

Potenciadores en el proceso de remoción biológica de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PHAS)

Enhancers in the biological removing process of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs)

Estefany Quiceno Pérez.z*, Leonardo Alberto Ríos Osorio†.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un tipo de contaminantes ambientales, formados a partir de la ignición incompleta de los combustibles fósiles, durante eventos naturales y/o actividades humanas; por tanto están siendo constantemente acumulados en el ambiente. La principal forma de eliminar estos HAP es mediante la biorremediación a partir de la capacidad de microorganismos para degradar compuestos altamente tóxicos y recalcitrantes. Los procesos de biorremediación pueden verse intensificados mediante la implementación de potenciadores, los cuales son sustancias o compuestos que apoyan las técnicas de remediación usadas actualmente mejorando los resultados obtenidos.

OBJETIVO

Describir los potenciadores implementados en la degradación biológica de HAP a partir de la literatura científica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura científica de los últimos 10 años. La búsqueda se realizó en las bases de datos *Springerlink* y en el metabuscador *ScienceDirect*, se empleó la ruta de búsqueda (*biodegradation AND (Polycyclic Hydrocarbons Aromatic OR PHA) AND enhancer AND soil*).

RESULTADOS

Se obtuvieron 22 artículos para la realización de la revisión sistemática, 15 de *Scienccdirect* y 7 de *Springer*, y se complementaron con 1 tesis de maestría y un artículo de revista no indexada. Se describen los diferentes potenciadores reportados, su naturaleza, usos y porcentajes de potenciación de la acción biorremediadora.

CONCLUSIONES

El uso de nitrógeno y algunos tipos de microorganismos generan un aumento en el efecto bioremediador de los PHAs.

PALABRAS CLAVE

Biodegradación, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, Potenciador, suelos.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a type of environmental pollutants formed from the incomplete ignition of fossil fuels, during natural events or human activities; therefore, they are being

constantly accumulated in the environment. The main way to eliminate these PAHs is by bioremediation from the ability of microorganisms to degrade highly toxic and recalcitrant compounds. Bioremediation processes may be intensified by implementing enhancers, which are substances or compounds that support remediation techniques currently used to improve results.

* Microbióloga Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia † Ph.D. en Sostenibilidad, Profesor - Investigador Grupo de Investigación Salud y Sostenibilidad, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: ijfany380@gmail.com Recepción: 2-19-2015. Aceptación: 10-23-2015.

OBJECTIVE

To describe enhancers implemented in the biological degradation of PAHs from the scientific literature.

METHODS

A systematic review of the scientific literature of the past 10 years was conducted. The search was realized on the *SpringerLink* database and *ScienceDirect* metasearch, the search path (*biodegradation* AND (*Polycyclic Hydrocarbons Aromatic* OR PHA) AND *enhancer* AND soil) was used.

RESULTS

22 articles to develop the systematic review, 15 of *ScieneDirect* and 7 of *Springerlink* were obtained and were complemented by one master's thesis and one non-indexed journal article. Different enhancers, nature, uses and percentages of enhancement of bioremediation action were described.

CONCLUSIONS

The use of nitrogen and some microorganisms generate an increase in the bioremedial effect of PHAs.

KEYWORDS

Biodegradation, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Enhancer, soil.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos de petróleo son un tipo de combustible fósil y peligroso contaminante orgánico, los cuales están presentes de forma natural en el medio ambiente y especialmente en suelos industriales. Su composición química es sumamente compleja y variable, la cual se caracteriza por tener diferentes estructuras de variado peso molecular.¹

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) hacen parte de estos hidrocarburos de petróleo y están compuestos por dos o más anillos de benceno fusionados, son altamente hidrófobos y por tanto, son absorbidos fácilmente en suelos y lodos.² Estos hidrocarburos se forman principalmente durante la quema incompleta de los combustibles fósiles así como por los vertidos de petróleo crudo o refinado, lo que resulta en una contaminación generalizada de la superficie y el subsuelo.³

La contaminación del medio ambiente por HAP

está asociada con la producción industrial y la inadecuada e ilegal eliminación de residuos de materiales que contienen HAP. Sitios contaminados con éstos son también comúnmente asociados a derrames accidentales y fugas de tanques de almacenamiento.³

Los HAP pueden permanecer en el aire durante largos períodos de tiempo absorbidos sobre partículas y pueden ser transportados a grandes distancias antes de que entren en suelo o agua.⁴ Además, también pueden acumularse en la biota. Las plantas absorben del suelo los HAP de bajo peso molecular y lo transportan fácilmente a través de sus tejidos alterando el normal desarrollo de la vegetación.⁴

El destino de los HAP en los suelos y sedimentos está relacionado con su solubilidad, biodisponibilidad, biodegradabilidad, adsorción y desorción.⁵ Por tal motivo, actualmente existen diversas estrategias para la eliminación directa de estos compuestos. Una de ellas es el lavado del suelo empleando disoluciones a base de agua y aditivos químicos, este es un proceso mecánico de separación con un enfoque eficaz y de rápida rehabilitación, siempre que los agentes de extracción sean amigables con el medio ambiente y de bajo costo. En este sentido, los tensoactivos naturales se han utilizado con éxito para solubilizar HAP, además se han empleado como agentes de lavado y como potenciadores de las tasas de degradación debido a la mejora de la biodisponibilidad del contaminante.⁴

Adicionalmente, existen métodos físicos utilizados para recuperar petróleo pesado y sus derivados, pero éstos son costosos y dan lugar a más contaminación del medio ambiente.⁶ Por tanto, el nivel de contaminación ambiental se vuelve más grave mientras la cantidad de hidrocarburos aumenta. Por esto, es importante desarrollar métodos de biorremediación que permitan la depuración de ambientes contaminados con aceites pesados por los microorganismos para hacer frente a este problema crítico.⁶

La biorremediación es una estrategia de limpieza emergente para suelos contaminados con HAP. Este es un proceso influenciado por mecanismos de sorción, adsorción o desorción, que determinan la accesibilidad de los contaminantes orgánicos e inorgánicos a los organismos que están presentes.⁵

Esta estrategia utiliza el potencial metabólico de organismos, principalmente bacterias, para reducir o eliminar riesgos medioambientales por medio de la transformación o degradación de contaminantes orgánicos.¹

La baja solubilidad acuosa y altas propiedades absorbentes de los HAP obstaculizan la biodegradación

de éstos en el suelo. La disponibilidad de un compuesto para la transformación extracelular o la capacidad para ser transportado a través de la membrana para el metabolismo intracelular puede ser el factor más importante que limita la biorremediación.⁷

En las últimas décadas, la liberación de contaminantes al ambiente ha superado los mecanismos naturales de reciclaje y autodepuración de los ecosistemas receptores. Por esta razón, hoy en día existe la necesidad de implementar procesos que aceleren o potencialicen la degradación de estos contaminantes.⁷ En este sentido, la adición de emulsionantes, agentes solubilizantes (incluyendo los sintéticos) y agentes tensoactivos naturales, ha sido considerada para mejorar la disolución de los HAP para su posterior biodegradación.⁸ También estos compuestos se encuentran a menudo, en los suelos deficientes en nutrientes y en materia orgánica por lo que la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosforados ha sido igualmente evaluada en su capacidad para estimular la actividad microbiana, mediante el aumento de la biodisponibilidad de los contaminantes.⁹

En la literatura se mencionan diversos métodos y formas de potenciar estos procesos de remoción, lo cual hace necesario realizar una revisión sistemática que recopile de manera organizada y sintética la información de estos potenciadores, con el propósito de facilitar el acceso a dicha información a personas que estén trabajando a profundidad con el tema.

El objetivo principal de esta revisión es describir los potenciadores más utilizados en la degradación biológica de HAP de acuerdo con la literatura científica, comprendida entre agosto/2004 y agosto/2014.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó una revisión sistemática de la literatura científica bajo el método PRISMA, con el fin de responder la pregunta de investigación: ¿Cuáles son los potenciadores más utilizados en el proceso de remoción biológica de hidrocarburos aromáticos policíclicos según la literatura científica de los últimos 10 años? La búsqueda de artículos se realizó en la base de datos *Springerlink* y en el metabuscador *ScienceDirect*, por especificidad utilizando las palabras obtenidas del descriptor de las ciencias de la salud Desc y por sensibilidad mediante la combinación de los términos “AND” y “OR”, con las cuales se creó la ruta de búsqueda

(*biodegradation* AND (*Polycyclic Hydrocarbons Aromatic* OR *PHA*) AND *enhancer* AND *soil*).

La primera filtración a los artículos elegidos fue una filtración técnica, la cual se realizó sólo en revistas indexadas y definida por varias condiciones de búsqueda referidas al idioma, tiempo y tipo de artículo buscado. Los artículos debían estar escritos en inglés, haber sido publicados en los últimos 10 años y ser artículos originales, la vigencia se delimitó teniendo en cuenta sólo los artículos comprendidos entre agosto de 2004 hasta agosto de 2014, y así evitar fluctuaciones en el número de artículos.

Las citas encontradas fueron importadas al software de gestión de referencias EndNote Web donde se verificó la presencia de artículos repetidos entre las diferentes bases de datos con el fin de eliminar duplicados.

En el estudio se incluyó los artículos que contenían aspectos relacionados con “biodegradación”, “potenciadores” en procesos de remoción y que este proceso de remoción se realizara en “suelos”. Se excluyó aquellos artículos cuyos potenciadores fueran elementos relacionados con biología molecular y degradación química del compuesto y además, los artículos que no indicaran la cuantificación o control del proceso de remoción, los cuales permitirían evaluar el aumento en la biodegradación del HAP con el potenciador.

Los artículos obtenidos en este último filtro fueron complementados, por exhaustividad, con la literatura gris obtenida en el buscador de *google scholar* y referida a tesis de maestría y doctorado, documentos e informes técnicos y artículos científicos publicados en revistas no indexadas, con base en la ruta de búsqueda definida.

RESULTADOS

La implementación del protocolo de búsqueda descrito anteriormente arrojó un total de 91 artículos, 55 del motor de búsqueda *Sciencedirect* y 36 de la base de datos *Springerlink*. Después de la importación de artículos al software de gestión de referencias EndNote, se obtuvo el mismo número de artículos por no haberse encontrado duplicados entre las bases de datos. Posteriormente a esto, se evaluaron los artículos con base en la introducción, metodología y resultados de cada uno. En este paso fueron eliminados 69 artículos por no cumplir con los criterios de inclusión determinados y/o cumplir los criterios de exclusión, quedando un

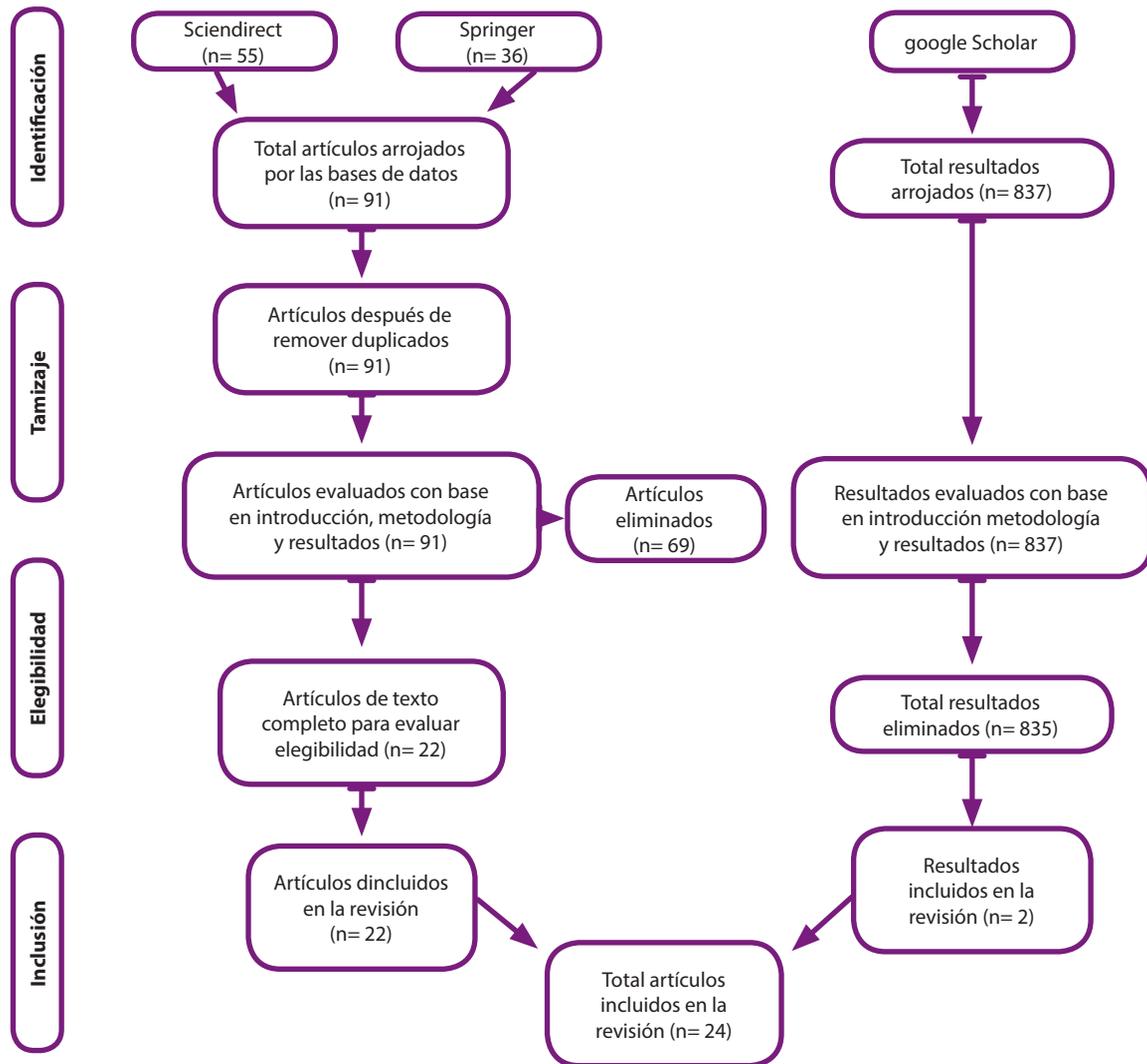


Figura 1. Esquema de la estrategia de búsqueda y resultados obtenidos.

total de 22 artículos para la realización de la revisión sistemática, 15 de *Sciencedirect* y 7 de *Springer* (Figura 1).

Aplicando el criterio de exhaustividad se obtuvieron 837 resultados, los cuales incluían artículos de investigación, tesis de pregrado y tesis de posgrado. Después de aplicar los mismos criterios de inclusión y exclusión se eliminaron un total de 835 resultados, incluyendo en la última etapa de la revisión sistemática 2 trabajos definidos de la siguiente manera: 1 tesis de maestría y 1 artículo científico de revista no indexada (Figura 1).

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno los cuales dependiendo del tipo de enlace que se forme entre una molécula y otra, son clasificados en hidrocarburos saturados y no saturados.¹⁰ Jiménez (2001)¹¹ afirma que los hidrocarburos aromáticos se encuentran dentro del grupo de los hidrocarburos no saturados, lo que quiere decir que sus estructuras están formadas por dobles o triples enlaces y se subdividen de acuerdo al número de enlaces cíclicos que comprenda su estructura (mono o policíclicos).¹¹

La investigación de estos compuestos no ha sido muy amplia, por lo tanto aunque se sabe que existen cientos de ellos, hoy en día se conoce solo a algunos, los cuales pueden ser detectados fácilmente en el ambiente¹¹ y por tanto representan los principales HAP contaminantes de suelos; entre estos compuestos se encuentran pireno, naftaleno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, benzo [b+j+k] fluoranteno, fluoreno, benzo [a] pireno, benzo [a] antraceno, criseno y el acenaftileno.¹²

Los procesos de biorremediación usados actualmente para contrarrestar el efecto de estos compuestos se clasifican en diferentes técnicas las cuales buscan manipular los factores que influyen sobre su remoción y esto se hace con el fin de crear condiciones favorables que permitan potenciar el proceso de biodegradación. Teniendo esto en cuenta, éstas técnicas son comúnmente conocidas como atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación.¹³

La atenuación natural está basada en el aprovechamiento de los fenómenos que ocurren naturalmente en el ambiente, sin intervención humana, para disminuir la concentración de los contaminantes; estos fenómenos permiten la reducción de estos compuestos en prolongados períodos de tiempo, siendo esta su principal desventaja. Entre las acciones involucradas en este método de remediación se encuentran la acción ejercida por los microorganismos presentes en este sitio, la adsorción del contaminante en las partículas, la dilución en cuerpos de agua, la evaporación por acción de la temperatura o la luz solar, entre otros.¹⁴

La técnica de bioestimulación se basa en la adición de oxígeno, nutrientes, sustratos o aditivos con actividad superficial para mejorar las condiciones del medio y estimular el crecimiento y desarrollo de organismos capaces de biodegradar compuestos contaminantes.¹⁵

La técnica de bioaumentación describe la adición de organismos (sea de la misma especie existente en el sitio para aumentar su poblaciones diferentes que se conozca que tienen potencial para degradar el compuesto específico) o enzimas de éstos para acelerar el proceso de degradación.¹⁵ Las bacterias son los microorganismos comúnmente empleados en la bioaumentación por las altas tasas de crecimiento y fácil adaptabilidad a ambientes contaminados, aunque Machin *et al.*, (2010) reportan que hongos como *Penicillium* spp también pueden ser empleados para este fin.²

Los potenciadores son compuestos o sustancias, que son adicionadas al suelo con el fin de mejorar la eficiencia de estas estrategias de remoción (atenuación

natural, bioestimulación y bioaumentación) y pueden clasificarse en diferentes grupos dependiendo de su composición: (1) potenciadores de naturaleza orgánica, este grupo a su vez se subdivide en dos, a) materia orgánica en descomposición, y b) co-sustratos, (2) potenciadores de naturaleza microbiológica y (3) potenciadores de naturaleza química (Tablas 1, 2, 3).

POTENCIADORES DE NATURALEZA ORGÁNICA

MATERIA ORGÁNICA EN DESCOMPOSICIÓN

Kobayashi *et al.* (2009)⁸ indicaron que debido a que el suelo contaminado con HAP es a menudo deficiente de nutrientes y materia orgánica, la aplicación de fertilizantes y compost son factores importantes en la estimulación de la capacidad de los microorganismos para que estos compuestos sean degradados, y refieren hallazgos que evidencian como la adición del compost a base de estiércol mejoró la mineralización de los HAP,⁵ e indican que el abono con estiércol de cerdo, específicamente, aumentó de forma significativa la remoción de pireno de un suelo. Adicionalmente, se sugiere que el lixiviado proveniente del compost puede jugar un papel importante para proporcionar una fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento microbiano.⁸

En la revisión de la literatura se encontraron reportes de algunos potenciadores de materia orgánica en descomposición que son comúnmente usados para mejorar la eficiencia de la biorremediación, entre estos, el estiércol, el cual es empleado en procesos de bioestimulación y bioaumentación^{5,16} respectivamente, el compost de estiércol, empleado en procesos de bioestimulación⁵, el lixiviado proveniente del compost en atenuación natural del contaminante⁸ y los lodos de depuradora en procesos de bioaumentación.¹⁶

Los hidrocarburos aromáticos analizados con estos potenciadores de materia orgánica fueron pireno y fenantreno como HAP comunes en todos los estudios, adicionalmente benzo [a] pireno fue analizado con lixiviado de compost, estiércol y lodos de depuradora y finalmente, fluoranteno, benzo [a] antraceno y benzo [b y k] fluoranteno se midieron con estiércol y lodos de depuradora (Tabla 1).

Pireno tuvo un porcentaje de potenciación muy significativo en la remoción mejorada con lixiviado de compost del 50,5% (Tabla 1).⁸ Además, este valor fue

Tabla 1. Potenciadores de naturaleza orgánica

Tipo		Potenciador	Estrategia	HAP	Porcentaje de Potenciación	Referencia	
Potenciadores de naturaleza orgánica	Materia orgánica en descomposición	Lixiviado de compost	Atenuación natural	Pireno	50.5	8	
				Fenantreno	11.5		
				Benzo a Pireno	48		
		Estiércol	Bioaumentación (Fitoremediación)	Pireno	36.2	16	
				Fenantreno	38.1		
				Benzo a Pireno	37		
				Fluoranteno	40		
				Benzo a Antraceno	46.8		
				Benzo b Fluoranteno	38.4		
				Benzo k Fluoranteno	45.3		
				Bioestimulación (Tween 80)	Pireno		9.3
		Fenantreno	10.3				
		Compost de estiércol	Bioestimulación (Tween 80)	Pireno	11.3	5	
				Fenantreno	12		
		Lodos de depuradora	Bioaumentación (Fitoremediación)	Pireno	25.8	16	
				Fenantreno	28.6		
				Benzo a Pireno	29.6		
				Fluoranteno	32.3		
				Benzo a Antraceno	31.6		
				Benzo b Fluoranteno	30.8		
				Benzo k Fluoranteno	28.6		
		Co-sustratos	Extracto de levadura	Bioestimulación	Acenaftileno	8.35	17
					2-metil naftaleno	48.7	
			Glucosa	Atenuación natural (V2-7)	Pireno	32.8	9
Naftaleno	51						
Fenantreno	25.6						
Fluoranteno	49.8						
Aceite de colza	Atenuación natural		Fenantreno	20.6	18		
			Fenantreno	17.4	18		
			Antraceno	2.8			
			Pireno	1.7			
Benzo a pireno	3.1						

hora, 12% con compost de estiércol, 38.1% y 28.6% con estiércol y lodos de depuradora respectivamente.

El estiércol según estos reportes fue siempre un mejor potenciador que los lodos de depuradora, esto es evidenciado por los porcentajes de potenciación observados con cada HAP analizado.¹⁶

el más alto obtenido con los diferentes potenciadores, puesto que con estiércol en el proceso que empleaba la bioaumentación para eliminar el compuesto se obtuvo un 36.2%,¹⁶ con lodos de depuradora 25.8%¹⁶ y finalmente con el compost de estiércol 11.3% de mejora en la remoción del proceso.⁵

Fenantreno obtuvo la más alta potenciación empleando lixiviado de compost, 11.5% en solo una

CO-SUSTRATOS

Las técnicas usadas actualmente encaminadas a la limpieza de suelos, tienen el mismo objetivo principal: la adición de fertilizantes, tensoactivos, oxígeno, inóculos especializados y otros productos comercialmente disponibles con el fin de reducir la densidad aparente de los suelos y facilitar su remediación; sin embargo, la principal forma de potenciar estos procesos ha sido mediante la adición de co-sustratos y material de fácil degradación en el suelo para promover la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el sitio contaminado y acelerar la biorremediación.¹⁹

El extracto de levadura,¹⁷ la glucosa^{9,18} y el aceite de colza¹⁸ fueron los potenciadores que se hallaron reportados en la literatura en la remoción de diferentes HAP, entre los cuales están acenaftileno, 2-metil naftaleno, naftaleno, fluoranteno, pireno, antraceno y benzo [a] pireno (Tabla 1).

Los porcentajes de potenciación con extracto de levadura fueron 8.35% para acenaftileno y 48.7% para 2-metil naftaleno, siendo este resultado muy positivo en la degradación.

Pizzul *et al.*, (2006), evidenciaron que los porcentajes de mejora en la degradación, alcanzados con aceite de colza como potenciador de una atenuación natural de suelos no presenta buenas eficiencias, puesto que el porcentaje más alto con este co-sustrato fue en la remoción de fenantreno (17.4%), seguido por la potenciación de benzo [z] pireno (3.1%) y finalmente, antraceno y pireno con (2.8% y 1.7%), esto indica que este potenciador no es adecuado en estos tratamientos por los bajos niveles de rendimiento.¹⁸

En el estudio donde se empleó la glucosa como potenciador, los porcentajes de mejora no tuvieron diferencias muy significativas entre sí, 25.6% para fenantreno, 32.5% para pireno, 49.8% fluoranteno y 51% para naftaleno. Sin embargo, éstos fueron los porcentajes más altos reportados en la literatura de procesos potenciados con materia orgánica como suplemento.⁹

En este estudio la glucosa fue adicionada al suelo para potenciar la degradación biológica de varios HAP por medio de la técnica de atenuación natural, en este caso, la degradación se llevó a cabo generando las condiciones adecuadas para que el microorganismo *Halomonas eurihalina* exprese el exopolisacárido V2-7, *H. eurihalina* es una bacteria moderadamente halófila capaz de sintetizar grandes cantidades de exopolisacáridos (EPS) bajo diferentes condiciones de cultivo, este EPS finalmente es quien ayuda a la degradación de los HAP.⁹

POTENCIADORES DE NATURALEZA MICROBIOLÓGICA:

Muchos organismos son usados en los procesos de biorremediación para mejorar la eficiencia, en cuanto a la disminución de la concentración de contaminantes, sea por medio de las técnicas de atenuación natural o de bioaumentación.²⁰

El uso de organismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente es la base de este proceso; debido a que son los encargados de degradar los hidrocarburos, siendo las bacterias las más utilizadas. Entre los géneros de bacterias que presentan la capacidad de realizar biorremediación se encuentran *Bacillus* spp., *Sphingobacterium*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas* spp., entre otras. También existen bacterias hidrocarbonoclasticas las cuales son verdaderas especialistas en degradar hidrocarburos ya que no metabolizan (o lo hacen en menor cantidad) azúcares, ni aminoácidos ni otras fuentes de carbono habituales. Entre estas se destaca *Cycloclasticus* debido a que asimila sólo hidrocarburos aromáticos.²¹

Estos microorganismos son referenciados en la literatura por la capacidad de degradar compuestos contaminantes como los HAP;^{2,18} igualmente se menciona que también puede ser empleado el material genético de éstos; o directamente sus enzimas producidas, conocidas como exopolímeros (Tabla 2).

La implementación de estas sustancias extracelulares (biotensoactivos) ha sido una solución eficiente,

que además ha tenido impactos muy positivos en estos procesos de remediación.²² Por el contrario la introducción de tensoactivos químicos al suelo puede conducir a otros problemas mayores de contaminación, como por ejemplo la formación de subproductos con mayor grado de toxicidad que su parental. Por tanto debe analizarse la toxicidad y los posibles productos de degradación de estos agentes antes de emplearlos como alternativa de remediación.²²

Los biotensoactivos o también llamados biosurfactantes son sustancias producidas biológicamente.²² Muchos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar una amplia gama de compuestos de superficie activa, estos pueden clasificarse de acuerdo a sus pesos moleculares (BEL: bajo peso ó BEH: alto peso), propiedades y localizaciones celulares.²⁰ De

esta manera, Pizzul *et al.*, (2006) reportaron el uso de *Rhodococcus* spp. (Tabla 2 y 3) como potenciador de la atenuación natural de suelos contaminados con HAP. Este microorganismo es utilizado por su capacidad de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono y por presentar características ventajosas, como la capacidad de producir enzimas extracelulares lo que permite la degradación de HAP.¹⁸

Esta teoría es apoyada por la investigación realizada por Machin *et al.*, (2010),² quienes sugieren la aplicación de un co-cultivo de hongo-bacteria (*Penicillium* sp. y *Serratia marcescens*) a un suelo contaminado con benzo [a] pireno; esto con el fin de mejorar su remoción debido a que este potenciador muestra un importante aumento en la degradación del compuesto (22%). Adicionalmente, Navarro *et al.*, (2008)

Tabla 2. Tipo de potenciadores de naturaleza microbológica.

Tipo	Potenciador	Estrategia	HAP	Porcentaje de Potenciación	Referencia
Potenciadores de naturaleza microbológica	Lavado con glicolípido	Atenuación natural	Fenantreno	9,7	22
	Co-cultivo	Atenuación natural	Benzo a Pireno	22	2
	ADN	Atenuación natural	Pireno	26	23
			Fenantreno	22	
			Antraceno	25	
			Benzo a Pireno	55t	
	Bioemulsionante BEL	Atenuación natural	Pireno	-53,4	20
			Fenantreno	0,6	
			Antraceno	0	
	Bioemulsionante BEH	Atenuación natural	Pireno	-39,9	20
			Fenantreno	0	
			Antraceno	-6,4	
	<i>Rhodococcus</i>	Bioestimulación (Aceite de Colza)	Pireno	0,6	18
Fenantreno			23,8		
Antraceno			3,3		
Benzo a Pireno			-0,2		

muestran la eficiencia de usar ADN de salmón en polvo en la potenciación de la degradación de pireno (26%), fenantreno (22%), antraceno (25%) y principalmente de benzo [a] pireno (55%), siendo este valor el más representativo para este grupo, contrariamente el análisis con el inóculo de *Rhodococcus* spp mostró a una inhibición en la degradación de este último HAP (-0.2%),^{18, 23}

Rhodococcus spp contrariamente a esto, si tuvo un efecto positivo en la mejora de la degradación de fenantreno. Este presentó mayor eficiencia en la potenciación al adicionar al suelo el inóculo de *Rhodococcus* spp. (23.8%), adicionalmente también analizó la potenciación de antraceno (3.3%) y pireno (0.6%) mostrando que esta bioaumentación no afectó positiva ni negativamente la degradación de estos dos HAP.

Franzetti *et al.*, (2009), compararon la eficiencia

potenciada en la remoción, aplicando al suelo bioemulsionantes producidos por *Gordonia* sp de diferentes pesos moleculares, este estudio evaluó la remoción de pireno, fenantreno y antraceno; y según sus reportes, el único efecto relevante en este proceso fue una fuerte inhibición que se presentó con ambos bioemulsionantes (BEL y BEH) en la remoción de pireno, -53.4% con BEL y -39.9% con BEH, evidenciando ser un compuesto inviable para ser empleado en la remoción de este HAP específico²⁰ (Tabla 2).

En la tabla 2 se encuentran reportados los potenciadores de naturaleza microbiológica y además otros microorganismos involucrados en procesos de biorremediación encontrados en la literatura, como es el caso de *Sphingomonas* spp. Este microorganismo fue reportado por Navarro *et al.*, (2008),²³ en el proceso donde el potenciador era lixiviado de compost y *A.*

Tabla 3. Microorganismos asociados a la remoción de HAP según la literatura

Microorganismo	HAP	Referencia
<i>Sphingomonas</i> sp.	Pireno, Fenantreno, Benzo a pireno, Antraceno	8
<i>Bacillus Flavobacterium</i>	Pireno, Fluoranteno, Fenantreno, Benzo a pireno, Benzo a antraceno, Benzo b fluoranteno, Benzo K fluoranteno	16
<i>Gordonia</i> BS29	Fenantreno, Antraceno, Pireno	20
<i>Rhodococcus</i> sp.	Fenantreno, Antraceno, Pireno, Benzo a pireno	18
<i>Halomonas eurihalina</i>	Pireno, Fenantreno, Naftaleno, Fluoranteno	9
<i>Micrococcus leteus</i>	Fenantreno	24
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Naftaleno	24
<i>Bacillus pumilus</i>	Pireno	
<i>Serratia marcescens</i>	Benzo a pireno	2
Coliformes, <i>Streptococcus</i>	Acenaftileno, 2-metilnaftaleno	17
Mesófilos aerobios	Fluoranteno, Fenantreno, Fluoreno, Pireno, Benzo a pireno, Criseno, Antraceno	25
Hongo <i>Irpex lacteus</i>	Antraceno, Fenantreno, Pireno, Fluoranteno	2
<i>Penicillium</i> sp.	Benzo a pireno	2

faecalis reportada por Toledo *et al.* (2006)²⁴ en la remoción de naftaleno empleando xileno como potenciador.

POTENCIADORES DE NATURALEZA QUÍMICA:

Los potenciadores de este grupo actúan generalmente sobre las propiedades físicas y químicas del suelo en un proceso de biorremediación, aunque compuestos químicos como el nitrógeno es empleado para ayudar a la estimulación y desarrollo de los microorganismos facilitando la remoción del contaminante por técnicas de atenuación natural.²⁶ Este potenciador mostró altos niveles de mejora en el proceso con fenantreno (83.8%)

siendo esto contrario a lo encontrado con pireno y fluoranteno (1% y 0.2% respectivamente) (Tabla 4).

Existen diferentes compuestos químicos como el cocamidopropyl hydroxysultaine (CAS),²⁷ metanol,²⁵ hexadecano¹⁸ y xileno²⁴ que buscan emulsionar contaminantes para facilitar su posterior degradación. Estos compuestos son a menudo reportados en la literatura científica como potenciadores en la remoción biológica de HAP.

El uso de tensoactivos químicos como el CAS, representa un método eficiente para mejorar el acceso de los microorganismos a los compuestos que presentan baja solubilidad acuosa, como los HAP. Sin embargo,

Tabla 4. Tipo de potenciadores de naturaleza química.

Tipo	Potenciador	Estrategia	HAP	Porcentaje de Potenciación	Referencia
Potenciadores de naturaleza química	Xileno	Atenuación natural (Exopolímero)	Pireno	34,5	24
			Fenantreno	59	
			Naftaleno	55,3	
	CAS	Atenuación natural	Benzo (b+j+k) Fluoranteno	62,5	27
			Criseno	61,7	
	Metanol	Bioestimulación (Lodos de depuradora)	Pireno	25,5	25
			Fenantreno	5,9	
			Antraceno	8,4	
			Benzo a Pireno	21,7	
			Fluoranteno	10	
			Criseno	-8,2	
	Hexadecano	Atenuación natural	Fluoreno	8,9	18
			Fenantreno	1,2	
	Nitrógeno	Atenuación natural	Pireno	1	26
			Fenantreno	83,8	
Antraceno			53,9		
Fluoranteno			0,2		
Fenton	Bioestimulación (Tween 80, tergitol y tritón)	Fenantreno	1,8	3	
		Pireno	6,5		

la elección de qué tipo de tensoactivo emplear, es el primer paso que debe tenerse en cuenta para garantizar la eficiencia del proceso,²⁰ debido a que muchos de estos compuestos pueden formar subproductos con mayor grado de toxicidad que el anterior. Según lo reportado por Dhenain *et al.*, (2009)²⁷ los surfactantes tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica, esto hace que un tensoactivo no esté a gusto en solvente polar ni apolar únicamente, sino en ambos a la vez. Esto sólo pasa en la superficie de dos fases, por tanto son muy empleados en la remoción de aceites pesados de cuerpos de agua y sedimentos.²⁰

El metanol es otro de los potenciadores encontrados en la literatura, y según Trably *et al.*, (2006)²⁵ puede mejorar el proceso de bioestimulación con lodos de depuradora. El metanol presentó el porcentaje más alto de potenciación en la degradación de pireno (25.5%), mientras que en la remoción de criseno se evidenció un efecto inhibitorio, dando como resultado un porcentaje de potenciación negativo (-8.2%).²⁵

Toledo *et al.*, (2006) reportaron que la remoción de fenantreno empleando xileno como potenciador mejoró un 59%, naftaleno 55.3% y pireno en menor proporción 34.5%, esta remoción se vio potenciada por el aumento en la producción del exopolímero, el cual es el encargado de la solubilización de los contaminantes.²⁴

En la actualidad, no existen procedimientos definidos en la literatura científica, para seleccionar un tensoactivo definido, el cual pueda emplearse en el tratamiento de un sitio contaminado específico. Las razones de que esto suceda, contempla que las condiciones ambientales, la carga microbiana, los factores físico-químicos y la concentración del contaminante son muy variables de un sitio a otro.²⁰

DISCUSIÓN

La potenciación es una técnica que en la actualidad ha ganado fuerza en los procesos de remoción biológica. El hallazgo inicial de un gran número de artículos sobre este tema apoya esta teoría.⁸

El término con el cual se describe esta técnica ha sido un inconveniente identificado; debido a que puede encontrarse de diferentes maneras para expresar un mismo significado. Potenciación (o también llamado potencialización), hace referencia a aumentar o mejorar las características de algo que ya existe. Por tanto, es una definición simple de las técnicas que se están

buscando implementar en las tecnologías de biorremediación, buscando así que los procesos sean más eficientes, disminuyan los costos de tratamiento, requiera menos tiempo de remoción y sean más amigables con el medio ambiente.¹⁶

Dentro de los aspectos descritos en la potenciación, las técnicas usadas actualmente para la remoción biológica de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) han tenido un gran aporte. La potenciación está dirigida a mejorar las condiciones ambientales y experimentales descritas en cada caso, sea atenuación natural, bioestimulación y/o bioaumentación, siendo esta técnica otra forma de estimular el proceso para obtener mejores resultados en menor tiempo.²⁸

Los estudios de potenciación tienen como objetivo analizar estas diferentes formas de contrarrestar el efecto de un contaminante en el ambiente, a causa de esto, se desprenden las diferentes posibilidades de mejorar el proceso. Es decir, diferentes formas de atenuar un contaminante requiere diferentes formas de mejorarlo. Esto es la base de la potenciación.²⁸

Los co-sustratos también fueron encontrados en la literatura como potenciadores, y estos son sustancias o elementos empleados de forma cotidiana a nivel industrial y en los procesos bioquímicos, que además tienen distintos fines, como por ejemplo, suplemento de cultivos microbianos. Estos co-sustratos se han venido utilizando y explorando en los procesos de potenciación debido a las grandes ventajas que traen sobre los procesos de biorremediación.¹⁸

Por tanto, la mejora del proceso de remoción, puede hacerse mediante la implementación de materia orgánica en descomposición o co-sustratos, como es el caso de los tipos de potenciadores de naturaleza orgánica (Tabla 1), la introducción de microorganismos, material genético o sus enzimas, como los potenciadores de naturaleza microbiológica (Tabla 2) y/o el uso de compuestos químicos como los potenciadores de naturaleza química (Tabla 4).

Zhang *et al.*, (2012) reportan que residuos orgánicos se han considerado para ser una solución eficaz en la remoción de contaminantes persistentes en el suelo. Por un lado, la materia orgánica, desempeña un papel importante en la contribución de nutrientes al suelo ayudando a la mineralización de estos, y por otra parte, los desechos orgánicos siempre son ricos en materia orgánica disuelta (DOM), y la presencia de ésta en la fase acuosa, está involucrada con la disminución de la sorción del HAP y por lo tanto, mejora su movilidad y remoción.¹⁶

Esto es apoyado por los resultados obtenidos en la revisión de la literatura, puesto que en todos los estudios encontrados con diferentes potenciadores de materia orgánica en descomposición, hubo un alto porcentaje de potenciación en la remoción de todos los HAP evaluados, incluso pireno, el cual es considerado uno de los HAP más difíciles de remover por su alto peso molecular, y éste increíblemente obtuvo el mejor porcentaje de potenciación al adicionar lixiviado de compost como potenciador.⁸

El potenciador más comúnmente usado, dentro de los potenciadores orgánicos de materia en descomposición fue el estiércol,^{5,16} los HAP evaluados abarcan pireno, fenantreno, benzo [a] pireno, fluoranteno, benzo [a] antraceno, entre otros. A partir de esto, se determinó que los resultados más significativos están relacionados con la degradación de benzo [a] antraceno, presentando el porcentaje de potenciación más alto encontrado usando estiércol como potenciador; aunque no el más alto del grupo de los potenciadores orgánicos.¹⁶ Analizando todos los porcentajes, el más alto se observó en la degradación de pireno, con lixiviado de compost. Esto sugiere claramente, que este potenciador, tiene una mayor contribución a la disolución de pireno que los otros potenciadores orgánicos, facilitando la degradación del compuesto por *Sphingomonas* spp. Adicionalmente el aporte de nutrientes que pudo contener este lixiviado es otra razón a tener en cuenta.⁸

La glucosa fue el co-sustrato dentro del segundo grupo de potenciadores orgánicos, que presentó mejores resultados, esto lo evidencian los autores Martínez *et al.*, (2007)⁹ y Pizzul *et al.*, (2006)¹⁸ quienes analizaron el efecto de este potenciador en la degradación de diferentes HAP, mostrando que en el mejor de los casos, se obtuvo hasta 51% de potenciación con naftaleno (Tabla 1). Este resultado es muy aceptado, debido a que la glucosa es una fuente de carbono utilizada ampliamente por la mayoría de las bacterias, ayudando a una mayor tasa de reproducción de éstas, y por consiguiente la remoción del contaminante más efectiva.⁹

Dentro de los potenciadores de naturaleza microbológica están contemplados los bioemulsionantes, estos son los más comunes encontrados en la literatura para este grupo. Aunque aun siendo los más usados no mostraron altos porcentajes de potenciación, y por el contrario, en el caso de la degradación de fenantreno y antraceno no mejoró la remoción y particularmente con pireno presentó un alto efec-

to de inhibición (-53.4%), de hecho, el más alto que se encontró,²⁰ evidenciando de esta manera que los bioemulsionantes no son una buena alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con pireno, haciendo necesario la implementación de otros tipos de potenciadores que evidencien mejores resultados como el lixiviado de compost o el estiércol.²⁰ De este grupo de potenciadores microbiológicos el que mostró niveles más altos de potenciación fue el ADN que aunque solo apareció reportado en el estudio de Navarro *et al.*, (2008)²³ evidenció altas tasas de degradación de todos los contaminantes analizados, especialmente en los más difíciles de remover (pireno y benzo [a] pireno), esto indica que el ADN es un excelente potenciador en cuanto a eficiencia, aunque no se encontró muy reportado. Esto puede explicarse debido a que probablemente, desde el punto de vista económico, es un producto inviable por los altos costos que supone emplearlo, el cual según lo reportado por los autores Navarro *et al.*, (2008),²³ es un producto en polvo a base de ADN de salmón, lo cual incrementaría considerablemente los costos de operación.²³

Finalmente, en cuanto a los potenciadores de naturaleza química se encontraron porcentajes muy altos en la mejora del proceso de remoción. Esta es una información que no es inesperada, puesto que éstas eran las medidas que se usaban con mayor frecuencia anteriormente en los tratamientos de remoción.²⁷ Kobayashi (2009) reportó que anteriormente se intentaba mejorar la degradación de HAP empleando surfactantes químicos, pero luego se diezron cuenta que ciertos de estos compuestos podrían ser tóxicos para los microorganismos y además podrían reducir la biodegradabilidad de los HAP, debido a la formación de micelas que limita el transporte de nutrientes.⁸ En este sentido, los biosurfactantes se comenzaron a utilizar y han mostrado valiosos resultados en cuanto a la solubilización de HAP. Se han empleado tanto como agentes de lavado, como potenciadores de las tasas de degradación de HAP debido a la mejora de la biodisponibilidad del contaminante.⁶

Cuando el surfactante CAS y el nitrógeno fueron los potenciadores empleados se observó altos porcentajes de potenciación, mientras que con hexadecano y fentón no se obtuvieron cambios significativos en los tratamientos.^{3,18} La adición de xileno como potenciador químico aumentó considerablemente la producción del exopolímero y por tanto mejoró la remoción de fenantreno y naftaleno, sin embargo aunque son valores muy altos, no fueron los porcentajes más re-

presentativos del grupo de potenciadores químicos. Mientras que si lo son los valores de CAS (61.7% para criseno) y nitrógeno (83.8% para fenantreno).^{26,27}

En general, teniendo en cuenta todos los tipos de potenciadores encontrados en la literatura, el tratamiento que presentó mejores resultados, fue utilizando nitrógeno como potenciador. Esto se analizó en un proceso de remoción de suelo contaminado con fenantreno, por medio de la técnica atenuación natural, y el potenciador que en definitiva tuvo el efecto de inhibición más alto fue el bioemulsionante de bajo peso molecular frente a la degradación de pireno.²⁰ El uso de microorganismos como degradadores de contaminantes ha sido una alternativa muy eficiente, no solo por el trabajo de atenuación natural que ejercen, sino por el alto potencial que tiene la adición de nuevos microorganismos al sistema, generando principalmente efectos de bioaumentación.¹⁸ Es bien conocido que los microorganismos que crecen en hidrocarburos, con frecuencia producen biopolímeros o bioemulsionantes. Esta propiedad se considera como una estrategia biológica para facilitar la disponibilidad de sustratos hidrófobos, y adicionalmente, con esta producción de exopolímeros se puede estimular el crecimiento de otras bacterias degradantes de HAP y mejorar su capacidad de utilizar estos compuestos como fuente de sustrato y energía. Por tanto muchos trabajos se han centrado en el aislamiento y conservación de estos microorganismos para emplearlos en diferentes sitios contaminados.²⁴

Las cepas que degradan los HAP y que han sido caracterizadas hasta el momento en la literatura, son taxonómicamente muy diversas, y principalmente pertenecen a los géneros *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Sphingomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Mycobacterium* spp.²⁴ Esto se ve apoyado en los hallazgos de la literatura, debido a que muchos de los microorganismos encontrados en la revisión coinciden con estos, aunque no todos fueron encontrados en los artículos, como es el caso de *Pseudomonas* spp.

Uno de los microorganismos más representativos de la revisión, fue *Halomonas eurihalina*. Esta bacteria es capaz de sintetizar grandes cantidades de exopolisacáridos bajo diferentes condiciones de cultivo, además tiene la propiedad de emulsionar una amplia gama de hidrocarburos. El exopolímero que es producido por varias cepas de esta especie ha mostrado interesantes propiedades, incluyendo su capacidad para aumentar la solubilidad de compuestos hidró-

fobos, lo que lo hace deseado para ser implementado en muchos procesos de remoción.⁹

Los autores Pizzul *et al.*, (2006) evidencian la importancia de la implementación de microorganismos en la remoción de HAP, confirmando la influencia de éstos con el inóculo de *Rhodococcus* spp. en la degradación de fenantreno.¹⁸ Otros microorganismos encontrados en los artículos se referencian en la **tabla 3** y además se describen los HAP a los que se encontraron asociados.

Los estudios más comunes de remoción de HAP se dan en cuerpos de aguas y suelos. Los derrames de estos compuestos en agua presentan diferentes técnicas de remoción, las cuales aprovechan la insolubilidad de los aceites, los cuales permanecen sobre la superficie del agua para extraerlos. Excepto cuando la cantidad de éstos es muy alta, aumentando el peso, lo cual genera un desplazamiento del contaminante hacia el sedimento. Mientras que los derrames en suelo generan una contaminación que puede llegar a ser invisible en los primeros años debido a la filtración de éste en el suelo, generando grandes daños a los ecosistemas a largo tiempo.²⁹

Los potenciadores, microorganismos, técnicas de remoción y demás factores ambientales tienen una fuerte influencia en la biorremediación de suelos contaminados con HAP, puesto que la absorción y adsorción de estos compuestos en esta matriz es un tema que requiere muchos estudios debido a la dificultad que presenta la extracción de estas moléculas tan recalcitrantes.^{4,29}

Por tanto, y teniendo en cuenta los posibles efectos que estos contaminantes traen sobre el medio ambiente y la salud humana, se ve reflejada la importancia de realizar este estudio; el cual permite hacer un análisis de los posibles métodos de potenciación de la remoción de HAP en suelos, según los porcentajes obtenidos en previos estudios, reportados en la literatura científica.

Factores como las condiciones experimentales de cada estudio, el tiempo observado del proceso, las metodologías empleadas, las unidades de medida, los métodos de cuantificación de los HAP y las propiedades específicas de cada suelo sobre los que se realizaron los estudios; impiden realizar comparaciones más puntuales entre las eficiencias de cada potenciador, dejando un margen de error que no es posible cubrir sobre los resultados presentados.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta toda la información encontrada y el análisis de la misma se puede concluir que el nitrógeno fue el potenciador reportado en la literatura que presentó mejores resultados en cuanto a aumentar la remoción de HAP, con un efecto de potenciación sobre el fenantreno de 83.8%. Además se evidenció que el uso de microorganismos en procesos de remediación, tiene alta influencia en aumentar la degradación de contaminantes en suelos afectados con HAP proponiendo nuevas alternativas de solución para este problema.

Un hallazgo muy importante encontrado es que existe gran cantidad de literatura científica que describe los procesos de remoción biológica de hidrocarburos de petróleo y sus derivados, y da cuenta del número de sustancias y compuestos que se pueden usar para mejorar, estimular y potenciar los procesos de biorremediación, disminuyendo así los grandes riesgos contra la salud y el medio ambiente que esto representa; este es el caso de los co-sustratos encontrados en la investigación, los cuales según la literatura han demostrado tener el potencial de mejorar dichos procesos. Sin embargo, no se encontraron suficientes investigaciones específicas sobre la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos, que permitieran generar datos concluyentes sobre cuál es el potenciador que debe usarse en cada caso particular.

Finalmente y ante la problemática cada vez mayor que se evidencia a nivel mundial, con los combustibles fósiles, se ha visto la necesidad y la relevancia de investigar más a fondo sobre la biorremediación y las formas de hacerla más eficiente, explorando alternativas novedosas de potenciación que ofrezcan mejores resultados en este proceso.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Torres K, Zuluaga T.** Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2009.
- Machin D, Morales D, Martínez F, Okoh A, Trejo M.** Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. *International Biodegradation and Biodegradation* 2010; 64 (7): 538-544.
- Piskonen R, Merja I.** Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004; 65(5): 627-634.
- Ruihong Y.** Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Contaminated Soils in a Roller Baffled Bioreactor. Tesis de maestría. University of Saskatchewan; Saskatoon, Saskatchewan; 2006.
- Cheng K, Wong J.** Combined effect of nonionic surfactant Tween 80 and DOM on the behaviors of PAHs in soil-water system. *Chemosphere* 2006; 62(11): 1907-1916.
- Ruixia H, Anhuai L.** Biodegradation of heavy oils by halophilic bacterium. *Progress in Natural Science* 2009; 19(8): 997-1001.
- Garbisu C, Amézaga I, Alkorta I.** Biorremediación y Ecología. *Ecosistemas* 2002; 3: 1-2.
- Kobayashi T, Murai Y, Tatsumi K, Limura Y.** Biodegradación of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. enhanced by water-extractable organic matter from manure compost. *Science of The Total Environment* 2009; 407(22): 5805-5810.
- Martínez-Checa F, Toledo F, El Mabrouki K, Quesada E, Calvo C.** Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresource Technology* 2007; 98: 3130-3135.
- Riser-Roberts E.** Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and Chemical Processes. Florida: Lewis Publishers; 1998.
- Jiménez BE.** La contaminación ambiental en México. Causas, efectos y tecnología apropiada. México: Colegio de ingenieros ambientales de México, A.C., Instituto de Tecnología de la UNAM, FEMISCA; 2001.
- Acuña-Arias F.** Química Orgánica. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia; 2006.
- Organización Marítima Internacional.** Organización Marítima Internacional. Manual sobre la contaminación ocasionada por hidrocarburos. Parte 4: lucha contra los derrames de hidrocarburos. Segunda edición. Londres: OMI; 2005.
- Corona L, Iturbe R.** Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería. Investigación y Tecnología* 2005; 6(2): 119-126.
- Ortiz E, Núñez R, Fonseca E, Oramas J, Almazán V, Cabranes Y, Miranda A, et al.** Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente.* (6): 51-60.

16. **Zhang J, Lin X, Liu W, Wang Y, Zeng J, Chen H.** Effect of organic wastes on the plant-microbe remediation for removal of aged PAHs in soils. *J Environ Sci* 2012; 24(8): 1476-1482.
17. **Bertin L, Capodicasa S, Occulti F, Girotti S, Marchetti L, Fava F.** Microbial processes associated to the decontamination and detoxification of a polluted activated sludge during its anaerobic stabilization. *Water Research* 2007; 41(11): 2407-2416.
18. **Pizzul L, Castillo M, Stenström J.** Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil. *World J Microbiol Biotechnol* 2006; 22(7): 745-722.
19. **Ferrera R, Rojas N, Poggi H, Alarcón A, Cañizares R.** Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol* 2006; 48(2): 179-187.
20. **Franzetti A, Caredda P, Ruggeri C, La Colla P, Tamburini E, Papacchini M, et al.** Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 2009; 75(6): 801-807.
21. **Roy S, Hens D, Biswas D, Biswas D, Kumar R.** Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World J Microbiol Biotechnol* 2002; 18(6): 575-581.
22. **Kyung-Hee S, Kyoung-Woong K, Yeonghee A.** Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process. *J Hazard Materials* 2006; 137(11): 1831-1837.
23. **Navarro R, Limura Y, Ichikawa H, Tatsumi K.** Treatment of PAHs in contaminated soil by extraction with aqueous DNA followed by biodegradation with a pure culture of *Sphingomonas* sp. *Chemosphere* 2008; 73(9): 1414-1419.
24. **Toledo F, Calvo C, Rodelas B, González-López J.** Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology* 2006; 29(3): 244-252.
25. **Trably E, Patureau D.** Successful Treatment of Low PAH-Contaminated Sewage Sludge in Aerobic Bioreactors (7 PP). *Environmental Science and Pollution Research* 2006; 13(3): 170-176.
26. **Cajthaml T, Erbanová P, Kollmann A, Novotný Č, Šásek V, Mougín C.** Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiologica* 2008; 53(4): 289-294.
27. **Dhenain A, Mercier G, Blais JF, Chartier M.** Combined column and cell flotation process for the treatment of PAH contaminated hazardous wastes produced by an aluminium production plant. *J Hazard Materials* 2009; 165(1-3): 394-407.
28. **Sánchez J, Rodríguez JL.** Biorremediación: Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y Minería* 2003; 351: 17-21.
29. **Maroto E, Quesada R.** Procesos de evolución de la descontaminación "in situ" de suelos afectados por hidrocarburos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid; 2003.