 1997). En la biodegradación se incluyen los mecanismos anteriormente nombrados en la página 25 de este escrito. En los procesos que utilizan las enzimas extracelulares solubles de catabolismo por lignina, se generan enzimas que no son específicas y

oxidan una amplia variedad de compuestos orgánicos. Estas enzimas carecen de selectividad debido a la lignina que contienen una variedad de estructuras aromáticas formadas en las paredes celulares de las plantas, por reacciones de acoplamiento con un radical de oxígeno y compuestos activos de cinamilo resultantes de una variedad de vínculos según Hammel, 1992. En los hongos no lignolíticos, las enzimas monooxigenasas del citocromo P450 catalizan la oxidación del HAP aportando óxidos, que son productos iniciales del metabolismo del HAP (Peng et al., 2008).

3.4.2.1 Enzimas extracelulares del catabolismo de la lignina en hongos ligninolíticos. Debido a la ventaja de ser capaz de difundir a los HAP inmóviles, las enzimas extracelulares fúngicas del catabolismo de la lignina parecen ser más propensas que las enzimas intracelulares bacterianas, al hacer el ataque inicial sobre los HAP en el suelo. Los hongos de podredumbre blanca son ubicuos en la naturaleza con la capacidad para degradar y mineralizar de manera recalcitrante la lignina que son polímeros de la planta (Martínez et al., 2005). Varios informes han demostrado que los hongos de pudrición blanca son capaces de degradar HAP y tener un alto potencial en la biorremediación de suelos y sedimentos contaminados con estos hidrocarburos. Grandes cantidades de micelio de varias especies de hongos de la pudrición blanca se utilizan para aumentar el grado de biorremediación de los HAP en el suelo (Clemente, A et al., 2001). Para esto los estudios comprueban la efectividad de cepas de hongos *Phanerochaete chrysosporium*, caracterizada en muchos estudios como unas de las mejores, pues es capaz de oxidar pireno, antraceno, flúoreno y benzo [α] pireno a las quininas correspondientes por actividad de la enzima peroxidasa de lignina y la enzima peroxidasa de manganeso (Winquist, E et al., 2014). En contraste con *P. Chrysosporium*, también se ha comprobado que el metabolismo de los HAP con *Phanerochaete laevis* es más rápido y más extenso (Peng et al., 2008).

La enzima de lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa, pueden catalizar la oxidación de la lignina no fenólica recalcitrante para formar un alto potencial redox-oxoferrilo, que es intermedio durante la reacción del cofactor hemo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como se muestra en la figura 3a (Pérez et al., 2002). Las enzimas peroxidases ligninolíticas confieren dos características en la estructura molecular con propiedades catalíticas distintivas: la primera un grupo hemo, que confiere un alto potencial redox del complejo-oxoferrilo y la segunda la existencia de sitios de unión específicos para la oxidación de los sustratos característicos, incluyendo compuestos aromáticos no fenólicos en los casos de las LiP y en el caso de las MnP manganeso de hierro (Martínez et al., 2005). Por otro lado las lacasas, catalizan la oxidación de electrones de forma acompañante, con la reducción de cuatro electrones de oxígeno molecular en agua, usando una gama de compuestos fenólicos como donantes de hidrógeno (figura 3a). La catálisis se lleva a cabo por la presencia de diferentes centros de cobre, que se disponen en un racimo trinuclear, donde actúan las enzimas con la unión de sitios de reconocimiento (figura 3b). La presencia de los cuatro iones cúpricos, cada uno coordinado a una única cadena de polipéptido, es un requisito absoluto para que la actividad sea óptima (Baldrian, 2006).

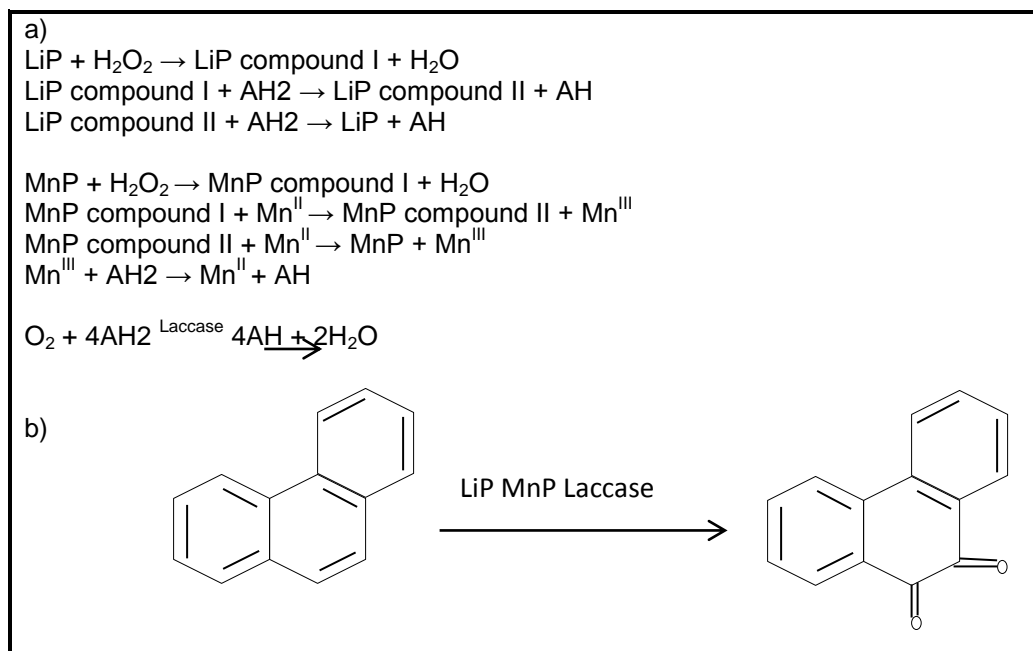


Figura 3. Reacción de catálisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos por hongos con la acción de las enzimas peroxidasa de lignina, manganeso peroxidasa y lacasa. Tomada de (Peng et al., 2008).

- a. Refleja el mecanismo de la reacción que se describe en la ecuación. AH₂ es el sustrato reductor y AH es el sustrato reductor después de una oxidación de electrones.
- b. La oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por hongos ligninolíticos. Peroxidasa de lignina, peroxidasa de manganeso, y lacasa son capaces de oxidar HAP a las quininas correspondientes.

Diversas investigaciones han revelado que los mecanismos de la oxidación de los HAP por hongos con enzimas ligninolíticas es similar a la degradación de la lignina no fenólica, por lo cual se ha encontrado correlación entre el potencial de ionización (PI) del HAP y la actividad específica de enzimas como la MnP y la LiP. Los Sustratos aromáticos con un menor PI se oxidan por las dos enzimas ligninolíticas y entre menor sea el PI, más rápida será la velocidad de oxidación. Un valor de umbral del PI se encontró para cada enzima: LiP oxida HAP con una

PI \leq 7,55 eV, mientras que MnP oxida HAP con una PI hasta 8,2 eV según Vázquez-Duhalt et al., 1994.

Estas enzimas utilizan compuestos, productos de las reacciones catabólicas del HAP, Sin embargo el uso de estos mediadores sintéticos implica altos costos añadidos y la posible generación de especies oxidadas que son tóxicas. Algunos de los compuestos naturales, tales como el ácido cumárico- ρ , promueve fuertemente la eliminación de los HAP (benzo α pireno) por lacasas (Cañas et al., 2007). Estos mediadores facilitan con un alto potencial el proceso de la biodegradación

8.4.2.2 El sistema del citocromo P450 En este proceso para llegar a la degradación se conocen dos funciones biológicas, dentro de las cuales se encuentran las que se atribuyen a las monooxigenasas del citocromo P450, tales como la desintoxicación de xenobióticos y la esteroidogénesis, que se basan en su capacidad para catalizar por medio de la inserción de oxígeno una amplia variedad de compuestos. Las investigaciones manifiestan que los mamíferos como las ratas juegan un papel clave no sólo en la desintoxicación de los HAP, sino también en la activación de los HAP, por la presencia de esta enzima (Shimada, 2006). Las vías que conducen a la formación de HAP en diol-epóxidos han sido ampliamente estudiadas en las células de hígado de rata con el sistema citocromo P450 y la epóxido hidrolasa usando B α P como un prototipo (Peng et al., 2008).

Los hongos metabolizan compuestos de HAP a metabolitos similares a los formados por enzimas de mamíferos. La vía predominante en la oxidación inicial de los HAP es el citocromo P450 monooxigenasa hidrolasa/epóxido que cataliza la reacción y forma trans-dihydrodiols (Tortella and Diez, 2005). Estos pasos metabólicos se encuentran en los hongos no lignolíticos, tales como *Cunninghamella elegans* y hongos ligninolíticos, tales como *Pleurotus ostreatus*

(Capotorti et al., 2005). Por ejemplo, *C. elegans* metaboliza fluoranteno en fluoranteno trans-2,3-dihidrodiol, 8- y 9-hydroxyfluoranthene trans-2,3-dihidrodiol, mientras que *P. ostreatus* metaboliza pireno en pireno trans-4,5-dihidrodiol y antraceno en antraceno trans-1,2-dihidrodiol y 9,10-antraquinona. El citocromo P450 también puede oxidar numerosas HAP a los fenoles que posteriormente se conjugan con sulfato, ácido glucurónico, o glucosa (Tortella and Diez, 2005). Ver figura (anexo 5).

Las monooxigenasas del citocromo P450 de los hongos son una superfamilia de proteínas hemo-tiolato que están asociados con las membranas del retículo endoplásmico (Yadav et al., 2006). En investigaciones realizadas se determinó una secuenciación del genoma completo de hongos del genero basidiomiceto de podredumbre blanca como *P. Chrysosporium* revelando la presencia de las mayores monooxigenasas del citocromo P450 en los hongos (Rabinovich et al., 2004), que comprende 150 genes de P450, que podrían ser clasificados en 12 familias y 23 subfamilias y al menos 11 clones de P450 fúngico (Yadav et al., 2006).

Aunque las monooxigenasas de tipo citocromo P450 podrían estar en la oxidación de los HAP por varios hongos, los HAP se oxidan través de una vía similar a los sistemas enzimáticos de mamíferos para formar potentes carcinógenos - epóxidos y dihydrodiols (Cerniglia, 1997). Mientras que en la oxidación extracelular peroxidasa de los HAP mediada en cultivos de hongos de pudrición blanca los resultados inicialmente producen quinonas (Vyas et al., 1994). Debido a que las quinonas son menos tóxicas que sus respectivos HAP y metabolitos dihidroxilados generados por las monooxigenasas del citocromo P450, la oxidación enzimática de los HAP por oxidorreductasas ligninolíticas podrán ser una estrategia más útil en los procesos de desintoxicación y de biorremediación.

8.5 FACTORES QUE DETERMINAN LA EFICACIA DE LA BIORREMEDIACIÓN

Muchos factores limitantes nombrados anteriormente han sido reconocidos por afectar la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. Los cuales han sido discutidos por Brusseau, M, 1998. Entre los factores físicos, la temperatura juega un papel importante en la biodegradación de los contaminantes, ya que afecta directamente su composición química, la fisiología y la diversidad de la flora en crecimiento (Das, N and Chandran, P, 2010). Investigaciones reportan que ha bajas temperaturas se influye en el aumento de la viscosidad del crudo, mientras que la volatilidad de las moléculas de hidrocarburos tóxicos con bajo peso molecular se reduce, lo cual retrasa la biodegradación (Atlas, R, 1975). En sí, la temperatura afecta la solubilidad de los hidrocarburos (Foght, J, M et al., 1996). La velocidad de biodegradación generalmente disminuye con la baja de temperatura. En el medio ambiente afectado la temperatura influye no solo en la actividad microbiana sino también en las propiedades del aceite derramado (Venosa, A and Zhu, X, 2003).

Estudios reportan que los nutrientes para los microorganismos son muy importantes porque proporcionan ingredientes que ejercen un factor clave para el éxito de la biodegradación de los contaminantes, especialmente nitrógeno (N), fosforo (P) y en algunos casos hierro (Fe) (Cooney, J, 1984). Es importante analizar en cada caso la necesidad real de añadir nutrientes al medio contaminado, pues estos pueden ser a su vez una fuente de contaminación. La efectividad del uso de poblaciones microbianas autóctonas o la adición de poblaciones exógenas (Aldrett, S et al., 1997). Es importante estimar la cantidad de biodegradantes y material contaminante, a la vez la biodiversidad de especies propias que demuestren una mejoría relevante del proceso.

Diversas pruebas determinan que los productos comerciales de biorremediación pueden ser efectivos a nivel de laboratorio, pero su utilidad en campo no ha generado los resultados deseados, ya que las condiciones del medio tales como la heterogeneidad espacial, las interacciones biológicas, los efectos climáticos y las limitaciones de transporte masivos de nutrientes son difícilmente simulados a nivel de laboratorio (Das, N and Chandran, P, 2010).

8.6 AVANCES EN BIORREMEDIACIÓN

Como se describe anteriormente los hidrocarburos en el ambiente se biodegradan principalmente por bacterias y hongos (Das, N and Chandran, P, 2010). Desde la década de 1950 las bacterias degradadoras han sido aisladas de estos compuestos, identificándose los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *lavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Gordonia*, entre otros (Mutnuri et al., 2005.; Jacques et al., 2005.; Jacques et al., 2005.; Jacques et al., 2007).

Bacterias y hongos participan en la biodegradación de algunos tipos de hidrocarburos aromáticos como los Benceno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno, más conocidos como los BTEX y de HAP de la familia del benzopireno.

Tabla 1. Microorganismos e Hidrocarburos biodegradados. Tomado de (Oliveira, R and Alves F, 2013).

Producto	Microorganismos géneros	por	Compuestos degradados	Autores
Hidrocarburos aromáticos BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenzeno y Xileno)	<i>Mycobacterium</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Cladophialophora</i> <i>Cladosporium</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	y y	Capaces de catabolizar benceno, tolueno, Etilbenzeno xilenos (BTEX).	(Kang <i>et al.</i> , 2005; Nikolova y Nenov 2005) (Nagarajan y Loh 2009) (Teixeira y Bento 2007)
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)	<i>Mucor</i> , <i>Gliocadium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Scopulariopsis</i> y <i>Coniothyrium</i>	y	Degradación de pireno	(Ravelet <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Pleorotus</i> <i>Phanerochaete</i>		Biodegradación de HAP	(Mollea <i>et al.</i> , 2005) (Mollea <i>et al.</i> , 2005)

Se ha observado, según los estudios que una alta proporción de los HAP contaminantes de suelo, son degradados por especies aisladas del sustrato del suelo perteneciente al género *Sphingomonads*, bacterias enunciadas anteriormente. A diferencia de otras cepas de bacterias gram-negativas, los miembros de este género *Sphingomonads* son capaces de degradar una amplia gama de compuestos naturales y xenobióticos, tales como bifenilo, naftaleno (s), fluoreno, fenantreno (s), pireno, difeniléter (s) (clorada), furano (s), dibenzo-p-dioxina (s), carbazol, estradiol, polietilenglicoles, fenoles clorados y diferentes herbicidas y pesticidas (Basta *et al.*, 2005). Parece posible que las *Sphingomonads* degradantes de estos contaminantes están adaptadas al ambiente oligotrófico por tener sistemas de captación de alta afinidad y la capacidad de tomar la forma simultánea hasta sustratos mixtos en lugar de ser determinados especialistas en la degradación de compuestos aromáticos hidrófobos (Pinhassi and Hagstrom, 2000). Muchas *Sphingomonads* degradan

naftaleno, fenaftaleno, y antraceno a través de vías comunes que se encuentran en otras bacterias gram-negativas (Basta et al., 2005).

Muchos microorganismos son nativos del medio o manipulados genéticamente y clasificados en el laboratorio con genes específicos para la degradación. Las bacterias degradan compuestos de HAP por un proceso de asimilación en el que la ganancia de carbono y energía les sirve para el crecimiento, que normalmente conduce a la mineralización del compuesto (Haderlein et al., 2006). Las bacterias, como se describe anteriormente en general, utilizan enzimas intracelulares dioxigenasa para la degradación de los HAP (Johnsen et al., 2005). Que en resumen se explica que la degradación bacteriana aerobia en los HAP se inicia por una oxigenación de la estructura del anillo para formar un *cis-dihidrodiol* seguida de una deshidrogenación para formar compuestos intermedios dihidroxilados. La vía enzimática de la degradación de HAP y los genes que codifican para las enzimas correspondientes son bien conocidos (Cebren et al., 2008). Una amplia gama de bacterias tanto gram-positivas y gram-negativas son conocidos para degradar los HAP y sus genes son algo diferentes (Cebren et al., 2008). Las bacterias Gram-negativas, tales como *Burkholderia* (β -*Proteobacteria*), degradan fácilmente 2 o 3 anillos de HAP, mientras que las bacterias Gram-positivas, tales como *Mycobacterium*, son más eficientes en la degradación de HAP de mayor peso molecular, generalmente de 4, 5 y hasta 6 anillos (Johnsen et al., 2005). Como lo muestra la siguiente figura según lo publicado por Winqvist, E et al., 2014, la investigación muestra un estudio de biorremediación de suelos contaminados con HAP, por medio de hongos a nivel de laboratorio y a escala de campo.

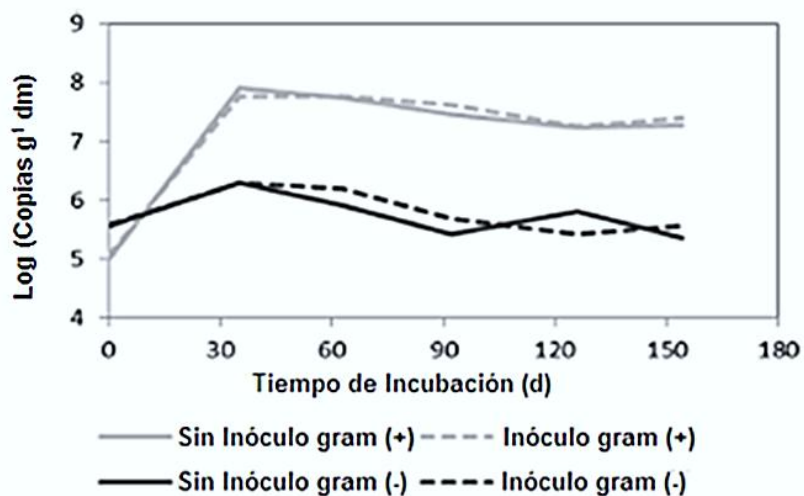


Figura 4. Importancia de los genes implicados en la degradación de dioxigenasa en HAP con bacterias gram-negativas y gram-positivas, en el suelo durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico. Tomado y adaptado al español de (Winqvist, E et al., 2014).

Lo anterior refleja la importancia de los genes implicados en la degradación de HAP por dioxigenasas de las bacterias gram-negativas y gram-positivas en el suelo durante un experimento de campo con o sin inóculo fúngico en el suelo contaminado por HAP.

Diversas estrategias de biorremediación de suelo contaminado por HAP han sido investigados, tales como la modificación de la zona con varios tipos de compost (Winqvist, E et al., 2014). Y la bioaumentación con varias especies de hongos (Pozdnyakova, 2012). La investigación científica apoya la base de una alta diversidad de biorremediación y ha demostrado que el inóculo fúngico complementa positivamente a las comunidades bacterianas en el suelo y en muchos sentidos estimula la degradación de contaminantes como los HAP incluso no de manera selectiva si no mezclados en el ambiente (Šnajdr et al., 2011,

Furuno et al., 2012). Sin embargo, sólo unos pocos estudios han informado el escalamiento del tratamiento de hongos (Steffen and Tuomela, 2010).

La literatura nos registra gran eficacia en los géneros de hongos mostrados en la tabla 1, los cuales participan con un importante aporte en la degradación de estos hidrocarburos policondensados según el ambiente y la zona afectada. Entre los que se encuentran hongos del género *Deuteromycetes*, con actividad ligninolítica de podredumbre blanca del suelo, enunciados anteriormente. De los cuales se reportan valores apreciables en la degradación de los HAP, evidenciando resultados en trece cepas en cultivo monitoreadas por cromatografía líquida de alta resolución HPLC y espectrofotometría, que demuestran la biodegradación de naftalenos hasta en un 69%, fenantrenos en un 12%, antracenos en un 65% entre otros, biodegradación dependiente por las enzimas LiP, MnP y lacasas. Que fueron eficientes para llevar a cabo esta actividad en un promedio de 6 a 10 días (Clemente, A et al., 2001).

Los hongos ligninolíticos son capaces de degradar los HAP e incluso podrían ser degradadores más eficientes que las bacterias. Cuando crecen en la madera o la basura, los hongos degradan la lignina con enzimas oxidantes extracelulares en un proceso de co-metabólico, según lo descrito anteriormente, además de la lignina, son capaces de degradar compuestos con similitudes estructurales con la lignina, tales como muchos productos químicos orgánicos xenobióticos (Winqvist, E et al., 2014). Según lo descrito en el metabolismo de los HAP por los hongos, las enzimas ligninolíticas de los hongos tienen un papel importante en el ataque inicial sobre los HAP de alto peso molecular en el suelo (Harms et al., 2011). Puesto que las enzimas ligninolíticas son extracelulares, son capaces de difundir eficazmente a los HAP de alto peso molecular de forma altamente inmóvil. Los metabolitos resultantes son más solubles en agua, y por lo tanto más biodisponibles, los compuestos formados pueden ser sustratos para muchas bacterias, pero también pueden ser degradados adicionalmente por enzimas

intracelulares de hongos, tales como el citocromo P-450 monooxigenasa según los estudios de (Pozdnyakova, 2012). Un ejemplo se mostró en la degradación de varios HAP por el hongo *Irpex lacteus*, las estructuras de algunos de los metabolitos sugirieron la implicación de ambas enzimas ligninolíticas y el citocromo P-450 monooxigenasa. Además de la mineralización, una fracción significativa de los HAP se incorporó a las sustancias húmicas durante biorremediación (Winqvist, E et al., 2014).

Entre otras investigaciones realizadas en suelos contaminados por HAP, participan 11 géneros de hongos entre los que se destaca uno de los mostrados anteriormente, la especie *Phanerochaetes chrysosporium*, considerado un microorganismo prometedor debido a la producción de la enzima lignasa con alto potencial de degradar compuestos insolubles de alto peso molecular como los HAP. La investigación también involucro seis géneros de bacterias; *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, algunas relacionadas anteriormente, las cuales fueron los grupos dominantes en la degradación de los HAP.

La degradación bacteriana de estos compuestos normalmente envuelve la formación cis-dihydrodiol observado por la formación de un diácido como el ácido cis, cis-mucónico mientras que en los hongos la oxidación da la formación de trans-dihydrodiol, en ambos casos un diol es un intermediario indispensable según Alexander 1977, cuando el tratamiento de biorremediación es efectuado en fase sólida, el suelo debe ser tratado mediante lechos tamizados y sin líquido libre, de lo contrario se manifestaría una fase de barro y debe llevarse a cabo por medio de un reactor formándose una capa entre el barro y el agua (Ferrari,1996).

En el suelo, la oxidación es llevada a cabo por los microorganismos y el movimiento del hidrocarburo es más vertical, además el proceso de humificación generado en el horizonte superficial del suelo tiende a atrapar el residuo

haciéndolo más persistente. En este caso el factor limitante no está en la disponibilidad de nutrientes sino que la disponibilidad de oxígeno sea baja, por lo que se debe airear el suelo o agregar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para mejorar el proceso (Lors, C et al., 2012).

Un estudio realizado en biorremediación de HAP en suelos contaminados se basó en comparar a escala de campo y a nivel de laboratorio la degradación de los HAP. El suelo utilizado para llevar a cabo el proceso de biorremediación era un suelo contaminado por una planta de destilación de alquitrán de hulla que estaba en funcionamiento desde 1923 hasta 1987 en el norte de Francia (Ver anexo 7). Se utilizó un mismo suelo el cual fue sometido a una preparación inicial y se le aplicó un tratamiento de metodología en hileras con el fin de asimilar la capacidad de biodegradación de los consorcios microbianos bajo las mismas condiciones tanto *insite* y *offsite* (Lors, C et al., 2012).

Los resultados demostraron que después de 6 meses los experimentos de laboratorio dieron resultados similares a los de campo, pero menos dispersos lo que indica que el biotratamiento *insitu* fue bien optimizado (Ver anexo 1). La cantidad total de HAP degradados después de 6 meses fue de aprox. 90% y las tasas de degradación siguieron una tendencia exponencial negativa. El suelo era predominante en contaminantes de 2,3 y 4 anillos (Lors, C et al., 2010b). La tasa relativa de degradación de los HAP de 3 anillos era cerca de 30 veces mayor que la de los compuestos por 5 y 6 anillos mientras que sólo 7 veces superior a los de 4 anillos. Ver figura 5. Con respecto a la comunidad bacteriana en particular, *Pseudomonas* y *Enterobacter* fueron géneros que tuvieron una gran capacidad degradante en los HAP y se mantuvieron a lo largo de todo el tratamiento biológico (Lors, C et al., 2012).

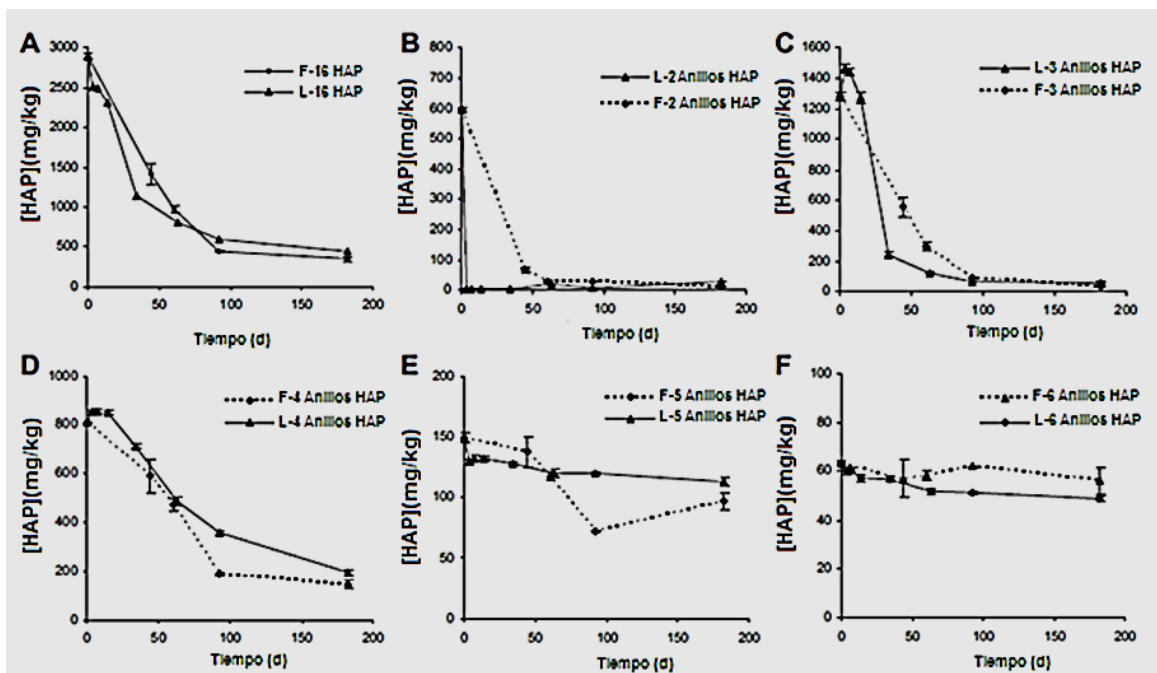


Figura 5. Muestra los cambios en las concentraciones de los 16 HAP (A) y de 2(B), 3(C), 4(D), 5(E) y 6(F), concentraciones de anillos de HAP en mg kg^{-1} suelo seco _ SE. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012).

Lo anterior muestra los cambios degradados con el tiempo durante los experimentos de laboratorio (L) y campo (F). Medios de tres medidas replicadas seguidos por las desviaciones estándar.

Otras especies, como algunas *Beta-proteobacterias*, aparecieron con el tiempo, cuando la concentración de HAP eran lo suficientemente bajas como para aliviar la ecotoxicidad del suelo, estas bacterias no son cultivables en laboratorio y fueron tomadas como indicadores por lo que pudieron estimar un punto final de biodegradación (Lors, C et al., 2010a and Lors, C et al., 2011).

Los investigadores concluyen que este tipo de experimento podría permitir optimizar la duración del tratamiento biológico de la biorremediación y reducir el costo del proceso. Por otra parte, la realización de un experimento de laboratorio

en el mismo tiempo que uno campo es una forma valiosa para supervisar si el proceso de biotratamiento en la zona funciona como se esperaría. A la vez se recomienda seguir con tratamientos posteriores a los seis meses que permitan biodegradar los HAP más pesados que a pesar de que fueron encontrados en porcentajes muy bajos requieren mayor tiempo de biorremediación (Lors, C et al., 2012).

Según las investigaciones a diferencia del crudo, el alquitrán de hulla son las fuentes típicas de la contaminación por HAP en los suelos, la creosota se utiliza comúnmente para preservar postes de la línea eléctrica a prueba de agua. En particular, en Finlandia, antiguos emplazamientos de aserraderos constituyen un problema importante (Winqvist, E et al., 2013). En esta zona se llevó a cabo una investigación de los suelos contaminados con hidrocarburos polinucleares, el propósito del estudio fue desarrollar un método de biorremediación con hongos en el aserradero que contenía un alto índice de contaminación en su suelo. Para los análisis se llevó a cabo una preparación de muestras en la cual se mezcló el suelo contaminado con un suelo de compost de residuos verdes en una relación de 01:01, luego se incubaron muestras con inóculo y sin inóculo fúngico a utilizar. Los tratamientos se realizaron a escalas de laboratorio y de campo, en el tratamiento a escala de laboratorio se tomó una muestra a partir de una concentración de 3500 mg.kg⁻¹ de suelo en donde se consideró la suma de las concentraciones de los 16 HAP contaminantes, clasificados por la US-EPA (Winqvist, E et al., 2013). Los HAP de alto peso molecular se degradaron significativamente más en los microcosmos con hongos inoculados que en los no inoculados. En los microcosmos inoculados se utilizaron cepas de *Phanerochaete velutina*, los resultados reflejaron degradación de un 96% de los HAP de 4 anillos y un 39% de 5 y 6 anillos durante tres meses. (Ver anexo 6).

Lo que demostró a los investigadores que el hongo degradó en gran parte la fracción bioaccesible de los HAP (Covino et al., 2010). En los microcosmos no

inoculados, el 55% de los HAP de 4 anillos y sólo el 7% de 5 y 6 anillos fueron degradados.

Sin embargo, durante la escala de campo el experimento tuvo una muestra de concentración inicial más baja de 1.400 mg.kg^{-1} presentando la suma de los 16 HAP, el porcentaje de la degradación fue similar tanto en el inoculo con *Phanerochaete velutina* y los tratamientos no inoculados: 94% de los 16 HAP fueron degradados en tres meses. Ver figura 6.

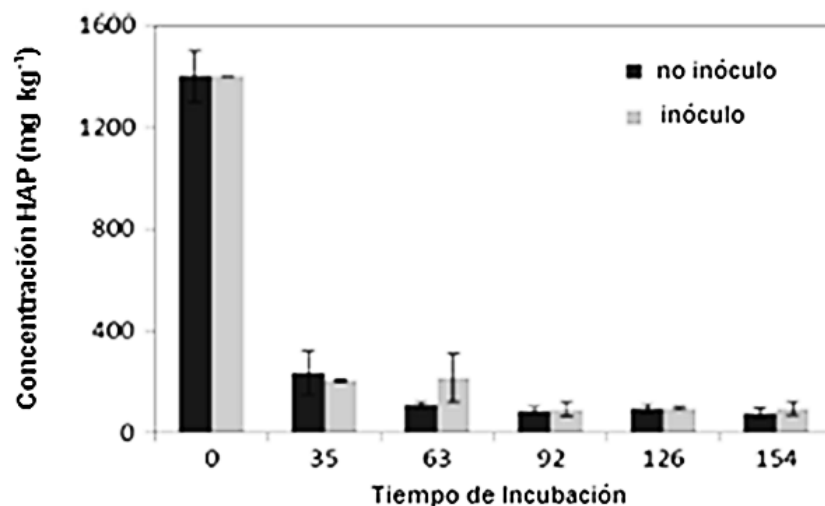


Figura 6. Concentraciones de HAP durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico. Tomado y adaptado al español de (Winqvist, E et al., 2014).

Lo anterior refleja la concentración de PAH durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico (valor promedio de dos repeticiones, la gama de variaciones se muestran con barras de error). Se utilizó suelo contaminado-PAH diluido con residuos verdes compostado (01:01).

Según los investigadores en el experimento los HAP también fueron degradados en el suelo testigo que no contenía el inóculo fúngico y se estima que fue por la acción de microorganismos indígenas, por lo cual la adición de los residuos en

abono verde resultó en un alto número de bacterias indígenas, así como genes implicados en la degradación de HAP a partir de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Esto quiere decir que este sustrato les sirvió como inóculo a las bacterias.

A escala de campo se encontraron bacterias gram-positivas como las actinobacterias y micobacterias que tuvieron una importante participación con los HAP según las secuencias de genes dioxigenasa hidroxilante, aumentando 1.000 veces la eficiencia del proceso lo que indica que la degradación de los HAP por estos microorganismos nativos del medio también jugó un papel importante durante los tratamientos realizados en el estudio, preferiblemente a escala de campo (Winqvist, E et al., 2014).

4. CONCLUSIONES

- Según lo establecido, las investigaciones demuestran que el uso de los microorganismos es una buena opción para la biorremediación de contaminantes de hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados por petróleo.
- La biorremediación es una práctica que está tomando importancia a nivel mundial dado que el aumento de la actividad industrial está degradando cada vez más los ecosistemas naturales y el empleo de microorganismos conocidos para el tratamiento de desechos potencialmente tóxicos ya es una práctica habitual en los países desarrollados.
- En países en vía de desarrollo como Colombia, se ha encontrado en el petróleo una creciente fuente de riqueza. Durante la extracción, transporte y refinación del crudo ocurren derrames accidentales o intencionales, como es el caso actual de los ataques terroristas generados por los grupos al margen de la ley sobre los ductos de conducción que en el País causan contaminación en aguas y suelos afectando los ecosistemas. Por lo cual se espera ofrecer una panorámica global del problema, que sirva para estimular futuros trabajos e investigaciones como una alternativa para la mitigación de contaminantes derivados del petróleo como los HAP, que constituyen una amenaza para la vida y se exponen en los derrames del crudo.
- Sin embargo existen en la naturaleza microorganismos capaces de metabolizarlos y durante la última década, una variedad de estos microorganismos se han aislado y caracterizado por su capacidad para degradar HAP. Por lo que se espera que a largo o mediano plazo dependiendo del peso molecular del contaminante el proceso de biorremediación tenga una respuesta eficiente.

- Los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para adaptarse a los HAP presentes en la situación contaminada. Manipular o arreglar herramientas de ingeniería genética, tales como la conversión de genes, la duplicación de genes y la transposición, ha llevado a producir nuevas cepas con propiedades deseables para aplicaciones de biorremediación de acuerdo con el conocimiento de la degradación de los HAP por microorganismos.
- Además, muchas enzimas metabólicas para la degradación de diferentes HAP se han aislado a partir de microorganismos y varias vías novedosas se han dilucidado basadas en la identificación de los productos iniciales de oxidación del anillo y el anillo de escisión. Los genes responsables de la acción sobre los HAP y sus vías catabólicas siempre están localizados como grupos de genes y algunos grupos de genes han sido clonados y secuenciados.
- La eliminación de los HAP del suelo contaminado es esencial durante su remediación de acuerdo a los estándares de limpieza correspondientes. El tratamiento biológico de suelo contaminado con HAP debería ser una opción más eficiente, económicamente asequible y adaptable de tratamiento físico-químico porque presenta ventajas potenciales, tales como la degradación completa de los contaminantes, el costo del tratamiento más bajo, una mayor seguridad y menos perturbación del suelo.
- Hay que tener en cuenta que en el entorno natural, los HAP tienden a interactuar con fases no acuosas y materia orgánica del suelo y como consecuencia, convertirse en sustrato potencialmente disponible para la degradación microbiana.
- Aunque los microorganismos son importantes en diferentes procesos involucrados en la retención de contaminantes por medio de biorremediación,

existen limitantes inherentes o comunes a todo proceso biológico que requieren que estas sean controladas minuciosamente para que permitan generar mayor eficacia según el método que se requiera utilizar.

- Con el desarrollo de esta monografía se espera construir una recopilación bibliográfica actual sobre los avances acerca del estudio de los HAP derivados del petróleo y sus posibles tratamientos de biodegradación, a la vez brindar conocimiento de las técnicas de biorremediación con microorganismos y reflejar conciencia con los argumentos de referencia que dan a entender el gran impacto de contaminación ambiental y peligro que provocan estos tipos de hidrocarburos en los seres vivos.
- El escrito se proyecta para que sirva como intercambio de conocimientos e información de las técnicas de biorremediación aplicadas a los HAP en la industria petroquímica por diversos autores.

BIBLIOGRAFÍA

Advanced, BioTech. 2000. Why add microbes? Advanced BioTech, California, USA. http://www.adbio.com/bioreem/why_add_microbes.htm.

Aldrett, S., Bonner, J, S., McDonal, T, J., Mills, M, A., Autenrieth, R, L. 1997. Degradation of Crude Oil Enhanced by Commercial Microbial Cultures. Proceedings of the 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute. 995-996.

Alexander, M. 2004. Biodegradation and bioremediation. Academic Press.

Alexander, M.1999. Biodegradation and bioremediation. New York: Academic. (2): 453.

Atlas, R, M. 1975. "Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation." *Journal of Applied Microbiology*. 30(3):396–403.

Atlas, R, M.1981.Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev.*45 (1):180-209.

Atlas, R. M., Bartha, R., 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbiology Ecology*. 12: 287-338.

Baheri, H., Meysami, P. 2002. Feasibility of Fungi Bioaugmentation in Composting a Flare Pit Soil. *Journal of Hazardous Materials*. 89(2-3):279-286.

Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-occurrenceand properties. *FEMS Microbiol Rev* 30:215–242.

Basta, T., Buerger, S., Stolz, A. 2005. Structural and replicative diversity of large plasmids from *sphingomonads* that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology*.151: 2025–2037.

Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., Miranda, J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova - Publicación Científica*. 4:1-116.

Benavides, J., Roldan, F., Ocampo, A., Londoño, M., Pardo, A., Perdomo, C. 2004. Efecto de la adición de nutrientes (nitrógeno y fósforo) e identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos de suelos contaminados con petróleo. (Fase I). Trabajo de grado (Ingeniera (s) ambiental). Universidad de la Salle Bogotá.

Boyd, D, R., Sheldrake, G, N. 1998. The dioxygenase-catalysed formation of vicinal cis-diols. *Nat Prod Rep*.15: 309–324.

Brezna, B., Kweon, O., Stingley, R, L., Freeman, J, P., Khan, A, A., Polek, B., Jones, R, C., Cerniglia, C, E. 2005. Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 11:1–11.

Brusseau, M, L., Serra, R. 1998. “The impact of physical, chemical and biological factors on biodegradation.” in *Proceedings of the International Conference on Biotechnology for Soil Remediation: Scientific Bases and Practical Applications*: 81– 98.

Capotorti, G., Cesti, P., Lombardi, A., Guglielmetti, G. 2005. Formation of sulfate conjugates metabolites in the degradation of phenanthrene, anthracene, pyrene

and benzo[a]pyrene by the ascomycete *Aspergillus terreus*. *Polycycl Aromat Comp.* 25:197–213.

Cebren, A., Norini, M., Beguiristain, T., Leyval, C. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDa) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methodes.* 73:148-159.

Cerniglia, C, E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 19:324–333.

Cerniglia, C, E., White, G, L., Heflich, R, H. 1985. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Microbiol.* 143: 105-110.

Cerniglia, C, E.1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3:351-368.

Clemente, R, A., Anazawa, T., Durrant, L. 2001. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Soil Fungi. *Brazilian Journal of Microbiology.* 32:255-261.

Cooney, J, J., Atlas, R, M. 1984. “The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems.” in *Petroleum Microbiology.* 399–434.

Costa, M. D. 2011. Notas de aula: Biorremediação de solos contaminados. MBI 650 Microbiologia do solo. Universidade Federal de Viçosa.

Covino, S., Svobodová, K., Cvancarová, M., D’Annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Kresinová, Z., Galli, E., Cajthaml, T.2010. Inoculum carrier and

contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere*. 79: 855-864.

Crawford, S, L., Johnson, G, E., Goetz, F, E. 1993. "The potential for bioremediation of soils containing PAHs by composting". *Compost Science & Utilization*. 1(3):41-47. de Weger, L, A., van der Vlugt, C, I., Wijfjes, A, H., Bakker,

P, A., Schippers, B., Lugtenberg, B. 1987. "Fagella of the plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots". *J. Bacteriol*. 169:2769-2773.

Čvančarová, M., Kresinová, Z., Cajthaml, T. 2013. Influence of the bioaccessible fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons on the ecotoxicity of historically contaminated soils. *J. Hazard. Mater*: 254-255:116-124.

Das, N., Chandran, P. 2010. *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview*. SAGE-Hindawi Access to Research, Biotechnology Research International: 13 pages.

Dean-Ross, D., Moody, J., Cerniglia, C, E. 2002 Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiol Ecol*. 41: 1–7.

Dipple, A., Cheng, S, C., Bigger, C, A, H., Pariza, M, W., Aeschbacher, H, U., Felton, J, S., Sato, S. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons carcinogens. *In*: (Eds.), *Mutagens in the diet*. Wiley-Lissp. 109-127.

Ferrari, M. D. 1996. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and its application to bioremediation of contaminated soils and sludges. *Argent Microbiol.* 28(2):83-98.

Ferraro, D.J., Okerlund, A. L., Mowers, J. C., Ramaswamy, S. 2006. Structural basis for regioselectivity and stereoselectivity of product formation by naphthalene-1,2-dioxygenase. *J Bacteriol.* 188:6986–6994.

Foght, J. M., Westlake, D. W. S., Johnson, W. M., Ridgway, F. 1996. “Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques.” *Microbiology.* 142(9): 2333–2340.

Foght, J. M., Westlake, D. W. S., Vandermeulen, J. H., Hrudey, S. R. 1987. “Biodegradation of hydrocarbons in freshwater.” in *Oil in Freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology.* 217–230.

Furuno, S., Foss, S., Wild, E., Jones, K.J., Semple, K.T., Harms, H., Wick, L.Y. 2012. Mycelia promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 46:5463-5470.

Gibson, D. T. 1999. *Beijerinckia* sp strain B1: a strain by any other name. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 23:284–293.

Gibson, D. T., Parales, R. E. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 236–243.

González, P. M. 2009. Biorremediación y tratamiento de efluentes. Argentina: El Cid Editor .Apuntes: 4-6.

Haderlein, A., Legros, R., Ramsay, B.A. 2006. Pyrene mineralization capacity increases with compost maturity. *Biodegradation*. 17: 293-302.

Hammel, K, E. 1992. Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular peroxidases. *Met Ions Biol Sys*. 28:41–60.

Harms, H. 2011. Bioavailability and bioaccessibility as key factors in bioremediation. In: Moo-Young, M., Agathos, S. (Eds.), *Comprehensive Biotechnology*, second ed. Elsevier, Spain: 83-94.

Harms, H., Bosma, T, N, P. 1997. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J Ind Microbiol*. 18:97–105.

Heitkamp, M, A., Cerniglia, C, E. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl Environ Microbiol*. 54:1612–1614.

Heitkamp, M, A., Franklin, W., Cerniglia, C, E. 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol*. 54: 2549–2555.

Jacques, R, J, S, et al. 2005. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 56(3):150-156.

Jacques, R, J, S, et al. 2007. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Bioremediation Journal*. 11(1):11.

Jacques, R, J, S. 2005. Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. 170f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Johnsen, A, R., Wick, L, Y., Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133:71-84.

Josemar, R., Jacques, S., Menezes, F., Antonioli, Z., de Oliveira, F. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural, Santa Maria.* 37(4):1192-1201.

Kanaly, R, A., Harayama, S. 2000. Biodegradation of high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* 182:2059–2067.

Kang, S., Oh, K, H., Kahng, H, Y. 2005. Physiological characterization of BTEX degrading bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 isolated from reed rhizosphere of suncheon bay. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology.* 33(3):169-177.

Keith, L, H., Telliard, W, A.1979. Priority pollutants. I. a perspective view. *Environmental Science and Technology.*13:416-423.

Khan, F, I., Husain, T., Hejazi, R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71: 95-122.

Kim, S, J., Kweon, O., Jones, R, C., Freeman, J, P., Edmondson, R, D., Cerniglia, C,E. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *J Bacteriol.*189: 464–472.

Kweon, O., Kim, S, J., Jones, R,C., Freeman, J,P., Adjei, M,D., Edmondson, R,D., Cerniglia, C,E. 2007. A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *J Bacteriol.* 189:4635–4647.

Lors, C., Damidot, D., Ponge, J,F., Périé, F. 2012.. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution.*165:11-17.

Lors, C., Ponge, J.F., Damidot, D. 2010a. Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils. *Environmental Pollution.* 158: 2640-2647.

Lors, C., Ponge, J.F., Damidot, D.2011. Comparison of solid and liquid-phase bioassays using ecoscores to assess contaminated soils. *Environmental Pollution.* 159:2974-2981.

Lors, C., Ryngaert, A., Périé, F., Ludo Diels, L., Damidot, D.2010b. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere.* 81:1263-1271.

Maroto, M, E., Rogel, J, M. 2007. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Div. Protección Ambiental de Suelos.GEOCISA:*297-305.

Martínez, A, T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F, J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M, J., Gutiérrez, A., Del Río, J, C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol.* 8:195–204.

Medina-Bellver, J. I., Marín, P., Delgado, A et al. 2005. "Evidence for *in situ* crude oil biodegradation after the Prestige oil spill." *Environmental Microbiology*. 7(6):773–779.

Mollea, C., Bosco, F., Ruggeri, B. 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere*. 60(5):636-643.

Moody, J. D., Fu, P. P., Freeman, J. P., Cerniglia, C. E. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Environ Microbiol*. 70: 13–19.

Mutnuri, S. et al. 2005. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67(4):569-576.

Namkoong, W., Hwang, E., Park, J., Choi, J. 2002. Bioremediation of dieselcontaminated soil with composting. *Environmental Pollution*. 119:23-31.

National Toxicological Program (NTP). 2002. Tenth Report on Carcinogens. Report of the NTP on Carcinogens. National Academy Press, Washington, DC.

Nikolova, N., Nenov, V. 2005. BTEX degradation by fungi. *Water Science & Technology*. 51(11): 87-93.

Núñez, R. 2003. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana. Cuba.

Oliveira, R., Alves, F. 2013. Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. NBC, *Belo Horizonte, MG. 03(05):* 2238-1945.

Peng, R, H., Xiong, A, S., Xue, Y., Fu, X, Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y, S., Yao, Q, H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol.* 32: 927–955.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, R,T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* 5: 53–63.

Pineda-Flores, G., Mesta, A, M. 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Latinoam Microbiol.* 43(3):143-150.

Pinhassi, J., Hagstrom, A. 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol.*21:245–256.

Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H., Omori, T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. *FEMS Microbiol Lett.* 238: 297–305.

Potin, O, et al. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 54(1):45-52.

Pozdnyakova, N, N. 2012. Involvement of the ligninolytic system of white-rot and litter-decomposing fungi in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol.*20: ID 243217.

Rabinovich, M.L., Bolobova ,A, V., Vasil'Chenko, L, G. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl Biochem Microbiol* 40:1–17.

Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., Steiman, R. 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*. 40: 557-563.

Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., Ron, E, Z. 1992. Petroleum bioremediation– a multiphase problem. *Biodegradation*. 3:337-350.

Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., Birnbaum, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*. 136:187-195.

Schmidt, W. 2000. Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible. Cooperación Técnica Alemana (GTZ). En: www.gtz.org.mx/sitios-contam/articulos/biorremed_Mex2.pdf.

Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., Warshawsky, D. 1996. Degradation of pyrene, benzo[a]anthracene and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl Environ Microbiol*. 62:13–19.

Senior, E., Balba, M, T, M.1990. Refuse decomposition. In: Senior, E. (ed) *Microbiology of landfill sites*. CRC Press, Boca Raton, FL: 18-57.

Seo, J., Keum, Y., Hu, Y., Lee, S., Li, Q, X. 2007. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegradation*. 18:123–131.

Shaw, G, R., Connell, D, W.1994. Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 135: 668-675.

Shimada, T. 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 21:257–276.

Shmaefsky, B, R. 1999. Bioremediation: Panacea or fad? Access Excellence. The National Health Museum. <http://www.accessexcellence.org/LC/ST/st3bg.html>.

Shuttleworth, K, L., Cerniglia, C, E. 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation. *Appl Biochem Biotechnol*. 54:291–302.

Snajdr, J., Dobiášová, P., Vetrovský, T., Valášková, V., Alawi, A., Boddy, L., Baldrian, P. 2011. Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. *FEMS Microbiol. Ecol*. 78:80-90.

Solanas, A, M., Silva, O et al. 2009. La Biodegradación de Hidrocarburos y su Aplicación en la Biorremediación de Suelos, Estudios en la Zona no Saturada del Suelo. IX. 18 a 20 de Noviembre.

Steffen, K, T., Hatakka, A., Hofrichter, M. 2003. Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. *Appl Environ Microbiol*. 69: 3957–3964.

Steffen, K.T., Tuomela, M. 2010. Fungal soil bioremediation: development for large scale applications. In: Esser, K., Hofrichter, M. (Eds.), *Mycota X*, second ed. Springer, Berlin, Heidelberg: 451-467.

Teixeira, A, S., Bento, F, M. 2007. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial. Dissertação (Mestrado em faculdade de Agronomia) - Universidade federal do Rio Grande do Sul.

Tortella, G, R., Diez, M, C. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit Rev Microbiol.* 31:197–212.

Ulrici, W. 2000. “Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants.” in *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology*, Rehm, H, J., Reed, G. 11:5–42.

Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D, W, S., Fedorak, P, M. 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl Environ Microbiol.* 60:459–466.

Venosa, A., Zhu, X. 2003. “Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands.” *Spill Science and Technology Bulletin.* 8(2):163–178.

Vyas, B, R, M., Bakowski, S., Sasek, V., Matucha, M. 1994. Degradation of anthracene by selected white-rot fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* 14:65–70.

Wick, L, Y., Munain, A, R, D., Springael, D., Harms, H. 2002 Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58:378–385.

Willison, J, C. 2004. Isolation and characterization of a novel *Sphingomonad* capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. FEMS Microbiol Lett. 241:143–150.

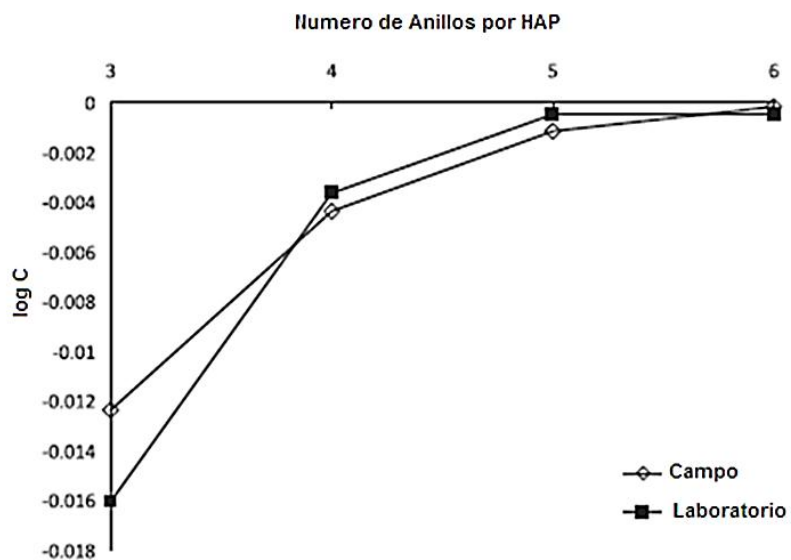
Winqvist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K, T., Jørgensen, K, S., Tuomela, M. 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi e From laboratory to field scale. International Biodeterioration & Biodegradation. 86: 238-247.

Yadav, J, S., Doddapaneni, H., Subramanian, V. 2006. P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. Biochem Soc Trans. 34: 1165–1169.

Zheng, Z., Obbard, J, P. 2003. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal isolates from an oil contaminated refinery soil. Environ Sci Pollut Res.10: 173–176.

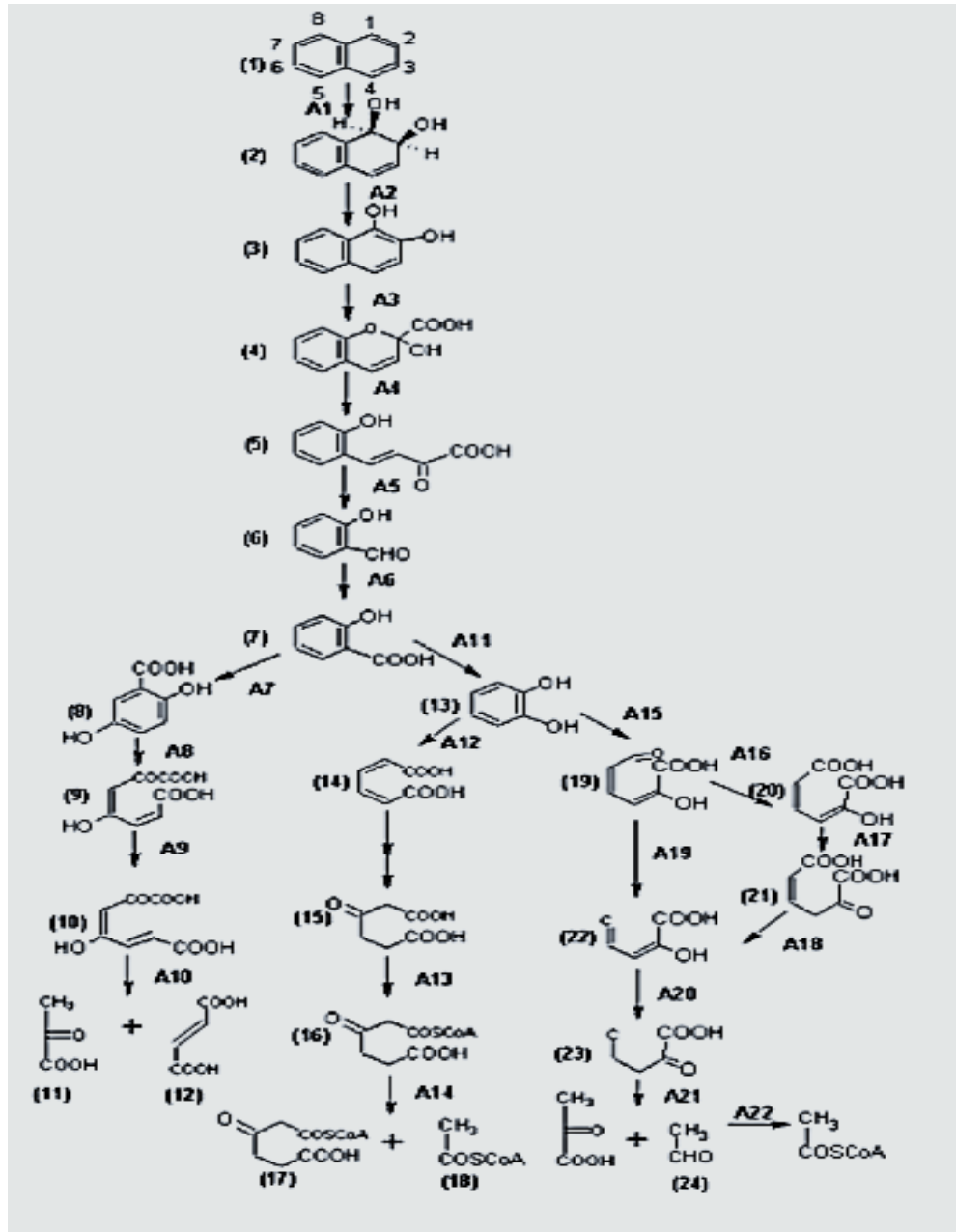
ANEXOS

Anexo A. Valores del crecimiento exponencial ($\log C$) en funcionamiento del número de anillos en HAP de 3, 4, 5 y 6 anillos. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012).



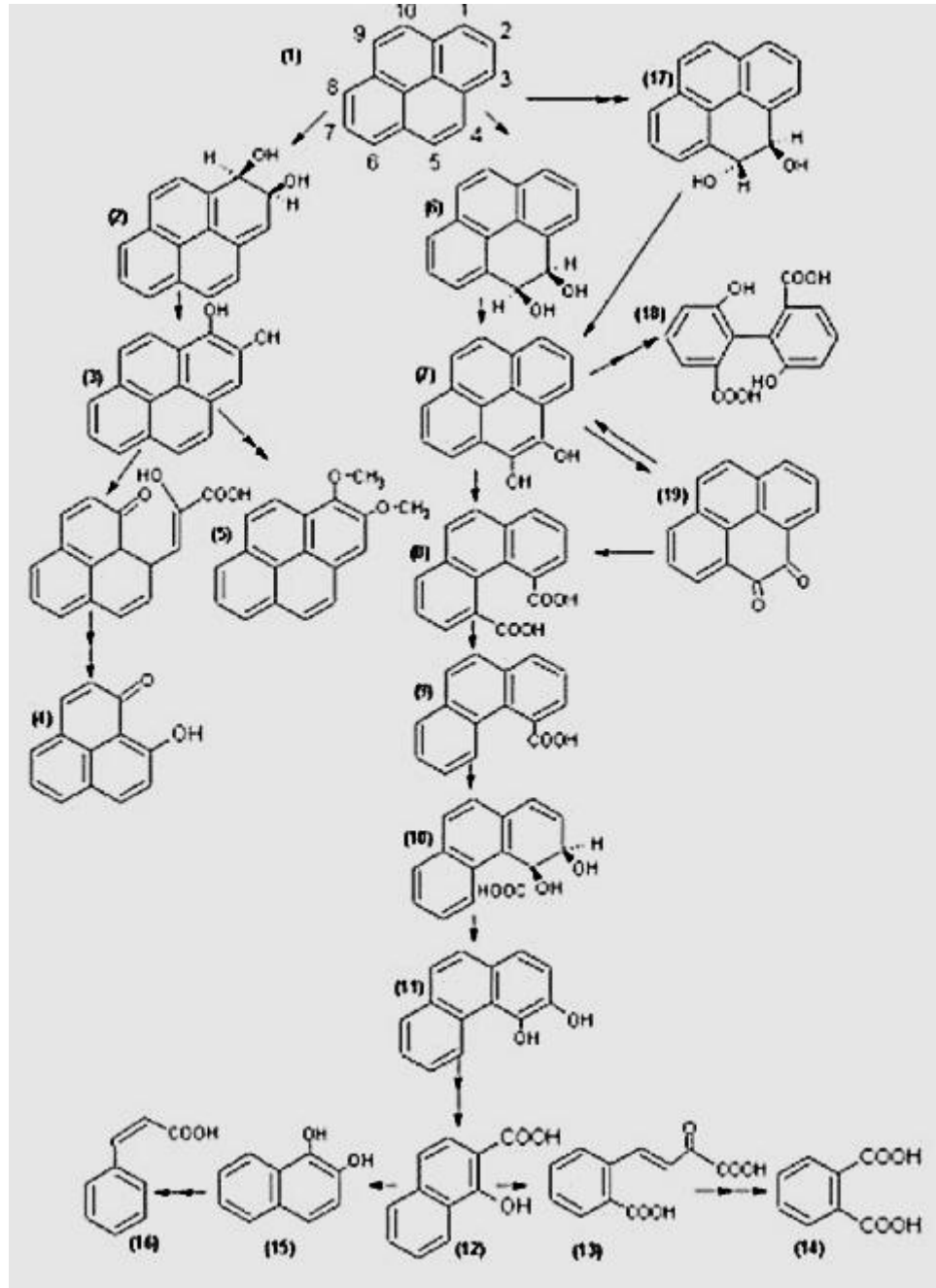
Valores del $\log C$ en funcionamiento del número de anillos en HAP de 3, 4, 5 y 6 anillos, durante la biodegradación en los experimentos de laboratorio y de campo.

Anexo B. Propuesta de las vías catabólicas de naftaleno por bacterias aeróbicas. Tomado de (Peng et al., 2008).



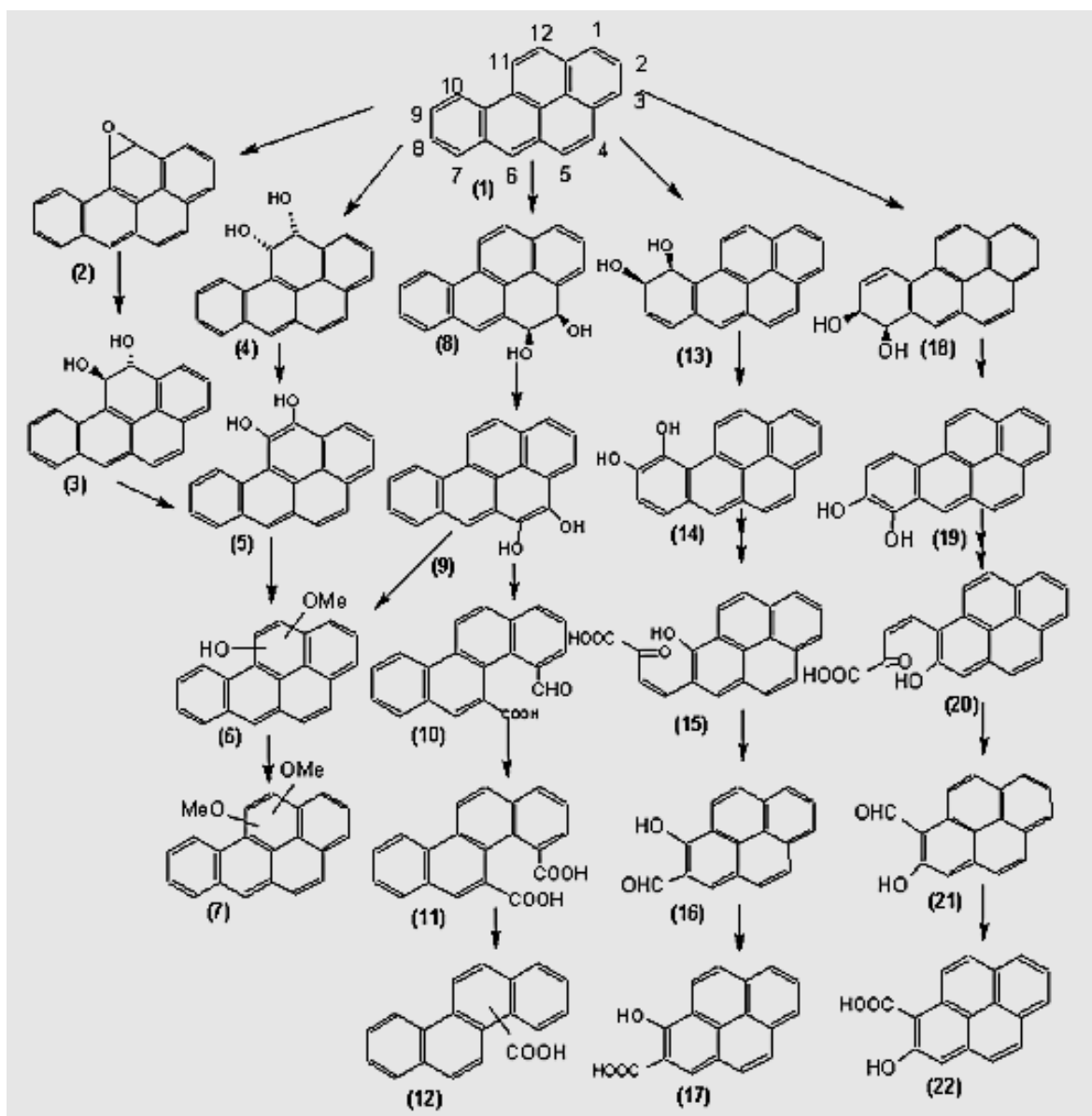
Propuesta de las vías catabólicas de naftaleno por bacterias aeróbicas. Los compuestos son naftaleno (1), cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno (cis dihidrodiol-naftaleno) (2), 1,2-dihidroxi-naftaleno (3), 2-hidroxi-2H-cromeno-2 ácido carboxílico (4), ácido trans-o-hydroxybenzylidenepyruvic (5), salicilaldehído (6), ácido salicílico (7), ácido gentísico (8), ácido maleylpyruvic (9), ácido fumarylpyruvic (10), ácido pirúvico (11), ácido fumárico (12), catecol (13), ácido cis, cis-mucónico (14), ácido β -keto adipic (15), β -ceto adipil-CoA reductasa (16), succiny-CoA reductasa (17), acetil-CoA (18), 2-hydroxymuconic-semialdehído (19), ácido 2-hydroxymuconic (20), ácido 4-oxalocrotonic (21), ácido 2-oxo-4-pentenoico (22), ácido 4-hidroxi-2-oxoaléico (23), y acetaldehído (24). Las enzimas implicadas en cada etapa de reacción son dioxigenasa naftaleno (NahAaAbAcAd) (etapa A1), cis -naftaleno deshidrogenasa dihidrodiol (NahB) (A2), dioxigenasa 1,2-dihidronaftaleno (NahC) (A3), 2-hidroxi-2H-isomerasa de cromeno-2-carboxilato de etilo (NahD) (A4), trans-o-hydroxybenzylidenepyruvic hidratasa-aldolasa (NahE) (A5), salicilaldehído deshidrogenasa (NahF) (A6), salicilato de 5-hidroxilasa (NagGHAaAb) (A7), gentisato 1,2-dioxigenasa (NagI) (A8), isomerasa maleylpyruvate (NagL) (A9), hidrolasa fumarylpyruvate (NagK) (A10), hidroxilasa salicylylate (NahG) (A11), catecol 1,2-dioxigenasa (A12), β -ceto adipato:-succinil CoA transferasa (A13), β -ceto adipil-CoA tiolasa (A14), catecol 2,3 dioxigenasa (NahH) (A15), deshidrogenasa hydroxymuconic-semialdehído (NahI) (A16), la isomerasa de 4 oxalocrotonate (NahJ) (A17), la descarboxilasa de 4-oxalocrotonate (NahK) (A18), hidrolasa hydroxymuconic-semialdehído (NahN) (A19), hidratasa 2-oxo-4-pentenoato de etilo (NahL) (A20), aldolasa 2-oxo-4-hydroxypentenoate (NahM) (A21), y acetaldehído deshidrogenasa (NahO) (A22).

Anexo C. Propuesta de las vías catabólicas de pireno por bacterias aeróbicas.
 Tomado de (Peng et al., 2008).



Propuesta de las vías catabólicas de pireno por bacterias aeróbicas. Los compuestos son pireno (1), cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidropyrene (2), pireno 1,2-dihidroxi (3) 4-hydroxyperinaphthenone (4), 1,2-dimethoxyppyrene (5), cis-4,5-dihidroxi-4,5-dihidropyrene (6), P2, 4,5-dihydroxypyrene (7), fenantreno-4,5-dicarboxilato de dimetilo (8), fenantreno-4-carboxilato de metilo (9), cis-3,4-dihydroxyphenanthrene-4-carboxilato de metilo (10), 3,4-dihydroxyphenanthrene (11), 1-hidroxi-2-naftoato de metilo (12), trans-2'-carboxybenzalpyruvate (13), ftalato de (14), 1, 2-dihydroxynaphtharene (15), ácido cinámico (16) trans-4,5-dihidroxi-4,5-dihidropyrene (17), 6,6'-dihidroxi-2, 2'-bifenil ácido dicarboxílico (18), y pireno-4,5-diona (19).

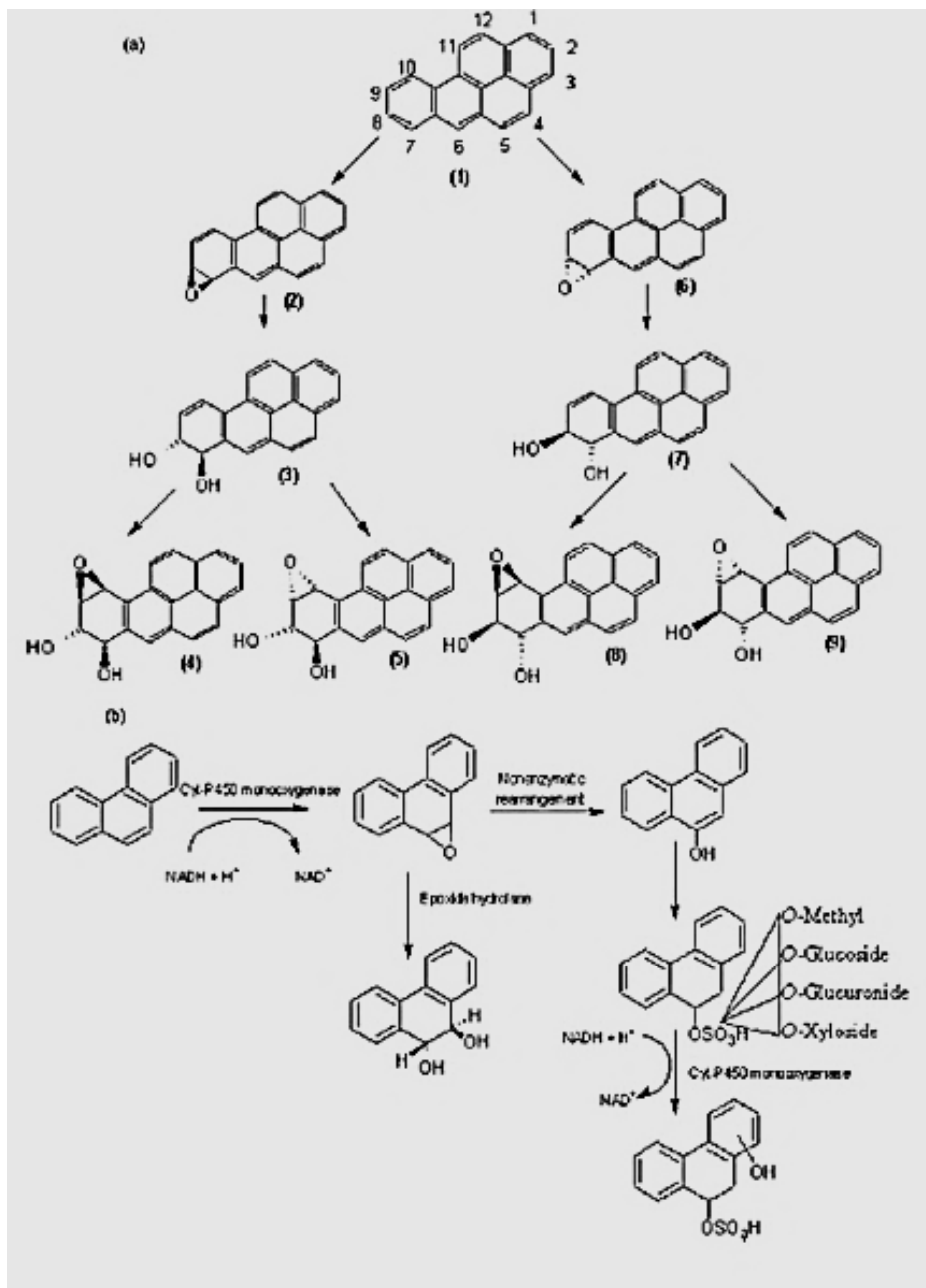
Anexo D. Propuesta de las vías catabólicas de benzo [α] pireno por bacterias aerobias. Tomado de (Peng et al., 2008).



Propuesta de las vías catabólicas de benzo [α] pireno por bacterias aerobias. Los compuestos son benzo [α] pireno (1), benzo [α] pireno-11,12-epóxido (2), trans -benzo [α] pireno -11,12-dihidrodiol (3), cis -benzo [α] pireno-11,12-dihidrodiol (4), 11,12-dihidroxi-benzo [α] pireno (5), hydroxymethoxybenzo [α] pireno (6), dimetoxibenzo [α] pireno (7), cis -benzo [α] pireno-4,5-dihidrodiol (8), 4,5-dihidroxi-benzo [α] pireno (9), ácido 4-formylchrysene-5-carboxílico (10), ácido 4,5-criseno-

dicarboxílico (11), criseno-4 (5)-carboxílico (12), cis -benzo [α] pireno-9 ,10-dihidrodiol (13), 9,10-dihidroxi-benzo [α] pireno (14), cis -4 - (8-hidroxi pireno-7-il)-2-oxobut-3-enoico (15), pireno-8-hidroxi-7-aldehído (16),--7-carboxílico hidroxi pireno-8 ácido (17), cis - benzo [α] pireno-7 ,8-dihidrodiol (18), 7,8-dihidroxi-benzo [α] pireno (19), cis -4 - (7-hidroxi pireno-8-il)-2-oxobut-3- enoico (20), pireno-7-hidroxi-8-aldehído (20), y pireno-7-hidroxi-8-carboxílico (22).

Anexo E. Vías metabólicas similares de HAP por mamíferos y hongos P450 monooxigenasa. Tomado de (Peng et al., 2008).



Vías metabólicas similares de HAP por mamíferos y hongos P450 monooxigenasa. (A) Proyecto de rutas metabólicas para la activación de benzo [α] pireno por mamíferos P450. Los compuestos son benzo [α] pireno (1), (+) benzo [α] pireno-7,8-epóxido (2), (-) benzo [α] pireno-7,8-diol (3), (-) benzo [α] pireno-7,8-

diol-9,10-epóxido-1 (4), (+) benzo [α] pireno-7,8-diol-9,10-epóxido-2 (5), (-) benzo [α] pireno-7,8-epóxido (6), (+) benzo [α] pireno-7,8-diol (7), (-) benzo [α] pireno-7,8-diol 9,10-epóxido-2 (8), y (+) benzo [α] pireno-7,8-diol-9,10-epóxido-1 (9). (B) y la vía propuesta para la degradación de fenantreno por hongos. Una vía metabólica de los hongos para la degradación de los HAP es similar a la de los mamíferos, que se considera ser la formación de diol-epóxidos por hidrolasa P450 y epóxido. Otra vía metabólica de los hongos para la degradación de los HAP que implica: hidroxilación por una monooxigenasa, la conjugación con el ion sulfato (metilo, glucósido, glucurónido, y xilósido), seguido por una hidroxilación adicional a hydroxylarylsulfatos (metilo, glucósido, glucurónido, y xilósido) compuestos.

Anexo F. Concentraciones, degradación y bioaccesibilidad en experimentos de laboratorio con suelo contaminado por HAP. Tomado y adaptado al español de (Winquist, E et al., 2014).

Componentes HAP (No. de Anillos)	Suelo no tratado ^a		Suelo aireado ^a		Tratamiento ^a con <i>P. velutina</i>	
	Conc. (mg kg ⁻¹ dm)	Fración de Bioacceso (%)	Conc. (mg kg ⁻¹ dm)	Degradación (%)	Conc. (mg kg ⁻¹ dm)	Degradación (%)
Naftaleno (2)	<0.2	Nf ^c	<0.2		<0.2	
Acenaftileno (3)	10	96	5.0	51	3.5	65
Acenafteno (3)	297	nf	9.8	97	0.4	100
Fluoreno (3)	208	96	4.6	98	0.8	100
Fenantreno (3)	735	96	4.8	99	0.7	100
Antraceno (3)	62	95	8.0	87	5.6	91
Fluoranteno (4)	1279	95	345	73	22	98
Pireno (4)	720	95	535	26	41	94
Benzo(a)antraceno (4)	53	84	31	42	6.6	88
Criseno (4)	59	83	39	34	14	76
Benzo(b)fluoranteno (5)	15	30	15	1	10	33
Benzo(k)fluoranteno (5)	13	44	11	15	6.8	47
Benzo(a)pireno (5)	8.9	nf	8.7	3	5.9	34
Dibenzo (a,h)antraceno (5)	1.5	nf	1.6	0	1.1	30
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	4.5	54	4.0	12	2.6	41
Benzo(g,h,i)perileno (6)	2.7	43	2.5	10	1.4	47
Suma de 16 HAP	3459±140 ^b		1025±4		123 ±11	

a. suelo sin tratar: sin incubación, suelo aireado: tiempo de incubación de 3 meses, tratamiento con *P. velutina*: tiempo de incubación de 3 meses.

b. Valor promedio de tres repeticiones _ SD.

c. nf ¼ no ajustarse al modelo.

Concentraciones de HAP, la degradación y bioaccesibilidad en experimentos de laboratorio con suelo contaminado por HAP diluido con residuos verdes compostado (01:01).

Anexo G. Concentraciones de cada uno de los 16 HAP reportados por la EPA, en un suelo contaminado por HAP. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012).

	[HAP] (mg kg ⁻¹ suelo seco)
Naftaleno	594.22 ± 7.96
Acenaftaleno	3.12 ± 0.03
Acenaftileno	217.42 ± 0.71
Fluoreno	226.81 ± 1.64
Fenantreno	629.31 ± 2.40
Antraceno	202.50 ± 18.31
Fluoranteno	414.34 ± 0.71
Pireno	233.44 ± 0.22
Benzo (a) antraceno	85.72 ± 0.50
Criseno	75.43 ± 0.50
Benzo (b) fluoranteno	56.18 ± 0.17
Benzo (k) fluoranteno	25.80 ± 0.18
Benzo (a) pireno	60.36 ± 3.88
Dibenzo (a,h) antraceno	6.86 ± 0.14
Benzo (g,h,i) perileno	32.45 ± 0.56
Indeno (123-cd) pireno	30.79 ± 0.15

a. Valores medios _ S.E. para tres repeticiones.

Concentración de cada uno de los 16 HAP (EPA) (reportadas en kg⁻¹ suelo seco mg) en el suelo Ti (el mismo suelo se utilizó en los experimentos de campo y de laboratorio).