



Interpretación conceptual del estado actual de la biorremediación realizada por microorganismos sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del petróleo

Luis Leonardo Lugo Mancilla

Universidad de Manizales
Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas
Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente
Manizales, Colombia
2017

Interpretación conceptual del estado actual de la biorremediación realizada por microorganismos sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del petróleo

Luis Leonardo Lugo Mancilla

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente

Director:

Doctor Walter Murillo Arango

Línea de Investigación:

Biosistemas Integrados

Universidad de Manizales

Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas

Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente

Manizales, Colombia

2017

Dedicatoria

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

A Dios

Agradecimientos

A todos los investigadores del tema citados en el trabajo.

A mi director, el profesor Walter Murillo Arango

A mi esposa e hijos

A mis padres

A la Universidad de Manizales

A la Biblioteca de la Universidad Santo Tomas seccional Bucaramanga y sus profesionales del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación CRAI, por permitir realizar el convenio con la Universidad de Manizales y poder tener el acceso al software Vantage Point, versión 9.0.

Este trabajo presenta las opiniones personales de los autores, por lo que los posibles errores y conceptos emitidos son de responsabilidad exclusiva de éstos y no comprometen a la Universidad de Manizales ni a sus directores, asesores y jurados.

Resumen

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 y derivados del petróleo, los cuales afectan los suelos, ecosistemas y la biota que habita en ellos. Los procesos de la biorremediación demuestran ser efectivos en la remoción de estos contaminantes por diferentes lapsos de tiempo y teniendo en cuenta el tamaño del Hidrocarburo para los diferentes ecosistemas, los estudios demuestran su efectividad en compuestos de hidrocarburos de elevado y bajo peso molecular para los HAP, mediante un manejo adecuado de factores operacionales y el uso de consorcios microbianos capaces de biodegradar estos contaminantes entre bacterias y hongos. De acuerdo con la información recopilada y analizada mediante el estudio bibliométrico en un corpus de 412 registros de artículos científicos y de 244 registros para patentes, se muestra una tendencia de alto interés y crecimiento en los últimos años para la técnica de biorremediación sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) preferiblemente en países como China, Estados Unidos y Brasil.

En cuanto a los mecanismos para las degradaciones de estos contaminantes, según los autores se describen procesos biológicos, térmicos y fisicoquímicos, mostrando la importancia en términos de ventajas y desventajas que tiene la biorremediación y las tecnologías establecidas para la remoción de estos hidrocarburos en suelos contaminados. Lo cual muestra que la biorremediación es una técnica de bajo costo, amigable con el medio ambiente y promisoría hacia una mirada sostenible de las futuras soluciones a los problemas que se generan por contaminación en el suelo por manejo del crudo y su explotación en la industria petroquímica. La elaboración de esta investigación se constituirá en una herramienta bibliográfica útil, aportando conocimiento de las técnicas para la degradación de los HAP, dando a conocer el impacto ambiental que generan estos hidrocarburos como contaminantes para el recurso suelo.

Palabras clave: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP); Petróleo; Biodegradación; Biorremediación; Tecnologías de remoción térmicas y fisicoquímicas; Suelo; microorganismos; Vigilancia tecnológica.

Abstract

Bioremediation is defined as a process that includes the use of living organisms, such as microorganisms, to transform, contain or attenuate dangerous environmental pollutants such as hydrocarbons exposed to oil spills and derivatives, which affect soils, ecosystems and the biota that inhabits them. The processes of bioremediation prove to be effective in the removal of these pollutants for different periods of time and taking into account the size of the hydrocarbon for different ecosystems, the studies demonstrate their effectiveness in compounds of hydrocarbons of high and low molecular weight for PAH, through an adequate management of operational factors and the use of microbial consortiums capable of biodegrading these contaminants between bacteria and fungi. According to the information collected and analyzed through the bibliometric study in a corpus of 412 records of scientific articles and 244 records for patents, a trend of high interest and growth in the last years for the bioremediation technique on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons is shown (HAP) preferably in countries such as China, the United States and Brazil.

Regarding the mechanisms for the degradation of these pollutants, according to the authors, biological, thermal and physicochemical processes are described, showing the importance in terms of advantages and disadvantages of bioremediation and the technologies established for the removal of these hydrocarbons in contaminated soils. . This shows that bioremediation is a low-cost technique, friendly to the environment and promising towards a sustainable view of future solutions to the problems generated by contamination in the soil by handling crude oil and its exploitation in the petrochemical industry. The preparation of this research will be a useful bibliographic tool, providing knowledge of the techniques for the degradation of PAH, making known the environmental impact generated by these hydrocarbons as contaminants for the soil resource.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH); Petroleum; Biodegradation; Bioremediation; Thermal and physicochemical removal technologies; Floor; microorganisms; Technological surveillance.

Contenido

Abstract.....	6
Contenido.....	7
Lista de figuras.....	9
Introducción.....	12
Justificación.....	14
Capítulo 1 Definición del problema.....	16
Capítulo 2 Objetivos.....	19
2.1 Objetivo general.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
Capítulo 3 Marco teórico.....	20
3.1 Marco de referencia.....	20
3.1.1 Consecuencias ambientales de la contaminación por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en el suelo.....	20
3.2 Tecnologías de remediación para suelos contaminados con HAP.....	21
3.2.1 Clasificación de las tecnologías establecidas de remediación para la descontaminación de suelos con HAP.....	22
3.3 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, contaminantes tratados por biorremediación.....	28
3.5 Fundamento bioquímico de la biodegradación.....	33
3.5.1 Principios bioquímicos del metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP.....	33
3.6 Antecedentes en Biorremediación con microorganismos sobre HAP.....	34
3.6.1 Catabolismo de los HAP por bacterias.....	34
3.6.2 Catabolismo de los HAP por hongos.....	37
3.7 Vigilancia Tecnológica.....	40

Capítulo 4 Diseño Metodológico.....	41
4.1 Vigilancia tecnológica.....	41
4.2 Análisis de información.....	43
4.3 Análisis de las tecnologías de remediación de suelos contaminados con HAP.	44
Capítulo 5 Resultados y Discusion	45
5.1 Vigilancia Tecnológica	45
5.1.1 Indicadores cuantitativos	45
5.2 Avances en biorremediación.....	60
5.2.1 Factores que determinan la eficacia de la biorremediación.....	68
5.3 Avances en las tecnologías de remediación de HAP en suelos contaminados.....	71
5.3.1 Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación en HAP de acuerdo con el tipo de tratamiento.....	71
5.3.2 Remoción de concentraciones de HAP en suelos contaminados según el tipo de tratamiento	75
Capítulo 6 Conclusiones.....	83
Bibliografía	86

Lista de figuras

Figura 3-1: Modelo del destino de los HAP en el suelo a través del tiempo. Tomado de (Kuppusamy, S., et al, 2017)	21
Figura 3-2: Costos aproximados para la remoción de hidrocarburos en suelos contaminados. Tomado y adaptado de (Rodríguez-Vázquez, R et al., 2011, Patente 291975) 26	26
Figura 3-3: Cotos en función al tipo de remediación. Los valores presentados son el promedio de un total de 230 proyectos aplicados para una variedad de contaminantes biodegradables como gasolinas, lubricantes y HAP (EPA, 2001).	27
Figura 3-4: Clasificación de HAP por la US-EPA, con función importante en industria minera y la toxicología ambiental. Tomado y adaptado de (Potin et al., 2004)	28
Figura 3-5: Fuentes de emisiones globales de HAP. Tomado y adaptado de (Kuppusamy, S., et al, 2017)	29
Figura 3-6: 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).	38
Figura 4-1: Metodología general de la investigación (Fuente: propia).....	41
Figura 4-2: Proceso metodológico de la vigilancia tecnológica Tomado de (Sanchez y Palop, 2002) 42	42
Figura 5-1: Dinámica de publicaciones por año en el periodo 2000-2016 (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017.	46
Figura 5-2: Dinámica de publicaciones por países (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017 ...	47
Figura 5-3: Dinámica de publicaciones por países latinoamericanos (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017 48	48
Figura 5-4: Dinámica de publicaciones por instituciones (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017 ...	49

Figura 5-5: Dinámica de publicaciones por instituciones latinoamericanas (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017	50
Figura 5-6: Matriz de colaboración entre países (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017 ...	51
Figura 5-7: Dinámica de artículos con mayor citación (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017 ...	52
Figura 5-8: Dinámica de patentes por años (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Derwent Innovations Index</i> , procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 08/05/2017 ...	53
Figura 5-9: Dinámica de patentes por países (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Derwent Innovations Index</i> , procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 08/05/2017 ...	54
Figura 5-10: Dinámica de patentes por Instituciones (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Derwent Innovations Index</i> , procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 08/05/2017 ...	54
Figura 5-11: Dinámica de productos patentados en las invenciones (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Derwent Innovations Index</i> , procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 08/05/2017	56
Figura 5-12: Dinámica de microorganismos principales para las patentes (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Derwent Innovations Index</i> , procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 08/05/2017	57
Figura 5-13: Dinámica de los principales tipos de microorganismos (hongos y bacterias) utilizados en las investigaciones de consulta (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de <i>Scopus</i> (Elsevier, 2016), procesados con <i>VantagePoint</i> (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/17	60
Figura 5-14: 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).	62
Figura 5-15: Valores del crecimiento exponencial (log C) en función del número de anillos en HAP de 3, 4, 5 y 6 anillos, durante la biodegradación en los experimentos de laboratorio y de campo. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012).....	63
Figura 5-16: 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).	64
Figura 5-17: Concentraciones de HAP durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico. Tomado y adaptado al español de (Winqvist, E et al., 2014).	67

Figura 5-18: Procesos que implican las degradaciones de los hidrocarburos en el medio (Fuente: Propia).....	69
Figura 5-19: Factores que afectan a la remediación de campo a gran escala de los suelos contaminados HAP. Tomado y adaptado al español de (Kuppusamy, S., et al, 2017)	70

Introducción

El problema de la contaminación está ligado a factores económicos, sociales y políticos; que han conducido a un deterioro de los recursos naturales por el propósito de acumular capital, la satisfacción de necesidades de una población, de un país que crece aceleradamente y aumenta los problemas de contaminación, llevando a la necesidad de explotar los recursos, las reservas naturales de manera insostenible, como es el caso del uso de combustibles fósiles a través del petróleo y su explotación a través de la industria petroquímica (González P, M, 2009).

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 del medio ambiente y sus 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.

Para su aplicación en contaminantes derivados del petróleo como los hidrocarburos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular se presentan los 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, pero 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 aprovechamiento (Benavides, J et al., 2006). En Colombia se cuenta con campos de explotación petroquímica como lo son los oleoductos de Colombia (ODC), oleoducto central (Ocensa) y Caño Limón-Coveñas, los cuales abastecen a la terminal petrolífera de Coveñas. El oleoducto Caño Limón es un campo de explotación de gran magnitud con 780km de longitud, proveniente desde en el municipio de Arauquita, y la ciudad de Arauca del departamento de Arauca. Este ha sido altamente afectado durante los últimos años según los reportes y las investigaciones, dicho oleoducto ha sufrido más de novecientos atentados terroristas, provocando derrames de más de 450 millones de litros de petróleo. Actualmente esta problemática sigue siendo afectada por los grupos al margen de la ley, los cuales generan un impacto ambiental

altamente negativo a los ecosistemas por los derrames de crudo, dejando aproximadamente más de 2.600 kilómetros entre ríos y quebradas, y alrededor de 1.600 hectáreas de ciénagas afectadas. Dadas estas circunstancias los daños a los recursos naturales como fuentes hídricas, suelos, aire, biodiversidad son prácticamente irremediables, pues los procesos de descontaminación no alcanzan a cubrir todas las áreas afectadas y se realizan mucho tiempo después de que el crudo ha penetrado el ecosistema (Retrepo, 2002).

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 investigación reúne a criterio del autor los principales aspectos de las técnicas de biorremediación y su potencial en el tratamiento de hidrocarburos como desechos industriales contaminantes. Permitiendo un análisis bibliométrico de la tendencia a nivel mundial en el interés de la investigación para el desarrollo de esta técnica. Y el análisis de las ventajas y desventajas de los procesos biológicos, químicos y físicos para la degradación de los HAP en términos de una visión hacia lo sostenible de estas técnicas de descontaminación implementadas para estos Hidrocarburos.

Justificación

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. Deterioran los suelos y recursos naturales, actuando como xenobióticos en el medio ambiente.

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. 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). Según las investigaciones los HAP son microcontaminantes peligrosos ubicuos y altamente resistentes a la degradación y comúnmente se encuentran en sitios asociados a las industrias del petróleo, de producción de gas, de procesamiento de madera, produciéndose por variadas fuentes emisoras en escalas industriales y no industriales lo que los hace muy disponibles y de mayor riesgo para el contacto con las comunidades aledañas y trabajadores del sector industrial y no industrial. Existen gran cantidad de combinaciones diferentes de HAP, pero sólo alrededor de 16 y 28 compuestos fueron etiquetados peligrosos por la EPA en 2008 (Gan et al., 2009).

Las dos clases principales de HAP son los de bajo peso molecular (LMW) y los de alto peso molecular (HMW-HAP), tales como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno de LMW-HAP se demuestra que tienen significativamente menos toxicidad en comparación con los de HMW-HAP que se componen de 4-7 anillos (de criseno a coronenes) y tienden a ser recalcitrantes y tóxicos para los humanos (Duan et al., 2013; Kuppusamy et al., 2016b).

Entre las técnicas empleadas para la remediación de suelos contaminados con HAP se tienen procesos físicos, químicos, térmicos y biológicos; sin embargo, el uso de tecnologías biológicas está cobrando un gran interés. Dentro de estas los procesos de biorremediación, los cuales con ayuda de los microorganismos biodegradan compuestos simples y complejos a sustancias asimilables en el ambiente (Solanas A, M, 2009). Por lo cual es una tecnología de tratamiento reconocida como una estrategia ambientalmente benigna que proporciona ventajas de alto interés sobre otras tecnologías, una de estas es que el suelo rehabilitado generalmente puede retener muchas de sus propiedades claves lo que permite su conservación y reutilización (Fester et al., 2014).

Sin embargo, es importante generar una visión actualizada sobre el tema, que permita analizar de una manera el positivo impacto ambiental hacia lo sostenible que puede ser la tecnología y algunos de los mecanismos de mejor eficacia en la actualidad para la disminución de estos contaminantes contribuyendo a un mayor control en las fuentes generadoras de contaminación a nivel mundial.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente es necesario resaltar los avances en las tecnologías de remediación del suelo, desde una perspectiva nacional e internacional que conlleven a atenuar y recuperar ecosistemas que se encuentran sometidos a condiciones de contaminación por la explotación del crudo y sus derivados. Por lo cual los análisis bibliométricos son un enfoque para controlar las capacidades de investigación y el paisaje del conocimiento en cualquier país. Es importante llevar a cabo estudios bibliométricos los cuales son utilizados en el campo de la ciencia y la política de la tecnología para determinar las salidas de conocimiento de los sistemas nacionales de innovación (Glänzel y Zhou 2011). En estos análisis, los campos bibliográficos incrustados en publicaciones se utilizan para obtener medidas acerca de los esfuerzos de investigación del campo de la biotecnología, en este caso de los procesos de biorremediación sobre los HAP y ofrecer de esta manera una vista sobre su estructura intelectual.

El empleo de estas herramientas ayuda a mejorar la comprensión sobre el desarrollo del conocimiento científico, motivando el desarrollo de campos específicos a nivel científico para esclarecer las características particulares de un país en el desarrollo de la biotecnología (Junquera y Mitre 2007). El propósito de este estudio conlleva a evaluar por métodos bibliométricos, el paisaje del conocimiento y la capacidad de investigación en el campo de la biorremediación sobre los HAP a nivel mundial, con el fin de concluir sobre el éxito de las tecnologías de remediación que permita mejorar o formular políticas y procedimientos eficientes en el empleo de la biotecnología para métodos de descontaminación en el suelo que se puedan implementar en Colombia. Esta información es crucial para apoyar, comprender, mejorar y diseñar estrategias para lograr los objetivos previstos y se puede utilizar como un bucle de retroalimentación con el fin de aprender y evaluar un plan de trabajo con el uso de las acciones de control, según sea necesario en la implementación de tecnologías de remediación del suelo.

Capítulo 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 en términos de sostenibilidad por las problemáticas que ocasionan estos contaminantes. 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 garantizando mayor sostenibilidad frente a otros procesos.

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).

En Colombia, el transporte de crudo y sus derivados se ha visto afectado de forma considerable actualmente y durante los últimos 20 años, dicha actividad como se menciona anteriormente es ocasionada por grupos terroristas contra los oleoductos e instalaciones petroleras. El impacto ambiental, social y económico por la contaminación de hidrocarburos reflejado por miles de barriles derramados en los ecosistemas se enfatiza sobre las aguas de ciénagas, pantanos, ríos, quebradas y suelos en su mayoría con vocación agrícola, pecuaria y pesquera que afecta la comunidad y calidad de vida de diferentes regiones de nuestro país. Según los reportes por ECOPETROL S.A las afectaciones ambientales y las áreas perjudicadas por los derrames de petróleo se ubican principalmente en la zona alta de la llanura Araucana, en la región de la cuenca del río Catatumbo, en la llanura del valle medio y medio bajo del río Magdalena; Departamentos de Santander, Cesar, Sucre, principalmente y en los departamentos del Putumayo y Nariño. Aunque los ataques han disminuido, los impactos ambientales permanecen en los diferentes ecosistemas afectados y se ven representados en las consecuencias ambientales (Retrepo, 2002).

Al revisar la historia de los atentados en el País, se establece como primer ataque contra la infraestructura petrolera lo ocurrido en el año 1965 cuando la guerrilla atentó contra un oleoducto de la compañía Cities Services Intercol, cerca de Barrancabermeja (FUNDACION IDEAS PARA LA PAZ, 2013). De acuerdo a los reportes entregados por el Ministerio de Defensa Nacional desde el año 2000 se han presentado más de 2500 atentados contra la red de oleoductos del país teniendo variaciones considerables en algunos años debido a los escenarios desarrollados en el país (ECOPETROL, 2015).

Según el presidente de ECOPETROL Juan Carlos Echeverry, para el 2017, de acuerdo con la compañía petrolera, se han presentado 38 ataques al sistema de transporte de petróleo en Arauca, Boyacá, Cesar y Norte de Santander; y se han identificado y retirado 27 válvulas ilícitas instaladas para el hurto de crudo en ese último departamento. En el acumulado del año, los atentados y la instalación de conexiones ilícitas a lo largo del oleoducto han dejado una afectación ambiental de 13.300 metros cuadrados. A nivel ambiental, este año se ha registrado el derrame de 11.064 barriles de crudo y durante el año pasado, esta situación ocasionó emergencias con afectación de un área de 81.787 metros cuadrados, más de 9 kilómetros de afluentes entre ríos y caños y la afectación de la bocatoma del municipio de Arauquita (EL TIEMPO, 25 de julio de 2017).

La industria del sector de los hidrocarburos deberá ser capaz de crear estrategias para discutir y formular proyectos enmarcadas en el desarrollo de tecnologías, mejorando la participación del recurso humano y desarrollo regional. 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.

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 promisoriosa y sostenible 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).

Colombia tiene una ventaja comparativa para innovar y comercializar productos y servicios biotecnológicos, por medio de la Biotecnología se permite la “aplicación de la ciencia y la tecnología para los organismos, así como partes, productos y modelos que viven de los mismos, para alterar materiales vivos o no vivos para la producción, conocimiento, bienes y servicios” (OECD, 2011). Las herramientas bibliométricas se utilizan para analizar, mejorar y evaluar los aspectos particulares, tales como las políticas de investigación a diferentes niveles e incluso para apoyar las teorías de formulación de políticas (Junquera y Mitre 2007). Estudios anteriores han llevado a cabo análisis bibliométricos en biotecnología para evaluar la base de conocimientos y la capacidad de investigación de un país o entre países (Bajwa y Yaldram, 2013). En diversos contextos de investigación y biotecnología se aplican métodos bibliométricos para obtener por ejemplo información sobre la colaboración científica (Gómez-Costa et al. 2013), O para analizar los eventos académicos (Jeong y Kim, 2010). Aunque el gobierno de Colombia ha establecido una política nacional de biotecnología desde 2011, existe poca evidencia disponible acerca de los esfuerzos en la investigación, la estructura intelectual y el paisaje del conocimiento en el país en esta área de investigación.

Por lo cual se debe generar una visión actualizada sobre el impacto ambiental y sostenible 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 nacional.

Para lo cual se propone la siguiente pregunta de investigación que permita demostrar ***¿Cuáles son los avances alcanzados en los procesos de bioremediación microbiana en suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del petróleo frente a otras alternativas de remediación?***

Capítulo 2 Objetivos

2.1 Objetivo general

- Realizar una Interpretación conceptual del estado actual de la biorremediación realizada por microorganismos como alternativa de descontaminación sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos derivados del petróleo generados en los derrames de crudo.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis bibliométrico sobre los procesos de biorremediación con microorganismos sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos derivado del petróleo.
- Describir los resultados de avances en los procesos de Biorremediación mediante el análisis de los principales microorganismos involucrados, factores operacionales y como afectan la biodegradación en suelos contaminados con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos derivados del petróleo.
- Analizar las ventajas y desventajas en las tecnologías de degradación de los HAP por procesos biológicos, térmicos y físico-químicos, establecidos para la descontaminación de suelos contaminados por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Capítulo 3 Marco teórico

3.1 Marco de referencia

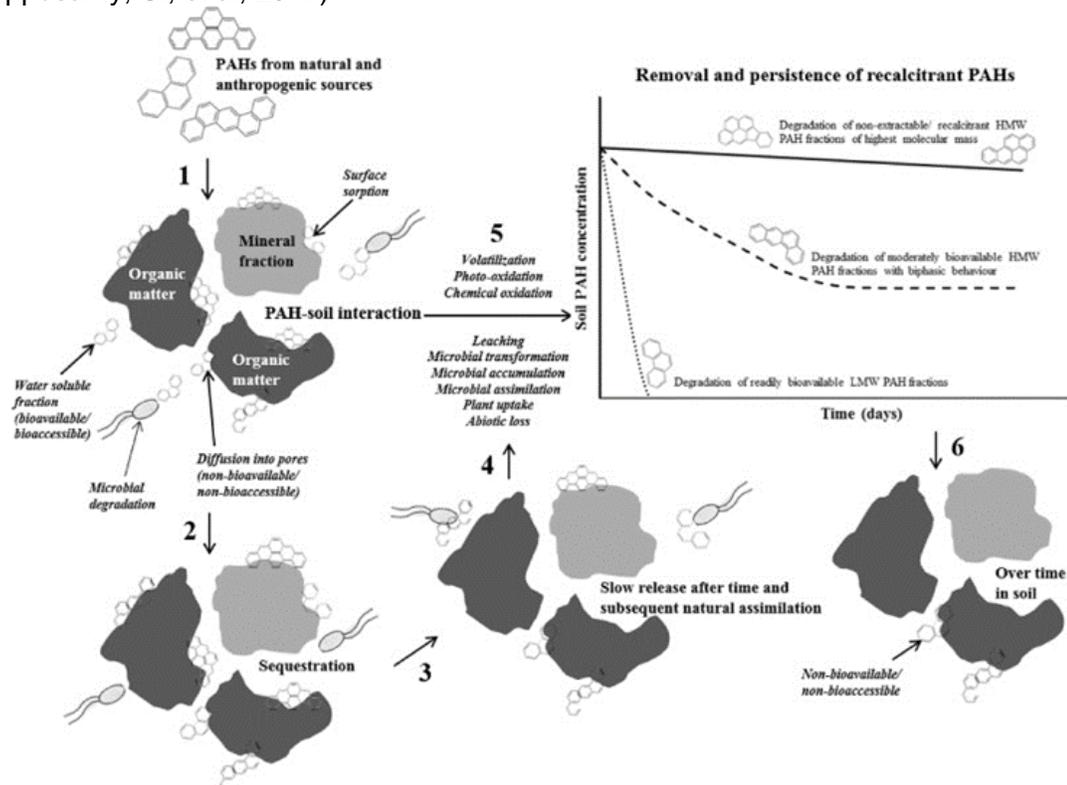
3.1.1 Consecuencias ambientales de la contaminación por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en el suelo

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA). Tanto los HAP como sus derivados presentan ecotoxicidad para diversos objetivos. Los efectos pueden ir desde la genómica subcelular o (genotoxicidad) hasta la fisiología y el comportamiento de células únicas o complejas (citotoxicidad) o en comunidades vivas complejas y redes alimenticias ecológicas (ecotoxicidad). Cada especie de HAP puede causar toxicidad a diferentes niveles, dependiendo de su estructura, propiedades y destino ambiental (Tejeda-Agredano et al., 2014).

La afectación en el suelo por estos contaminantes implica a que los hidrocarburos afecten el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad. Estudios han determinado el efecto de la contaminación con hidrocarburos en la germinación y crecimiento vegetativo de diferentes especies vegetales sometidas a diferentes concentraciones de hidrocarburos, concluyendo que hay una inhibición en la germinación y un marcado retraso en el crecimiento de todas las plantas evaluadas.

Así mismo, otros estudios evaluaron el efecto de los HAP en ecosistemas forestales y plantas madereras, demostrando un efecto de necrosis foliar, reportando que aproximadamente 3200 hectáreas son afectadas por los derrames y el 90% de estos son pantanos o zonas inundables aledañas a plantas con tuberías corroídas por tener más de 50 años de antigüedad, al igual que se emplean pozos sin crudo para almacenamiento de los cuáles un 30% están contaminados con desechos aceitosos (Schmidt, 2000).

Figura 3-1: Modelo del destino de los HAP en el suelo a través del tiempo. Tomado de (Kuppusamy, S., et al, 2017)



La figura 3-1 muestra el destino de los HAP en el suelo a través del tiempo, según las investigaciones la contaminación en los recursos naturales provocada por estos hidrocarburos está ocasionando en términos ambientales el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente y sus recursos naturales, así como la afectación de la biodiversidad por pérdida de gran cantidad de especies de flora y fauna, generando también una amenaza real a la salud pública.

3.2 Tecnologías de remediación para suelos contaminados con HAP

Las tecnologías de remediación implican cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que alteran la composición de una sustancia peligrosa contaminante a través de acciones químicas, físicas y biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2001).

Las tecnologías de remediación representan una alternativa a la disposición en tierra de los desechos peligrosos que no han sido tratados, y sus capacidades y posibilidades del éxito, bajo las condiciones específicas de un sitio, pueden variar con el tiempo, dependiendo así de los factores específicos del sitio, de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes, su disponibilidad y el costo de su descontaminación.

Los tratamientos de descontaminación se clasifican basados en la tecnología de remediación y se dividen en tres tipos:

- *Tratamientos biológicos:* utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos como microorganismos y plantas para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos con el medio ambiente. Dentro de las cuales se encuentran las técnicas de Biorremediación (Trejo, 2002).
- *Tratamientos fisicoquímicos:* utilizan las propiedades físicas o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación. Este tipo de tecnologías generalmente son efectivas en cuanto a costos y pueden concluirse en periodos cortos, en comparación con las tecnologías de biorremediación. Sin embargo, los costos pueden incrementarse cuando se utilizan técnicas de separación en las que los contaminantes pueden requerir de tratamiento o disposición (Van Deuren et al, 1997). Mientras que las tecnologías de biorremediación son principalmente métodos destructivos, las fisicoquímicas incluyen las tres estrategias básicas de acción sobre el contaminante (destrucción, separación e inmovilización). Al igual que el resto de las tecnologías de remediación, las fisicoquímicas pueden realizarse *in situ* o *ex situ*. Sin embargo, la mayoría de estas tecnologías se aplican *in situ* (Trejo, 2002).
- *Tratamientos térmicos:* utilizan calor para incrementar la volatilización, separación, quema, descomposición, fundición o inmovilización de los contaminantes del suelo. Según las investigaciones los tratamientos térmicos ofrecen tiempos muy cortos de limpieza, pero son generalmente costosos. Sin embargo, estas aplicaciones son menores en las aplicaciones *ex situ* que *in situ*. Los altos costos se deben al uso de energía y equipos, además de ser intensivos en mano de obra. Las tecnologías térmicas de separación producen vapor que requieren de tratamiento, las destructivas producen residuos sólidos y residuos líquidos que requieren también de posteriores tratamientos (Trejo, 2002).

3.2.1 Clasificación de las tecnologías establecidas de remediación para la descontaminación de suelos con HAP

- ***Tratamientos térmicos***
- Desorción térmica (DT)

Los procesos de DT consisten en calentar (90 a 540 °C) el suelo contaminado con contaminantes orgánicos, con el fin de vaporizarlos y por consiguiente separarlos del suelo. El calor acelera la liberación y el transporte de contaminantes a través del suelo, para posteriormente ser dirigidos hasta un sistema de tratamiento de gases con el uso de un gas acarreador o un sistema de vacío. Es un proceso de separación física no destructivo. Con base en la temperatura de operación, la DT puede clasificarse en dos grupos (EPA, 2001), Desorción Térmica de Alta Temperatura (DTAT) y Desorción Térmica de Baja Temperatura (DTBT). La limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos por DT varía entre 50 y 350 USD/m³. En términos generales, la DT con uso de vapor puede costar más de 400 USD/m³ (Baker et al., 2007).

- Incineración

En los procesos de incineración tanto *in situ* como *ex situ*, se utilizan altas temperaturas de operación que van desde los 870 a los 1,200 °C, con la finalidad de volatilizar y quemar compuestos orgánicos y halogenados en presencia de oxígeno. Generalmente se utilizan combustibles para iniciar el proceso de combustión. Las eficiencias de remoción y destrucción de los incineradores operados adecuadamente exceden el 99,99%. Sin embargo, los gases de combustión generalmente requieren de tratamiento. Existen diferentes tipos de incineradores (Van Deuren et al., 1997), como los de Combustión de Lecho Circulante (CLC), Lecho fluidizado y de tambor rotatorio. Es una tecnología de corto a largo plazo, los costos de incineradores fuera del sitio oscilan entre 200 y 1000 USD/ton; para tratar suelos contaminados con dioxinas y BPC los costos van desde los 1,500 a 6,000 USD/ton (Acharya and Ives, 1994).

- Pirólisis

La pirólisis es la descomposición química de materiales orgánicos inducida por calor en ausencia de oxígeno, el proceso normalmente se realiza a presión y temperaturas de operación mayores a 430°C. Se utiliza para tratar COS y pesticidas primordialmente. Pero puede aplicarse para tratar BPC, dioxinas, desechos de alquitrán y pinturas, suelos contaminados con creosota y con hidrocarburos. Ha mostrado buenos resultados en la remoción de BPC, dioxinas, HAP y otros compuestos orgánicos. Se requieren tamaños de partícula específicos y manipulación del material; altos contenidos de humedad (mayor a 1%) lo que aumentan los costos (Kreiner, 2002).

- **Tratamiento físico**

- La extracción con disolvente / lavado de suelos (SE/SW)

Es un tratamiento físico mediante técnica de limpieza viable para el tratamiento de suelos contaminados con HMW-HAP que no se eliminan tan eficazmente como se espera debido a su alta hidrofobicidad, baja biodisponibilidad y desorción lenta (Gong et al., 2010). SE/SW se basa en la desorción de HAP del sitio de unión en la matriz sólida a través de la acción del agua, disolventes orgánicos, tensoactivos que pueden ser aniónicos, un agente complejante como ciclodextrina (CD), agentes de lavado no tóxicos y biodegradables como aceites vegetales o ácidos húmicos, seguido de elución del sólido en el líquido de extracción (Gan et al., 2009; Mousset et al., 2014).

El lavado de suelos se ha utilizado con éxito para tratar suelos contaminados con hidrocarburos, HAP, PCP, pesticidas y metales pesados. Por medio de inundación, pueden recuperarse compuestos inorgánicos (metales), y tratarse COV, COS, gasolinas y pesticidas. El lavado son tecnologías de corto a mediano plazo. Los costos para el lavado el costo promedio es de 150 USD/m³ (Mousset et al., 2014).

- **Tratamiento químico**

- La oxidación química (CIUO)

Es una de las tecnologías de tratamiento *in situ* capaces de degradar tanto HAP de LMW y de HMW en suelos de campo, la CIUO degrada HAP, después de su reacción con un oxidante inyectado en el suelo (Lemaire et al., 2013). Los diferentes tipos de oxidantes se han investigado y van desde el ozono más comúnmente utilizado y reactivo de Fenton a los menos comunes, tales como permanganato de potasio (KMnO_4), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sodio (Na_2^+) o hierro (Fe_2^+) persulfato activado y peroxi-ácido (Cheng et al, 2016.; Kuppusamy et al, 2016b).

- **Tratamientos biológicos**

- Biorremediación

Entre las diversas técnicas empleadas para la remediación de suelos se tienen procesos fisicoquímicos, térmicos y biológicos; sin embargo, el uso de tecnologías biológicas ha cobrado un gran interés. 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 porque 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).

- *Tecnologías in situ*

Las técnicas *in situ* buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Este objetivo generalmente puede lograrse con el suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperatura y pH (EPA, 2001).

- Bioaumentación

Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microbiota autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores. Se ha usado para tratar suelos contaminados con herbicidas, insecticidas, y nitrofenoles como BPC, HTP y HAP (Alexander, 2004).

- *Tecnologías ex situ*

Los procesos de biorremediación *ex situ*, incluyen: procesos de biodegradación en fase de lodos, en donde el suelo se mezcla con agua (para formar un lodo), microorganismos y nutrientes; y de biodegradación en fase sólida, en donde los suelos colocan en una celda de tratamiento (composteo) o sobre membranas impermeables (biolabranza), en donde se agrega agua y nutrientes (EPA, 2001).

- Compostaje

El compostaje es un proceso biológico controlado, por el cual pueden tratarse suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables, para obtener subproductos inocuos estables. El material contaminado se mezcla con agentes de volumen (paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas), que son sustancias orgánicas sólidas biodegradables, adicionadas para mejorar el balance de nutrientes, así como para asegurar una mejor aireación y la generación del calor durante el proceso. Los sistemas de composteo incluyen tambores rotatorios, tanques circulares, recipientes abiertos y biopilas (Semple et al., 2001).

Las pilas estáticas (biopilas) son una forma de compostaje en el cual, además de agentes de volumen, el sistema se adiciona con agua y nutrientes, y se coloca en áreas de tratamiento (que incluyen alguna forma de aireación y sistemas para colectar lixiviados). Las pilas de suelo generalmente se cubren con plástico para controlar los lixiviados, la evaporación y la volatilización de contaminantes, además de favorecer su calentamiento (Semple et al., 2001).

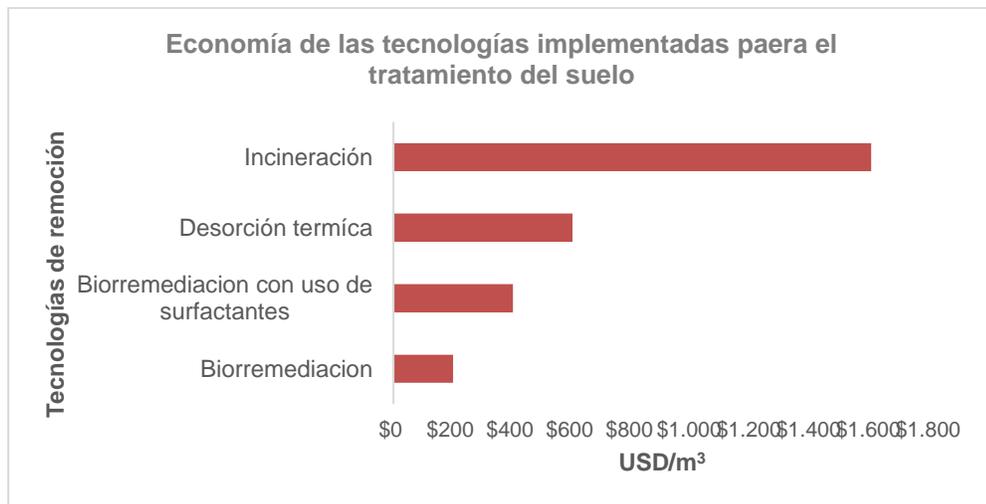
El compostaje se ha usado con éxito para remediar suelos contaminados con PCP, gasolinas, HTP, HAP. El costo del composteo está en función de: (i) la cantidad y fracción de suelo a tratar; (ii) disponibilidad de agentes de volumen; (iii) tipo de contaminantes y proceso; (v) necesidad de tratamientos previos y/o posteriores y (vi) necesidad de equipos para el control de COV. Es una tecnología que puede llevar desde algunas semanas hasta varios meses. Los costos típicos se encuentran entre 130 y 260 USD/m³ (Van Deuren et al., 1997).

Según Rodríguez-Vázquez, R et al., 2011, la selección de una tecnología de remediación para un suelo con características particulares, contaminado con uno o más contaminantes en particular, básicamente depende de los siguientes criterios:

- Características ambientales, geográficas, demográficas, hidrológicas y ecológicas del sitio.
- Tipo de contaminante (orgánico o inorgánico), concentración y características fisicoquímicas.
- Propiedades fisicoquímicas y tipo de suelo a tratar.
- Costo de las posibles tecnologías a aplicar.

En términos económicos según los estudios realizados por Rodríguez-Vázquez, R et al., 2011 con su patente 291975 del Centro de Investigación y Estudios Avanzados de la Unidad Irapuato (CINVESTAV-IPN) en México D.F. Se comprueba que los procesos por biorremediación requieren de mucho menos costos como tecnología implementada en los tratamientos de suelos contaminados como lo muestra la figura 3-2 a comparación de procesos térmicos como es el caso de técnicas como la incineración o desorción térmica.

Figura 3-2: Costos aproximados para la remoción de hidrocarburos en suelos contaminados. Tomado y adaptado de (Rodríguez-Vázquez, R et al., 2011, Patente 291975)



El Reglamento N° 850/2004 propuesto 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.

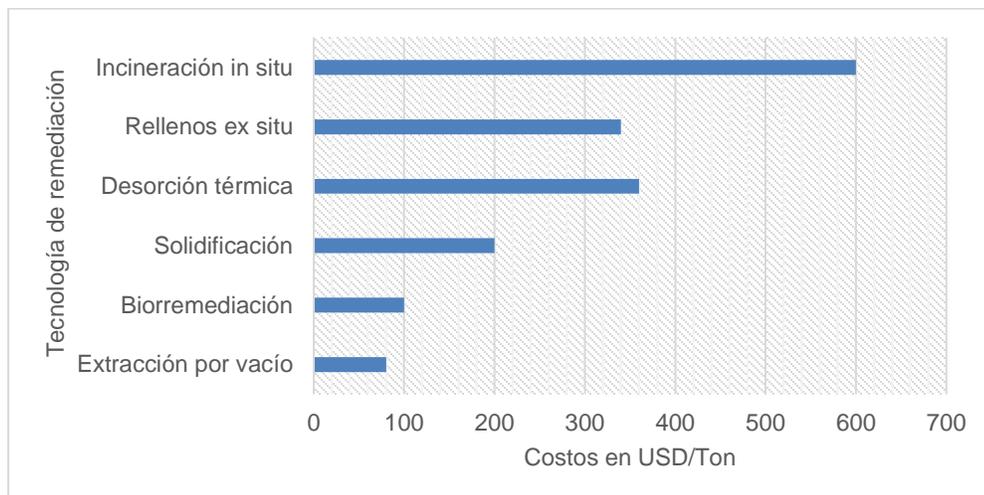
Según los estudios de Rodríguez-Vázquez, R et al., 2011, desde el punto de vista ambiental, la biorremediación es una de las mejores opciones que existen para el saneamiento de sitios contaminados con hidrocarburos (10% de contaminación), debido a la capacidad metabólica de los microorganismos involucrados, para utilizar los contaminantes como fuente adicional de carbono y energía. Lo más recomendado es utilizar la biota autóctona o nativa, cuya actividad se puede estimular mediante la adición de nutrientes, agua y aireación (bioestimulación) para la biorecuperación microbiana (Atlas and Bartha, 1992).

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, se ha utilizado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo, disolventes (benceno y tolueno), explosivos (TNT), clorofenoles (PCP), plaguicidas (2,4-D, DDT), conservadores de madera (creosota) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

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.

En cuanto a costos, como se ha mencionado, las tecnologías térmicas son las más costosas del mercado, mientras que dentro de las más económicas se encuentran las tecnologías de biorremediación aplicadas *in situ* (Figura 3-3).

Figura 3-3: Costos en función al tipo de remediación. Los valores presentados son el promedio de un total de 230 proyectos aplicados para una variedad de contaminantes biodegradables como gasolinas, lubricantes y HAP (EPA, 2001).

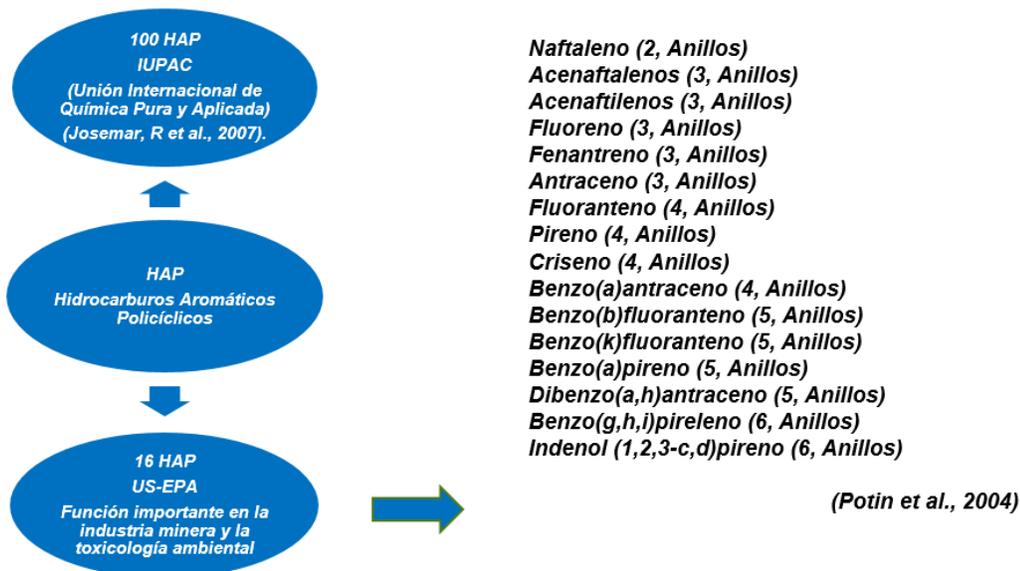


3.3 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, contaminantes tratados por biorremediación

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 cuantos más anillos tengan el compuesto, más resistente será a la actividad enzimática (Sungthong, R, 2014).

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, 16 HAP están clasificados por la US-EPA y se consideran con función importante en la industria minera y la toxicología ambiental (figura 3-4). Entre los cuales se encuentran: 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).

Figura 3-4: Clasificación de HAP por la US-EPA, con función importante en industria minera y la toxicología ambiental. Tomado y adaptado de (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 es encontrada 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). Los HAP existen en la naturaleza como resultado de eventos naturales y actividades antropogénicas. Las erupciones volcánicas y los incendios forestales son las principales fuentes naturales de HAP (Tabla 3-1). En gran escala pueden dispersarse a diversos ecosistemas por medio del viento o la lluvia (Vergnoux et al., 2011). Sin embargo, las principales emisiones de HAP se producen a través de actividades antrópicas, provenientes de la combustión incompleta o de materiales orgánicos, accidentes de transporte, refinerías de combustibles fósiles y producciones de alquitrán de hulla, Asfalto, conservantes de la madera y líquidos de fase no acuosa como petróleo ligero o crudo, creosota, alquitrán de hulla y materiales similares a hollín (figura 3-5) (Ortega-Calvo JJ et al., 2013).

Figura 3-5: Fuentes de emisiones globales de HAP. Tomado y adaptado de (Kuppusamy, S., et al, 2017)

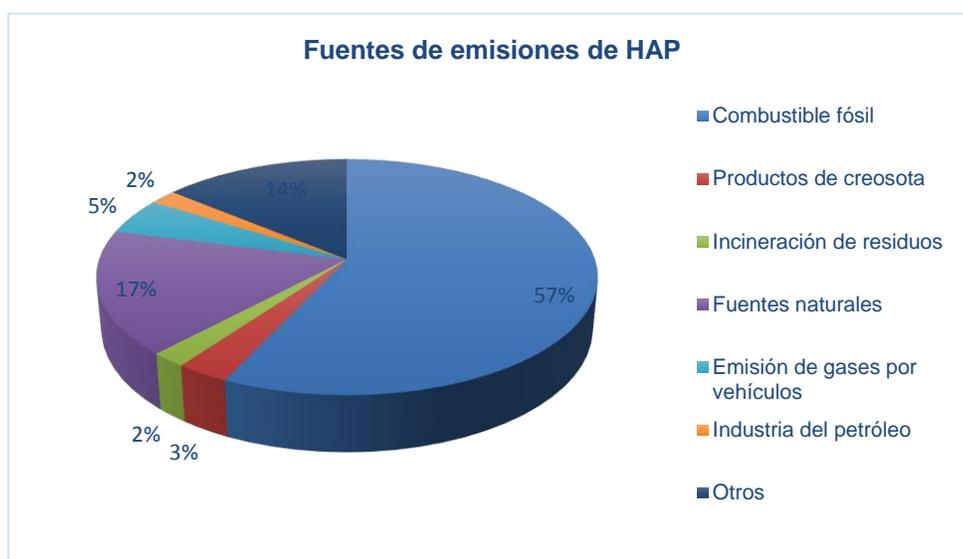


Tabla 3-1: Diagnóstico de la relación de HAP para la identificación y su fuente en la contaminación del suelo. Tomado y adaptado de (Kuppusamy, S., et al, 2017)

Relación de HAP	Rango de valores	Fuentes
Fenantreno/Antraceno	<10	Pirógeno
	> 15	Petrogénico
Fluoranteno/Pireno	2-8	emisiones de vehículos
	> 1	Pirógeno
Benzo[a]antraceno/Criseno	<1	Petrogénico
	<2	Pirógeno
Benzo[a]pireno/ Benzo [g, h, i]perileno	> 2	petrogénico
	> 0,6	emisión de tráfico
Benzo[b]fluoranteno/ Benzo[k]fluoranteno	2.5-3	emisión de fundición de aluminio
Antraceno/(Antraceno + Fenantreno)	> 0,1	Pirógeno
	<0,1	petrogénico
Fluoranteno/ (Fluoranteno + Pireno)	> 0,5	Pirógeno
	<0,4	petrogénico
	> 0,5	Grass, madera, la combustión de carbón
	0,4-0,5	Combustión de combustibles fósiles
	1-1,4	La combustión del carbón
	<0,4	La gasolina, motor diésel
	> 0,35	Pirógeno

Benzo[a]antraceno/ Criseno) (Benzo[a]antraceno +	<0,2	petrogénico
	> 0,35	La combustión o emisión vehicular
	0,2-0,35	La combustión del carbón
Indeno[1,2,3-cd]pireno/ (Indeno[1,2,3-cd]pireno + Benzo [g, h, i]perileno)	> 0,18	Pirógeno
	< 0,18	petrogénico
	0,2-0,5	la combustión de petróleo
Benzo[a]pireno/ (Benzo[a]pireno + Criseno)	> 0,5	Grass, madera, la combustión de carbón
	<0,3	Pirógeno
	<0,3	petrogénico
	0,07 a 0,24	La combustión del carbón
	0,3-0,7	Motor diésel
Σ LMW HAP / Σ HMW HAP	0,49	Gasolina
	<1	Pirógeno
	> 1	petrogénico

Σ - Total / Suma; LMW - de bajo peso molecular; HMW - alto peso molecular.

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 hidroxilación de los HAP los 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 dihydroxidos.
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.

3.4 Estrategias, importancia y métodos de la técnica 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 biodegradable 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). 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, biolodos, 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

Según los estudios realizados por Vázquez, R et al., en México, por ejemplo, del total de las empresas autorizadas para remediar suelos, más de la mitad emplea métodos biológicos (Volke y Velasco, 2002), siendo los más utilizados el cultivo sólido y la biolabranza. El lavado de suelos, la oxidación química y la separación física, son otras de las tecnologías de remediación más empleadas para la restauración de los sitios contaminados. Sin embargo, dado que cada sitio dañado constituye un problema específico, se requieren establecer criterios, así como recopilar información para controlar, mitigar y eliminar la contaminación en cada sitio. Por ejemplo, el cultivo sólido es una tecnología de biorremediación que ha mostrado ser eficiente para la remoción de hidrocarburos y otros contaminantes como los bifenilos policlorados y los plaguicidas organoclorados (Fernández-Sánchez et al, 2001; Acosta- Ramírez, 2009), aunque existen muy pocos estudios de ecología microbiana en estos suelos agrícolas de origen tropical, altamente contaminados.

Tabla 3-2: Ventajas y desventajas de los procesos de Biorremediación (Rodríguez Vázquez y col., 2011)

Ventajas de la biorremediación	Desventajas de la biorremediación
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los contaminantes son transformados y algunos llegan a la mineralización produciendo CO₂ y H₂O. ▪ Se utilizan microorganismos autóctonos y exógenos. ▪ Es una técnica segura y económica, con potencial de disminución en sus costos de aplicación ▪ Tecnología amigable y benéfica con el medio ambiente ▪ Requieren de un mínimo o ningún tratamiento posterior ▪ El suelo saneado no requiere un confinamiento posterior. ▪ Permite tratar el suelo sin necesidad de transportarlo y excavarlo 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los microorganismos pueden inhibirse por la presencia de altas concentraciones de contaminantes. ▪ No es factible para sitios con altas concentraciones de hidrocarburos halogenados, metales y desechos radioactivos. ▪ Requiere de largos períodos de tiempo, especialmente en la remoción de hidrocarburos policíclicos. ▪ Dificultad para verificar la eficacia del proceso ▪ Puede ser insegura en cuanto a uniformidad, heterogeneidad en las características del suelo. ▪ Es necesario identificar la toxicidad de intermediarios o productos

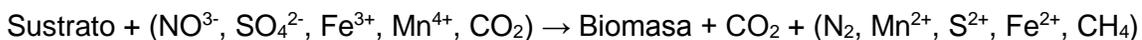
3.5 Fundamento bioquímico de la biodegradación

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) según las siguientes reacciones para la degradación aerobia y anaerobia de hidrocarburos. (Maroto and Rogel, 2007).

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:



3.5.1 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 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, ha 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[*a*]pireno y benzo[*a*]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).

Se ha comprobado que los hongos 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 peroxidases 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.

3.6 Antecedentes en Biorremediación con microorganismos sobre HAP

3.6.1 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). 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 un 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 tricarbónicos (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*-dihidroxiclación. 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 dihidroxiclación, 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 permite la activación del oxígeno molecular, que es un requisito previo para la dihidroxiclación 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. (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 género *Sphingomonas* 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 [a] 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 BaP 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.

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 dihidrodioles 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 sustrato para mantener la degradación del HAP. 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 BαP 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 BαP 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 dihidrodioles y productos de escisión del anillo a partir de benzo [α] pireno (Moody et al., 2004).

3.6.2 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 ligninolíticos (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 ligninolíticos, 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).

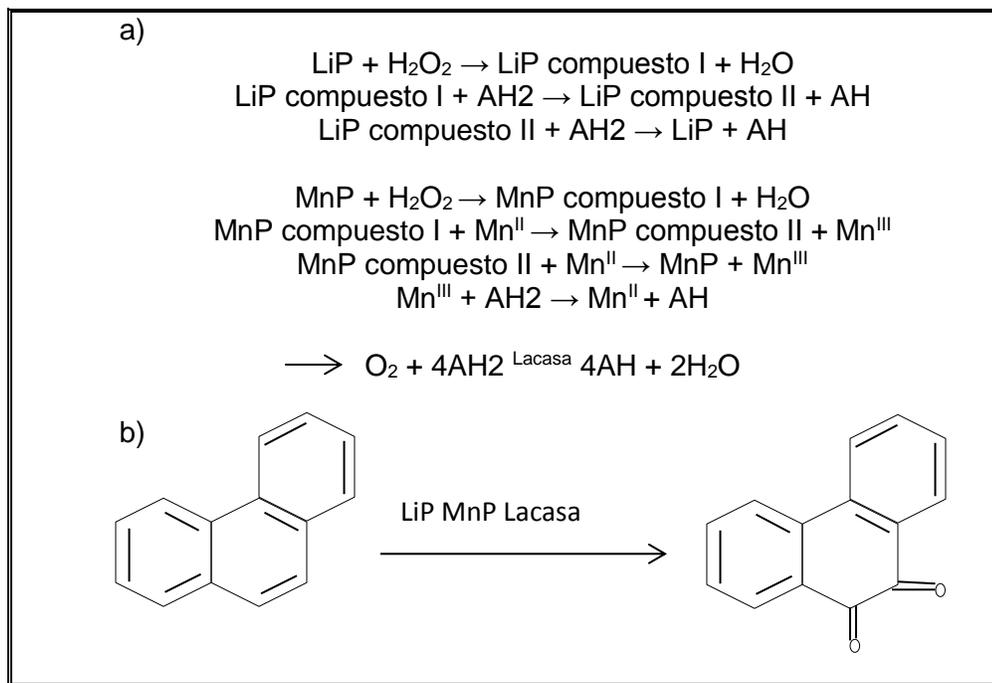
- Enzimas extracelulares del catabolismo de la lignina en hongos ligninolíticos.

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 (Winqvist, 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 (H₂O₂) como se muestra en la figura 3a (Pérez et al., 2002). Las enzimas peroxidadas 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 3-6a). 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 3-6b). 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 3-6: 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).



- 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.
- La oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por hongos ligninolíticos. Peroxidasa de lignina LiP, Manganeso peroxidasa MnP, 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 (Vázquez-Duhalt et al., 1994.). Estos mediadores facilitan con un alto potencial el proceso de la biodegradación.

- 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-dihidrodiols (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).

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 dihidrodiols (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.

3.7 Vigilancia Tecnológica

La vigilancia tecnológica, se define como un proceso sistemático en el que se capta, analiza y difunde información de diversa índole económica, tecnológica, política, social, cultural, legislativa, mediante métodos legales con el ánimo de identificar y anticipar oportunidades o riesgos, para mejorar la formulación y ejecución de la estrategia de las organizaciones. La Cienciometría es una herramienta de la vigilancia tecnológica que emplea técnicas matemáticas y análisis estadístico para determinar las características de la investigación científica, permite definir la situación de un área de conocimiento, una institución, un individuo e incluso un país mediante la actividad o productividad científica.

En la Tabla 3-3, se presenta el listado de indicadores cuantitativos que se emplean para definir las tendencias en la actividad científica e inventiva en un determinado sector del conocimiento.

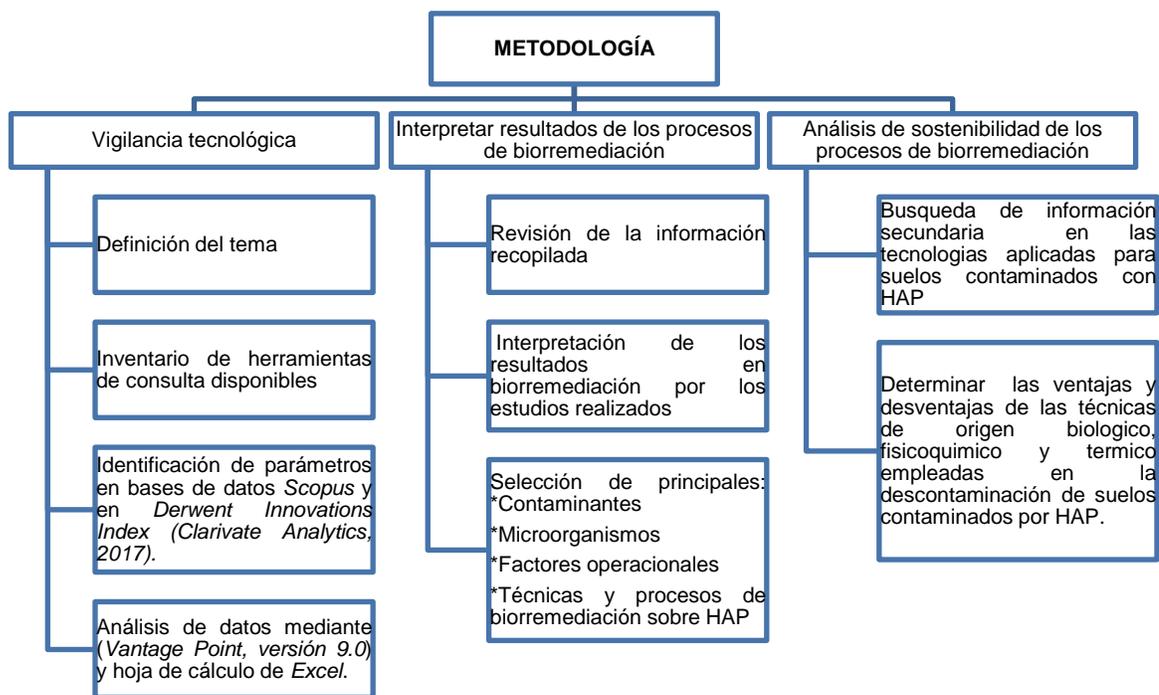
Tabla 3-3: Indicadores cuantitativos para artículos y patentes. Fuente: Unidad de Bibliometría – USTABUCA.

Vigilancia tecnológica: Indicadores cuantitativos		
Tipo de revisión	Actividad científica	Actividad inventiva
Tipo de documento	Artículos científicos	Patentes
Bases de datos	Bases de datos tipo referenciales y de texto	Bases de datos de Patentes
Estructurar la ecuación de búsqueda	Palabras clave, buscar en los <i>keywords</i> , título y <i>abstract</i> del artículo, período de consulta	Palabras clave, buscar en el título, <i>abstract</i> , <i>claims</i> del documento de patente
Número de documentos	Número de artículos	Número de patentes
Dinámica de publicaciones	Número de artículos por años	Número de patentes por años
Autores	Investigadores más importantes en el tema	Inventores más importantes
Afiliación por país	Países donde se encuentran trabajando los investigadores	Países donde se registra la invención
Afiliaciones por institución	Organizaciones de tipo académico, privadas, gubernamentales, públicas	Empresas aplicantes de las patentes (usuarios finales de las invenciones)
En qué tema	Área de conocimiento en la cual tiene su aplicación el trabajo de investigación.	Definida por el IPC (Clasificación Internacional de patentes).
Dónde se publica	Revistas científicas	Oficinas de patentes donde se registra la invención

Capítulo 4 Diseño Metodológico

A continuación, se presenta la metodología a emplear durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Figura 4-1: Metodología general de la investigación (Fuente: propia).

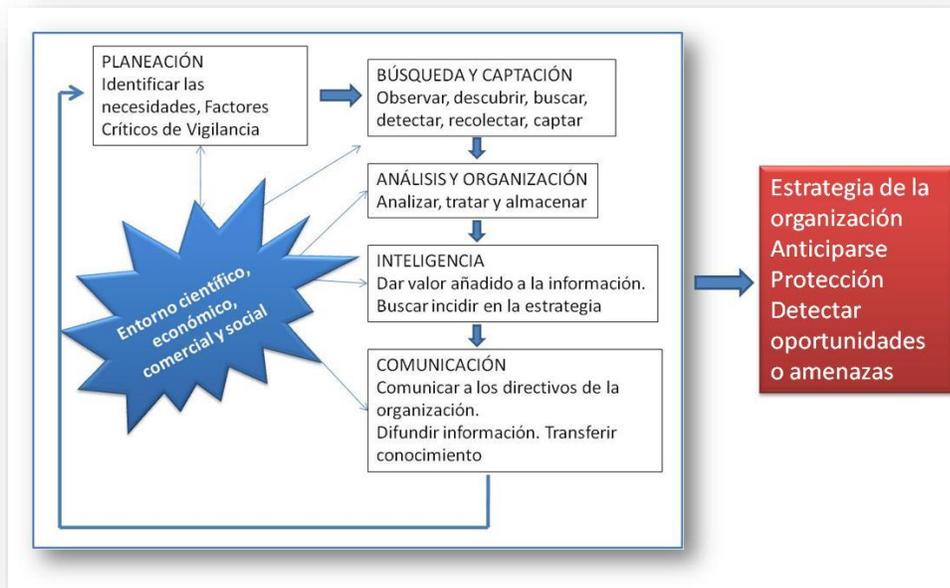


4.1 Vigilancia tecnológica

En la figura 4-1 se puede observar el proceso metodológico de la vigilancia tecnológica a desarrollar para este estudio de la Interpretación conceptual del estado actual de la biorremediación realizada por microorganismos sobre hidrocarburos aromáticos

policíclicos derivados del petróleo, la investigación abarca las etapas de planeación, búsqueda, captación, análisis y organización de la información con el fin de dar valor agregado a través de la inteligencia y, finalmente, la presentación de los resultados obtenidos, con la finalidad de identificar los principales avances en procesos de Biorremediación con microorganismos que reúnan las características adecuadas para ser aprovechados en procesos de la biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Figura 4-2: Proceso metodológico de la vigilancia tecnológica Tomado de (Sanchez y Palop, 2002)



Para la identificación de descriptores, definición de las ecuaciones de búsqueda, tipo de documentos a analizar (artículos científicos y patentes), se emplearon las bases de datos de Scopus (Elsevier, B.V. 2016) y Derwent Innovations Index (Clarivate Analytics, 2017), para realizar una revisión bibliográfica con el fin de establecer el interés de la actividad científica alrededor del tema de Biorremediación de microorganismos sobre HAP derivados del petróleo. Una vez identificados los términos o palabras clave, se estructuró las siguientes ecuaciones de búsqueda con los siguientes tesauros u ordenadores:

- Ecuación de búsqueda establecida: Artículos científicos

(TITLE-ABS-KEY (("Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*" OR "PAH" OR "PAHs") AND (petroleum OR "crude oil"))) AND (TITLE-ABS-KEY (metaboli* OR bacteri* OR microorganism* OR surfactant*)) AND ((TITLE-ABS-KEY (environment* W/2 biodegrada*)) OR (TITLE-ABS-KEY (bioremediat* OR biodegrad*)))) AND NOT (TITLE-ABS-KEY (phytoremediat*)) AND (LIMIT-TO (PUBYEAR , 2016) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2015) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2013) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2012) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2011) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2010) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2009) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2008) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2007) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2006) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2005) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2004) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2003) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2002) OR LIMIT-TO (

PUBYEAR , 2001) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2000)) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar"))

En la cual se evaluaron artículos científicos indexados en la base de datos referencial de Scopus, durante el período de tiempo 2000 – 2016.

- Ecuación de búsqueda establecida: Patentes

("Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*" AND (metaboli* OR bacteri* OR microorganism* OR surfactant* OR (environment* NEAR/2 biodegrada*) OR bioremediat* OR biodegrad*) NOT phytoremediat*)

En la cual se evaluaron Invenciones de los últimos 20 años (1996-2016) de la base de datos referencial de Derwent.

Los registros obtenidos se evaluaron empleando el *software* especializado para minería de texto (*Text mining*) de *Vantage Point*, (Licencia académica 9.0, *Search Technology*, Inc), disponible en la unidad de bibliometría de la Universidad Santo Tomás, Seccional Bucaramanga. Este programa permitió identificar dinámicas o tendencias como la evolución en el tiempo de las publicaciones, los autores principales, los países e instituciones, empresas que presentan mayor interés por este tema y las tecnologías y aplicaciones más importantes a las que se orientan los trabajos de investigación.

El desarrollo del objetivo contempló las siguientes actividades:

- Definición del tema.
- Inventario de herramientas de consulta disponibles.
- Identificación de descriptores, definición de las ecuaciones de búsqueda, tipo de documentos a analizar (artículos científicos).
- Análisis de datos mediante un programa de minería de textos (*Vantage Point*, versión 9.0) y hoja de cálculo de *Excel*.
- Elaboración del informe final.

4.2 Análisis de información

Abordaje de un estado del arte por medio de la biblioteca virtual con las bases de datos de la Universidad de Manizales. 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 2017. Estas obras fueron recopiladas a través de la búsqueda en las bases de datos de la Universidad como: SCOPUS, E-Libro, SCIENCE@DIRECT y servidores externos como: Google Scholar, a través de los siguientes términos de búsqueda: *bioremediation, bioremediation of PAHs, bioremediation by microorganisms, biodegradation of PAHs, biorremediación de suelos, biorremediación de HAP, soil AND remediation AND techniques AND for AND hydrocarbons*.

Se sistematizó y clasificó la información, según los siguientes parámetros:

1. Contaminantes orgánicos derivados del petróleo como los HAP.
2. Técnicas y procesos de biorremediación.
3. Descripción de avances en la técnica y los principales géneros de microorganismos entre bacterias y hongos que participan en el proceso.

4. Principales factores operacionales y variables que afectan el proceso de biorremediación.

4.3 Análisis de las tecnologías de remediación de suelos contaminados con HAP.

El análisis pretendió mostrar las ventajas y desventajas que ofrece la remediación de los suelos contaminados con HAP, mediante el uso de las tecnologías implementadas en su recuperación.

- Se evaluaron y se discutieron los siguientes criterios:

Ventajas y desventajas que muestran las tecnologías aplicadas para la remoción de los HAP en suelos contaminados.



Concentraciones de remoción de HAP por tecnologías de remediación establecidas (térmicas, físicas, químicas y biológicas, para la descontaminación de suelos.

Capítulo 5 Resultados y Discusion

5.1 Vigilancia Tecnológica

Con las palabras clave del corpus de búsqueda se estructuró la ecuación de análisis con la cual se realizó el ejercicio de vigilancia tecnológica (análisis cuantitativo) con el fin de identificar las tendencias de investigación en el estado actual de los procesos de Biorremediación con microorganismos como alternativa de descontaminación en suelos contaminados por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos derivados del petróleo generados en los derrames de crudo. En este caso se obtuvieron 412 registros correspondientes a artículos científicos indexados en la base de datos de *Scopus (Elsevier, 2016)*, durante el período 2000 – 2016. Se obtuvieron 244 registros correspondientes a las invenciones por patentes en la base de datos *Derwent innovations Index* durante el período 1996 – 2016.

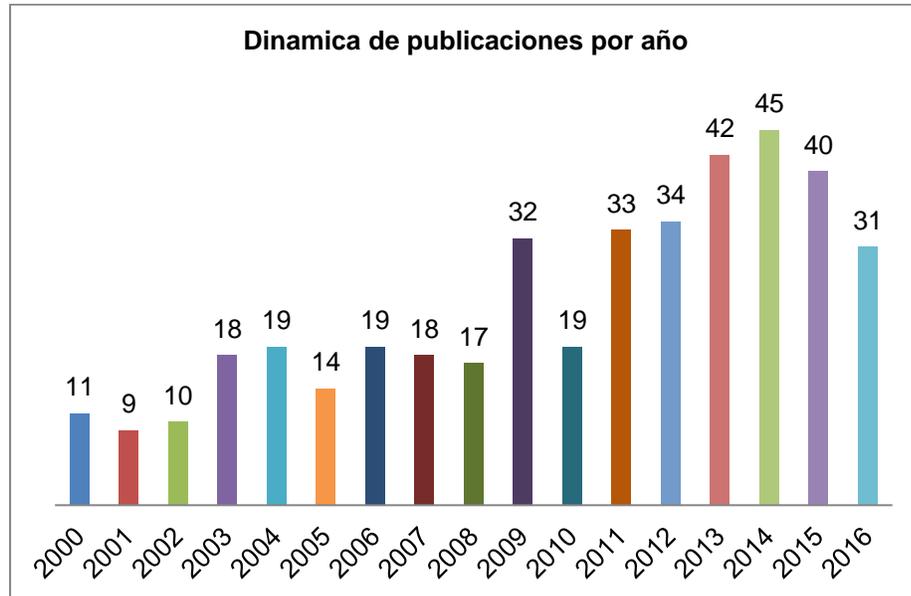
5.1.1 Indicadores cuantitativos

- Dinámica de publicaciones por año

La tendencia de interés en la investigación sobre la biorremediación por microorganismos sobre HAP derivados del petróleo, presentó un comportamiento creciente en cuanto al número de publicaciones en el período de observación 2000 – 2016.

En la figura 5-1 se muestra la mayor tendencia de artículos publicados en los años 2013, 2014 y 2015 para el interés del tema con un corpus de 412 publicaciones. La biorremediación por microorganismos sobre HAP derivados del petróleo, se ha convertido en un tema de interés en los últimos 4 años debido a la consideración de este como uno de los principales beneficios de la industria petrolera, en refinerías y en el sector de la minería como mecanismo de restauración en los recursos, por medio de la explotación, conservación y descontaminación de los suelos de manera más sostenible y mediante una opción ambientalmente más amigable.

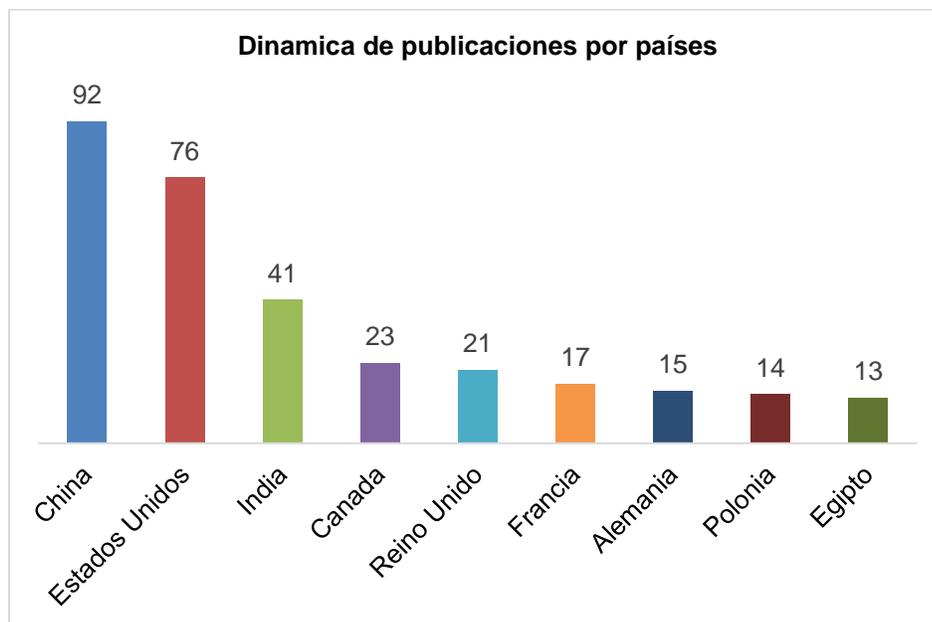
Figura 5-1: Dinámica de publicaciones por año en el periodo 2000-2016 (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Scopus* (Elsevier, 2016), procesados con *VantagePoint* (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017.



- Dinámica de publicaciones por países

La figura 5-2 muestra la tendencia mundial en investigación de artículos científicos publicados en revistas internacionales analizadas en la base de datos de *Scopus*, tomando como referencia los primeros 10 países mayoritarios de 65 países que mostraron el corpus de búsqueda. Las concentraciones geográficas de las publicaciones científicas son mayoritarias en países desarrollados, dentro de los que se destaca China con 92 publicaciones y Estados Unidos quien presenta 76; esta tendencia radica en el impulso de estos países por las tecnologías en descontaminación de suelos con HAP y la continua explotación de los hidrocarburos, siendo potencias de la actividad petroquímica. Además, en países como India se refleja el desarrollo académico a nivel de la educación científica para la implementación de esta tecnología.

Figura 5-2: Dinámica de publicaciones por países (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Scopus* (Elsevier, 2016), procesados con *VantagePoint* (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017



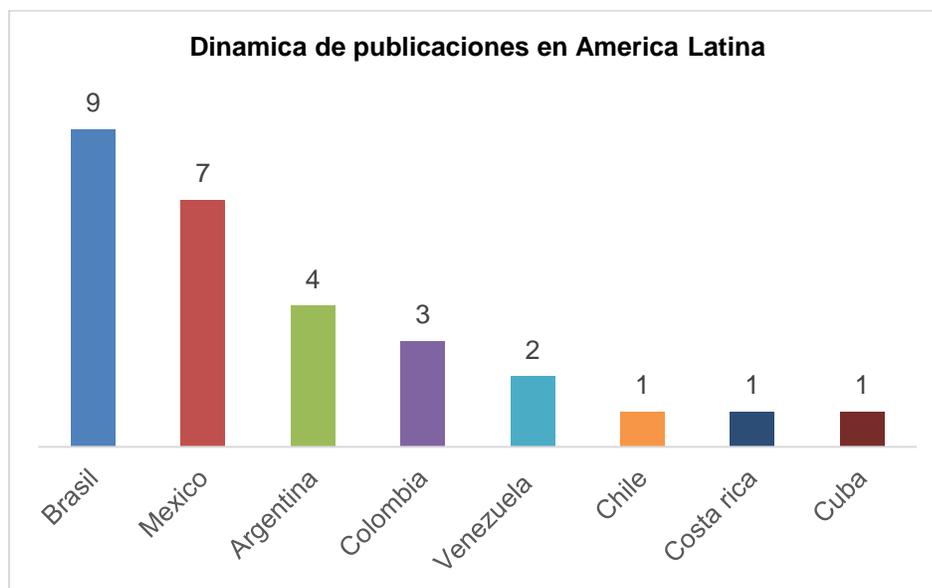
- Dinámica de publicación por países latinoamericanos

Esta panorámica del desarrollo en la técnica de biorremediación de HAP para el ámbito latinoamericano revela que está en una etapa incipiente y bastante distanciada de los países punteros en el ámbito mundial como se muestra en la figura 5-2, Países como China, Estados Unidos, India, Canadá, entre otros, lo cual están llevando ambiciosos programas de investigación y desarrollo en la temática.

En América Latina la participación en el desarrollo de esta técnica la tienen países como Brasil el cual se constituye como líder en programas de investigación y desarrollo de institutos y universidades, con mayor interés en el tema (Figura 5-3); se destaca la Universidad Federal de Rio de Janeiro (Departamento de Ingeniería Bioquímica).

México es el segundo país con mayor interés en el tema, representado con el Instituto Politécnico Nacional de México, seguido del Centro Nacional Patagónico de Argentina. En el caso de Colombia se reporta la Universidad de la Sabana, la Universidad de Córdoba y la Universidad de Santander. Cabe destacar que algunas publicaciones de estos países se han realizado con cooperación de universidades externas a Latinoamérica, tal es el caso de Colombia que ha trabajado en cooperación con España.

Figura 5-3: Dinámica de publicaciones por países latinoamericanos (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Scopus* (Elsevier, 2016), procesados con *VantagePoint* (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017)



- Dinámica de publicaciones por instituciones

En la figura 5-4 se resume el comparativo para el ámbito mundial, se tomaron las instituciones por país que presentan 5 o más registros, de ahí que China y España son los países que sobresalen con cerca de 9 y 8 publicaciones.

Dentro de los países con mayores publicaciones a nivel de instituciones, se encontró China en el cual se destacan:

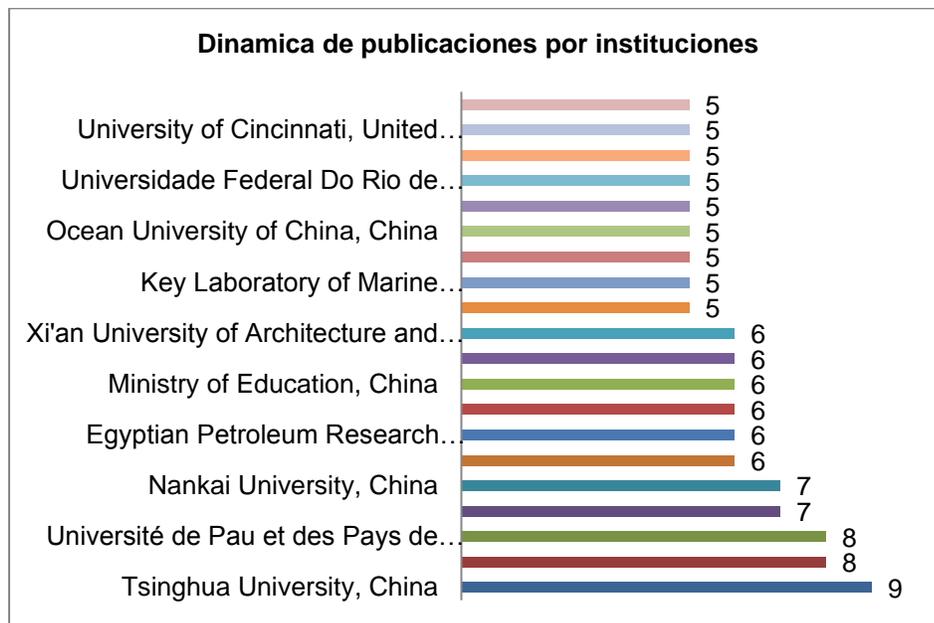
Universidad de Tsinghua o Universidad de Qinghua, mayor institución en número de publicaciones, la cual es una universidad que se encuentra en Pekín, China. Es considerada una de las mejores y más selectas universidades de China. La investigación científica y tecnológica y los proyectos en la Universidad de Tsinghua se apoyan principalmente en proyectos especiales y en la financiación de los programas nacionales de ciencia y tecnología. En conjunto, el financiamiento de estos programas totaliza más de 20 mil millones de yuanes, que financia más de 1400 proyectos cada año para la universidad. Con el posible aumento de la inversión estatal en ciencia y tecnología, la investigación en Tsinghua es recibir más apoyo financiero del estado.

Otras instituciones importantes en China con estudios en la temática son *Universidad China de Petróleo*, *Universidad de Nankai*, *Universidad China de Geociencias*, *Universidad de Liaoning Shihua*, *Universidad de Xi'an Jiaotong*, *Universidad de la Academia China de Ciencias*, *Universidad del Océano de China*, *Mar de China del Norte Centro de Monitoreo Ambiental de la Administración Oceánica Estatal* y *el Laboratorio Clave de Teoría y Tecnología de Química Marina*.

En España se encontraron universidades como *La Universidad de Barcelona* la cual es líder en el ámbito de la investigación universitaria del Estado español. Por volumen de publicaciones, la UB es la segunda institución estatal después del CSIC, según el *Third european report on science & technology indicators*. En un nivel superior al de los grupos de investigación, la UB se organiza en centros e institutos de investigación, y participa en centros de referencia y redes nacionales e internacionales. Así mismo acoge tres grandes fundaciones dedicadas a la investigación: el Parque Científico de Barcelona (PCB) sede del Instituto de Investigación Biomédica (IRB) y el Instituto de Nanobioingeniería de Cataluña (IBEC), el Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi Sunyer (IDIBAPS) y el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL).

En el ámbito mundial las instituciones con mayor importancia en términos de sus resultados e impacto de los procesos de investigación en la temática de biorremediación de HAP se encuentran también países como Francia, Estados Unidos, Nigeria, Noruega, Egipto y Brasil.

Figura 5-4: Dinámica de publicaciones por instituciones (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Scopus (Elsevier, 2016)*, procesados con *VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology)*. Fecha de consulta: 21/02/2017



- Dinámica de publicaciones por instituciones latinoamericanas

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado en Latinoamérica, un problema de contaminación de los suelos, sin embargo, son muchas las iniciativas privadas y de los gobiernos que están revertiendo este panorama, con la ayuda de la biorremediación. Colombia, Brasil, México, Argentina, y Venezuela, son países que tienen deterioro creciente de suelo por la extracción de petróleo, en el caso de los países compradores su problema es el transporte y el despacho, así el Istmo se prepara con leyes e iniciativas que reviertan los daños directos y colaterales. La Universidad Federal de Rio de Janeiro mostro el mayor número de publicaciones con un total de 5 publicaciones a la

fecha de consulta, dentro de las cuales también se encuentra la empresa Petrobras con 3 publicaciones (Figura 5-5). Brasil actualmente es el mayor productor de petróleo de Latinoamérica. Petrobras, considerada la cuarta mayor empresa de energía del mundo según la consultora estadounidense PFC Energy y actúa en 12 países de América Latina, entre ellos Chile, México, Perú, Colombia y Bolivia. Su alta demanda en la actividad petroquímica ha llevado a buscar posibles soluciones a la descontaminación de suelos, como uno de los problemas ambientales que se presentan en el país. En México dada la importante actividad petrolera, se cuenta con una cifra muy alta de sitios en donde se requiere efectuar acciones de remediación. Debido a la gran cantidad de suelos contaminados con materiales peligrosos, lo que ha llevado a que sea uno de los países de interés en el tema. Dentro de las instituciones El Instituto Politecnico Nacional aporta 3 publicaciones a la fecha de consulta.

Figura 5-5: Dinámica de publicaciones por instituciones latinoamericanas (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Scopus (Elsevier, 2016)*, procesados con *VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology)*. Fecha de consulta: 21/02/2017



- Dinámica de colaboración entre países

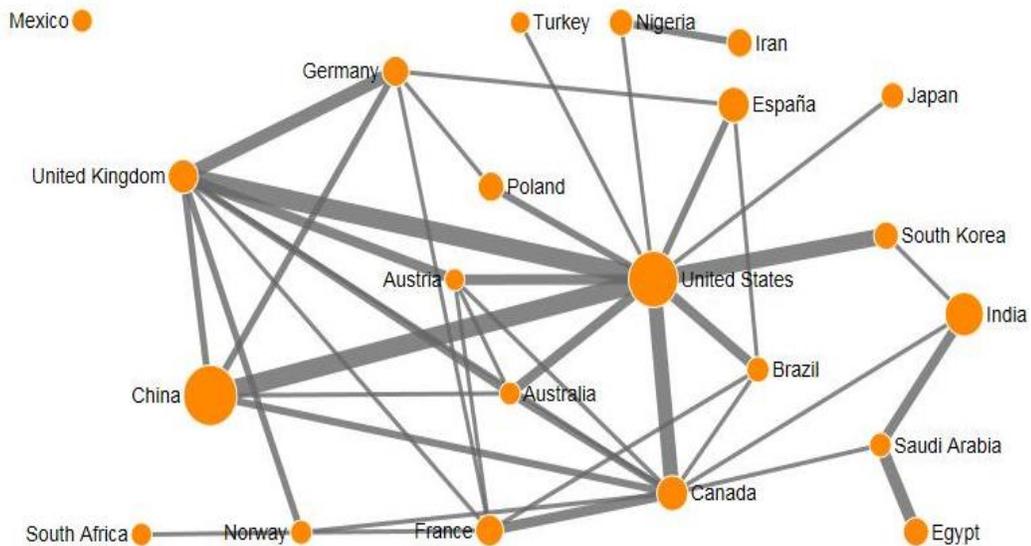
La figura 5-6 muestra la matriz de colaboración entre países a nivel mundial; la investigación colaborativa es un hecho que hace que sea mucho más fácil para las instituciones la exploración aplicada en la investigación de la descontaminación de suelos por biorremediación, en la actualidad los desarrollos tecnológicos asociados a biorremediación de contaminantes derivados del petróleo como los HAP está siendo liderada por países del mundo como: Estados Unidos, Reino Unido, China, Canadá y Francia.

Todas las investigaciones en todos los países de Latinoamérica y del resto del mundo tienen como justificación común la implementación de técnicas de biorremediación de Hidrocarburos en suelos contaminados por la industria petroquímica. Según la matriz se

puede concluir por cantidad de publicaciones existentes que las regiones como China y EEUU, han realizado más proyectos en comparación con los existentes para América Latina, esto muestra la gran diferencia que separa a las regiones según su desarrollo; en los países cuyos gobiernos le han dado alguna relevancia al tema, las diferencias también están claras: Brasil y México con apreciables diferencias con el resto de los países latinoamericanos como es el caso de Colombia, aunque aún lejos de los países desarrollados.

Este trabajo colaborativo ha permitido impulsar instituciones para la generación de patentes, con la formación de centros de colaboración científica que financian la investigación para mejorar los problemas asociados a la contaminación de suelos con HAP. El trabajo colaborativo entre países e instituciones permite fomentar el desarrollo de las tecnologías de biorremediación y promover su utilización, con el fin de obtener beneficios medioambientales sostenibles.

Figura 5-6: Matriz de colaboración entre países (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de Scopus (Elsevier, 2016), procesados con VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/2017



- Dinámica de artículos mayormente citados

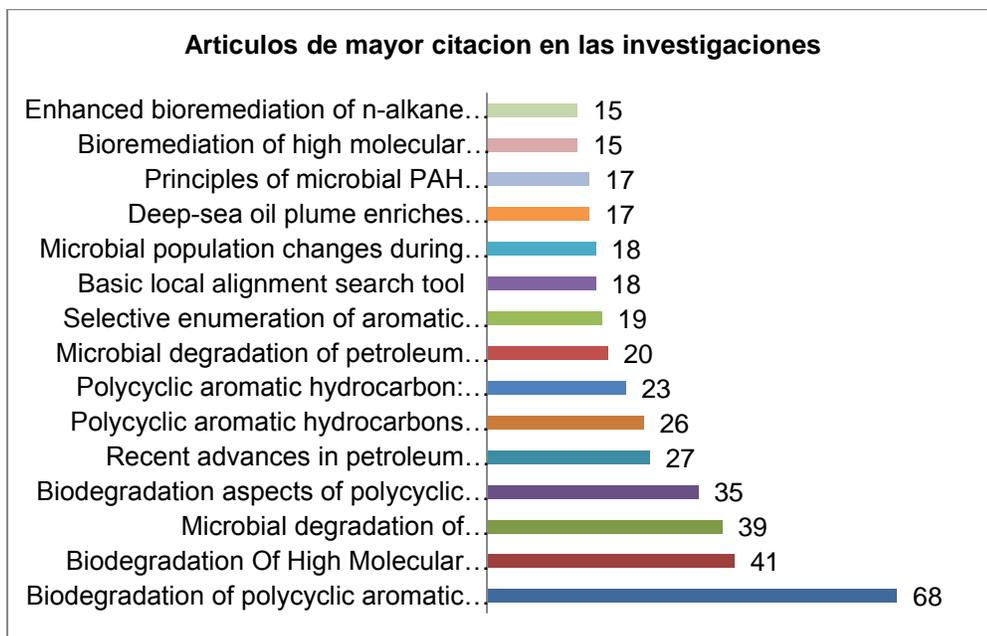
La Figura 5-7, muestra la dinámica de artículos científicos con mayor citación para el tema de la biorremediación sobre HAP. Se tomaron los registros con más de 15 citaciones en el corpus. Con 68 citaciones como artículo mayoritario por las investigaciones se tiene el escrito titulado *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon* del autor Carl E. Cerniglia, del 1992 de la División de Microbiología del Centro Nacional de Investigaciones Toxicológicas, Jefferson, AR 72079, EE.UU.

El artículo muestra una revisión que proporciona la capacidad de la degradación de HAP en comunidades microbianas diversas entre bacterias, hongos y algas, que catabolizan el

contaminante y lo metabolizan por procesos de hidroxilación. Da a conocer las estructuras químicas, características físicas y toxicológicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el ADN por su carácter cancerígeno en los humanos, discute los principios bioquímicos subyacentes de la biodegradación y las principales fuentes y mecanismos de transporte de HAP el entorno, con la importancia de estos en ecosistemas acuáticos y terrestres.

El artículo científico titulado *Biodegradation Of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria*, con 41 citaciones, ocupa el segundo puesto, como uno de los artículos con mayor citación en las investigaciones, de los autores Robert A. Kanaly y Shigeaki Harayama en el año 2000, del Instituto de Biotecnología Marina, Laboratorios Kamaishi, Ciudad de Kamaishi en Japón. El artículo discute los mecanismos de biodegradación y el destino ambiental de los HAP, mostrando la importancia de su distribución omnipresente y de sus efectos potencialmente perjudiciales para la salud humana.

Figura 5-7: Dinámica de artículos con mayor citación (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Scopus (Elsevier, 2016)*, procesados con *VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology)*. Fecha de consulta: 21/02/2017

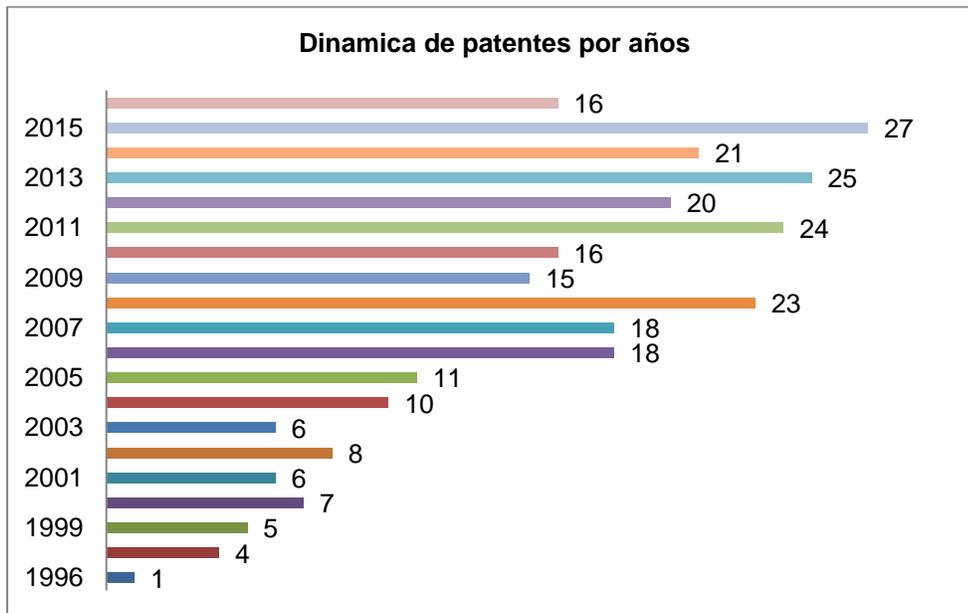


- Dinámica de patentes por años

En la figura 5-8 se muestra la mayor tendencia de innovación por patentes publicadas en los últimos 20 años, mostrando para el 2011, 2013 y 2015 el mayor interés de productos patentados en el tema con un corpus de 244 invenciones registradas, en la cual se tuvieron en cuenta la innovación de áreas multidisciplinares para el tema de la degradación y contaminación de los HAP. Los resultados muestran a la fecha de consulta que las invenciones le apuestan a una etapa de crecimiento en patentes dentro del ciclo de vida de la tecnología que conlleva a beneficios en la descontaminación de estos Hidrocarburos para el sector de la industria petrolera y demás fuentes de emisión, a su vez en los avances

de la medicina para controlar la toxicidad de estos contaminantes. Todo esto en términos de la conservación de los recursos de manera más sostenible y mediante una opción ambientalmente más amigable.

Figura 5-8: Dinámica de patentes por años (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Derwent Innovations Index*, procesados con *VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology)*. Fecha de consulta: 08/05/2017

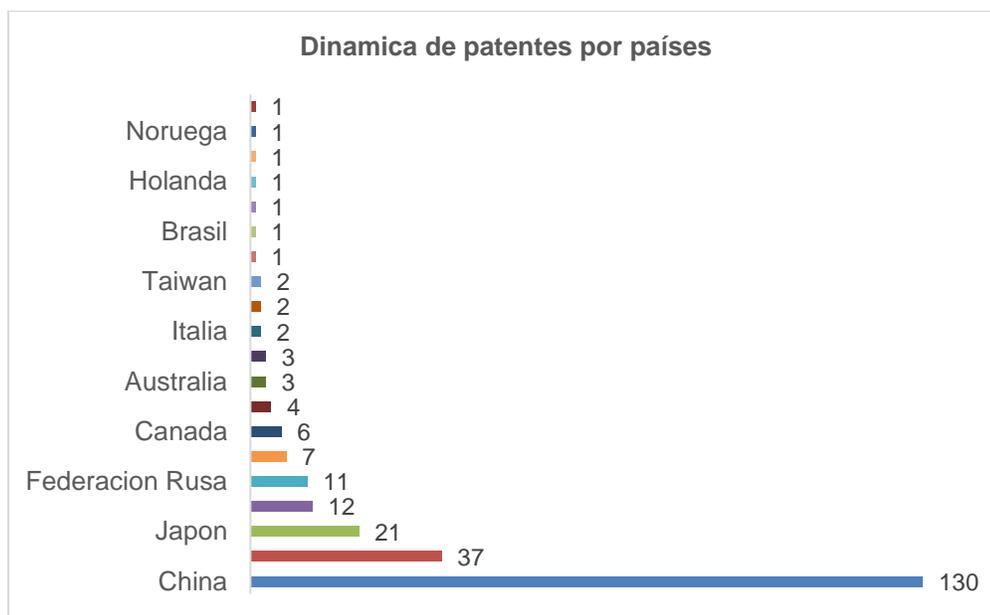


- Dinámica de patentes por países

Tomando como referencia 5 de los países líderes en cuanto a actividad inventiva a la fecha de búsqueda son: China con 130 invenciones, Estados Unidos con 37 invenciones, Japón con 21 invenciones, Rusia con 11 invenciones y Alemania con 7 invenciones. De este análisis se puede observar la alta inversión en Innovación y Desarrollo I+D, que se ha hecho en los países solicitantes para esta tecnología de biorremediación de microorganismos sobre HAP derivados del petróleo. Esta tecnología que a pesar de tener un número bajo de invenciones ha llegado a más mercados y tienen una alta actividad de patentamiento.

Por otro lado, al analizar solo la técnica de biorremediación de sitios contaminados se encontró según el Boletín Tecnológico de patentes, 2014, que los países en donde más se busca proteger las invenciones (o países de destino) relacionadas con tecnologías de biorremediación son: Japón con 1411 invenciones y 1984 solicitudes de patente publicadas, Estados Unidos con 932 invenciones y 1635 solicitudes de patente publicadas y China 755 invenciones y 1103 solicitudes de patente publicadas.

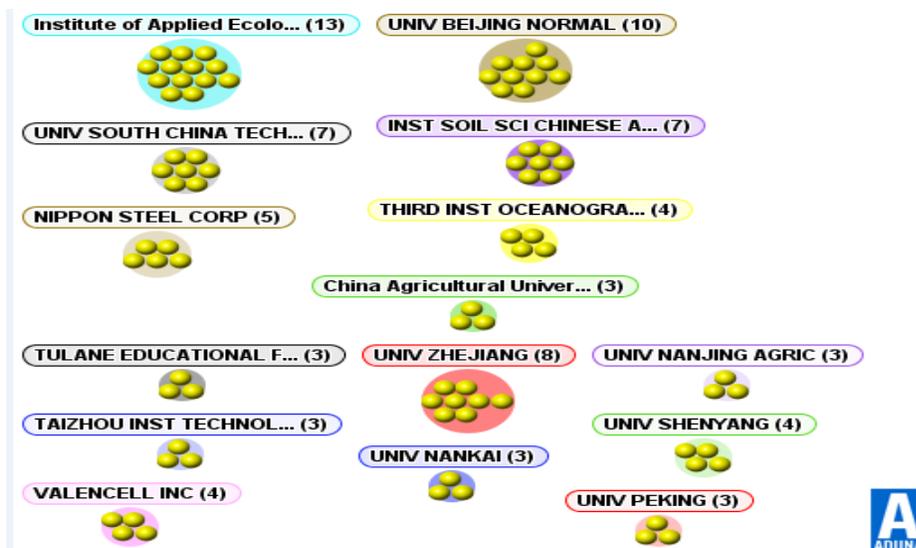
Figura 5-9: Dinámica de patentes por países (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Derwent Innovations Index*, procesados con *VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology)*. Fecha de consulta: 08/05/2017



- Dinámica de patentes por Instituciones

De la misma manera, se encontró que las cinco instituciones u organizaciones educativas más destacadas en cuanto a la actividad inventiva a la fecha son chinas, empezando por el Instituto de Ecología Aplicada Shenyang con 13 invenciones, seguida por la Universidad Normal de Beijing con 10, y con 7 invenciones la Universidad de Zhejiang, el Instituto de Ciencias del Suelo, la Academia China de Ciencias y por último la Universidad Tecnológica del Sur de China. Este conjunto organizaciones cuenta con una baja cantidad de citaciones recibidas, pero una alta cantidad de invenciones.

Figura 5-10: Dinámica de patentes por Instituciones (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Derwent Innovations Index*, procesados con *VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology)*. Fecha de consulta: 08/05/2017



La entidad mayoritaria en invenciones en el tema es el Instituto de Ecología Aplicada (IAE), de Academia China de Ciencias fundado como Instituto de Ciencias Forestales y del Suelo, siendo una de las entidades principales como solicitantes de patentes en el tema de la degradación de Hidrocarburos en fuentes de petróleo y gasolina en torno a los cuales se están desarrollando tecnologías de biorremediación (Boletín Tecnológico de patentes, 2014). Es importante destacar que este instituto cuenta con 5 centros de investigación, 1 Laboratorio Nacional de Ingeniería, 1 laboratorio clave del IAE, 5 laboratorios clave provinciales y 8 estaciones de investigación ecológica de campo, una sala Bio-specimen del Noreste de China y un Arboretum de Shenyang.

Desde su fundación, el Instituto ha desarrollado investigaciones en torno al desarrollo sostenible de la agricultura y la silvicultura, problemas urgentes e importantes en la construcción ecológica y ambiental y para la demanda en el desarrollo disciplinario de la ecología aplicada. Se desarrollan trabajos de investigación, estratégicos y prospectivos en la ecología forestal y la ingeniería ecológica forestal, la ecología del suelo y la ingeniería ecológica agrícola, la ecología de la contaminación y la ingeniería ambiental ecológica. Lo cual enriquece y desarrolla teorías básicas para la ecología forestal, ecología agrícola y ecología de la contaminación, proporcionando bases científicas y tecnologías clave para la recuperación y reconstrucción de ecosistemas degradados, mejoramiento del medio ambiente y garantía de seguridad alimentaria. Cuentan con publicaciones de 232 monografías, más de 7300 artículos y 474 patentes en diferentes temáticas.

- Dinámica de productos patentados

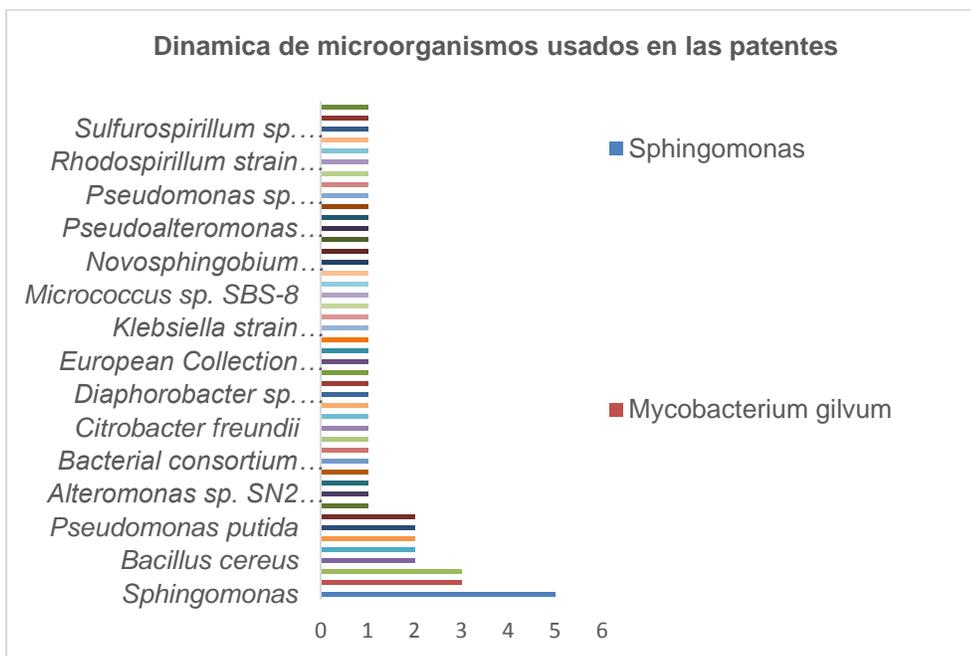
La Figura 5-11, muestra los productos patentados en el análisis de búsqueda de las 244 invenciones halladas a la fecha de consulta para el tema de Biorremediación de HAP.

Dentro de los cuales se incluyen las siguientes categorías de análisis:

76 invenciones para Métodos en la identificación y uso de productos para la degradación de los contaminantes. 54 invenciones para el uso de Bacterias-cepas de microorganismos modificados y tratados para la degradación de los HAP, en procesos de biorremediación activa por bioaumentación a través microorganismos indígenas para su uso en sitios contaminados. 43 invenciones con el uso de Compuestos entre Emulsificantes-Mezclas-

actividad metabólica, algunos modificados genéticamente y usados para procesos de bioaumentación.

Figura 5-12: Dinámica de microorganismos principales para las patentes (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Derwent Innovations Index*, procesados con *VantagePoint (Versión 9.0, Search Technology)*. Fecha de consulta: 08/05/2017



- **Dinámica de principales investigaciones consultadas sobre Biorremediación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Colombia.**

En Colombia según el registro del corpus de la base de datos de *SCOPUS* se destacan 3 instituciones de educación superior con estudios sobre la temática (ver Figura 5-5). Sin embargo, con el fin de abarcar de una forma más completa las capacidades nacionales se consultaron otras bases de datos como *SCIENCE@DIRECT*, servidores externos como *Google Scholar* y la plataforma de Ciencia y Tecnología de Colciencias.

La búsqueda encontró interés en algunas instituciones y grupos de investigación en el país para el tema, como lo muestra la Tabla 5-1, dentro de las universidades más destacadas encontramos:

Tabla 5-1: Dinámica de principales investigaciones consultadas sobre Biorremediación de Hidrocarburos y HAP en Colombia (Fuente: propia) Fecha de consulta: 20/09/2017.

Base de datos con Scopus					
Universidad	Dependencia	Artículo	Autores	Revista	Año
Universidad de Santander	Grupo de Investigación de Ciencias Básicas y Aplicadas para la	Molecular Characterization and Evaluation of Oil-degrading Native Bacteria Isolated	Zafra, G., Regino, R., Agualimpia, B., & Aguilar, F.	Chemical Engineering, 49	2016

	Sostenibilidad CIBAS	–	from Automotive Service Station Oil-contaminated Soils.			
Universidad de la Sabana	Facultad de Ingeniería	de	The effect of oil spills on the bacterial diversity and catabolic function in coastal sediments: a case study on the Prestige oil spill.	Acosta-González, A., Martirani-von Abercron, S. M., Rosselló-Móra, R., Wittich, R. M., & Marqués, S.	Environmental Science and Pollution Research, 22(20), 15200-15214	2015
Universidad de Córdoba	Grupo de Investigación en Biotecnología, Facultad de Ciencias Básicas, GRUBIODEQ	de	Biodegradation in vitro of diesel bilge waters using a microbial native consortium isolated from Córdoba.	Mezquida, R., Oviedo, L. E., & Lara, C.	Biotecnología Aplicada, 32(2), 2201-5	2015
Bases de datos sin Scopus						
Universidad Santander	Grupo de Investigación de Ciencias Básicas y Aplicadas para la Sostenibilidad CIBAS	de	Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil.	Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernández, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V.	Chemosphere, 172, 120-126	2017
			Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium.	Zafra, G., Taylor, T. D., Absalón, A. E., & Cortés-Espinosa, D. V.	Journal Of Hazardous Materials, 318, 702-710.	2016
			Morphological changes and growth of filamentous fungi in the presence of high concentrations of PAHs.	Zafra, G., Absalón, A. E., & Cortés-Espinosa, D. V.	Brazilian Journal of Microbiology, 46(3), 937-941.	2015
Universidad Antioquia	Grupo de investigación en Energía Alternativa, BIOMICRO	de	Degradation of pahs in aqueous solution using the UV-a/h2o2/fe2+ process directly powered by photovoltaic energy.	Edwin Lenin Chica Arrieta	Bulgaria, Ecology & Safety ISSN: 1314-7234, Vol: 11 fasc: págs: 290 – 298	2017
			A microcosm system and an analytical protocol to assess PAH degradation and metabolite formation in soils.	Lida Arias Marin, Jorge Bauza, Joana Tobella, Joaquim Vila, Magdalena Grifoll	Biodegradation. Países Bajos, Biodegradation ISSN: 0923-9820, vol: 19 fasc: págs: 425 - 434, DOI: 10.1007/s10532-007-9148-0	2008
Universidad de los ANDES	Grupo de Investigación en Microbiología Ambiental y Bioprospeccion	de	Bioremediation of soils contaminated with phenanthrene and chromium (VI): Response to successive contamination. Inglaterra	Martha Josefina Vives Florez	International Biodeterioration & Biodegradation ISSN: 0964-8305, vol: 62 fasc: 1 págs: 13 – 13.	2008
Universidad colegio mayor de Cundinamarca	Grupo de investigación CEPARIUM	de	Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por <i>Pseudomonas</i> en suelos contaminados por hidrocarburos.	Diana Carolina Gutiérrez Bustos	Nova ISSN: 1794-2470, vol: 6 fasc: 9 págs: 76 – 84.	2008
Universidad de la Salle en			Biorremediación de suelos contaminados	Mesa, J. B. L., Quintero, G.,	Nova, 4(5).	2006

cooperación con el colegio mayor de Cundinamarca		con hidrocarburos derivados del petróleo.	Vizcaino, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M.		
Fundación Universidad Central	Grupo de Investigación en Agua Y Desarrollo Sostenible	Evaluación del efecto de la bioestimulación sobre la biorremediación de hidrocarburos en suelos contaminados con alquitrán en Soacha, Cundinamarca-Colombia	John Jairo Sandoval Cobo, Victoria Eugenia Vallejo Quintero	Acta Agronómica ISSN: 0120-2812, vol: 65 fasc: 4 págs: 354 – 361	2016
Universidad Abierta y a Distancia	Escuela de Ciencias Agrícolas	Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia.	Toro, M. A. T., & Quirama, J. F. R.	Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA), 3(2), 37-48.	2015
Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) en cooperación con la Universidad Industrial de Santander (UIS).		Evaluación del potencial de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en suelos contaminados procedentes de petrosantander (Colombia) INC	Ibarra Mojica, D. M.	Revista de investigación científica UPB PUENTE ISSN: 19099851, vol: 3(1), 35-46.	2013
La Pontificia Universidad Javeriana	Grupo de investigación de Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) Y el Grupo de Biotecnología Ambiental Industrial	Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aislados a partir de sedimentos del caribe colombiano.	Silvia Narváez Flórez, María Mercedes Del Pilar Martínez Salgado	Boletín De Investigaciones Marinas Y Costeras ISSN: 0122-9761, vol:37 fasc: 1 págs: 61 - 75,	2008

Entre otras instituciones para Colombia se encontraron según los registros, instituciones interesadas en adelantar estudios para el desarrollo de técnicas de Biorremediación sobre Hidrocarburos, de las se tienen:

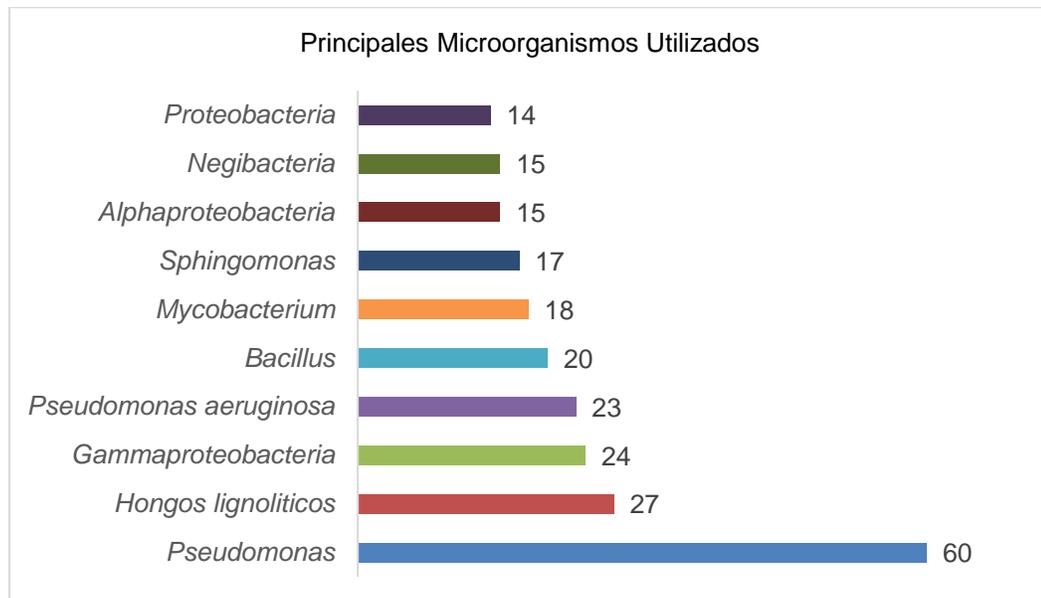
- La CORPORACIÓN UNIVERSITARIA DEL META, con el departamento de Ciencias Básicas y tecnológicas.
- La Universidad de pamplona, con el Grupo de Investigación en Recursos Naturales
- El Instituto De Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR. Con el grupo de investigación Calidad Ambiental Marina

Del contexto anterior se evidencia que a nivel nacional la red de trabajo colaborativo frente al tema entre las diferentes universidades está incipiente, pero en crecimiento, cabe resaltar que algunas de investigaciones en el tema para Colombia son en colaboración con investigadores del país y con instituciones extranjeras en países como los estados unidos, España y Brasil.

5.2 Avances en biorremediación

Como se describió 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*, *Javobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Gordonia*, entre otros (Mutnuri et al., 2005.; Jacques et al., 2005; Jacques et al., 2007).

Figura 5-13: Dinámica de los principales tipos de microorganismos (hongos y bacterias) utilizados en las investigaciones de consulta (Fuente: Unidad de Bibliometría - USTABUCA, cálculos basados en información de *Scopus* (Elsevier, 2016), procesados con *VantagePoint* (Versión 9.0, Search Technology). Fecha de consulta: 21/02/17



La figura 5-13, refleja los principales tipos de bacterias, hongos y especies de estos microorganismos que están involucrados en el corpus de 412 artículos de investigaciones para el tema de la biorremediación de HAP derivados del petróleo.

La Figura anterior muestra una mayor prioridad con bacterias del género *Pseudomonas* como microorganismos promisorios en el uso de biodegradación de HAP, según el análisis de las investigaciones con un total de 60 apariciones en los artículos de consulta, seguido por los Hongos lignolíticos con un total de 27 apariciones, como microorganismos de alto potencial en la biorremediación en estos contaminantes. Muchos de ellos usados en procesos de bioaumentación la cual puede realizarse con microorganismos nativos, externos o en ocasiones con microorganismos genéticamente modificados, como los muestra la Figura 5-12. Este procedimiento ha mostrado resultados significativos bajo condiciones controladas, pero su efectividad en condiciones ambientales (a campo abierto) falta por ser completamente demostrada.

Dentro de los géneros de Hongos, algunos participan en la biodegradación de tipos de hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular como el pireno. (Tabla 5-2)

Tabla 5-2: Géneros de Hongos que participan en biodegradación de HAP. Tomado de (Oliveira, R and Alves F, 2013)

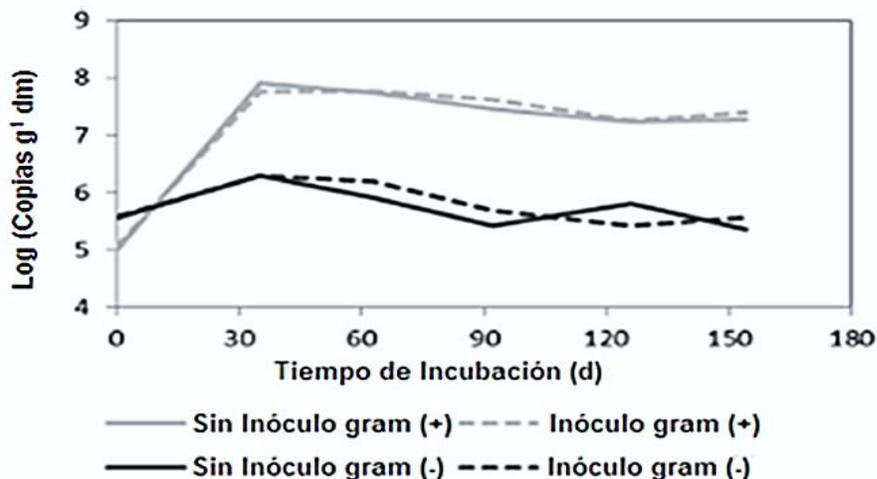
Producto	Microorganismos por géneros	Compuestos degradados	Autores
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)	<i>Mucor, Gliocadium, Penicillium, Phialophora, Trichoderma, Scopulariopsis y Coniothyrium</i>	Degradación de pireno	(Ravelet <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Aspergillus y Pleorotus Phanerochaete</i>	Biodegradación de HAP	(Mollea <i>et al.</i> , 2005)

Se ha observado, según los estudios que una alta proporción de los HAP contaminantes del suelo, son degradados por especies aisladas del sustrato del suelo perteneciente al género *Sphingomonas*, bacterias enunciadas anteriormente. A diferencia de otras cepas de bacterias gram-negativas, los miembros de este género *Sphingomonas* 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 *Sphingomonas* 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 *Sphingomonas* 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. En el caso de 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 figura 5-14, según lo publicado por Winquist, 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 5-14: 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 degradación bacteriana de estos compuestos normalmente envuelve la formación cis-dihidrodiol 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-dihidrodiol, en ambos casos un diol es un intermediario indispensable según Alexander 1997, 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 recurso 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 (H_2O_2) 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. (Tabla 5-2). 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. 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).

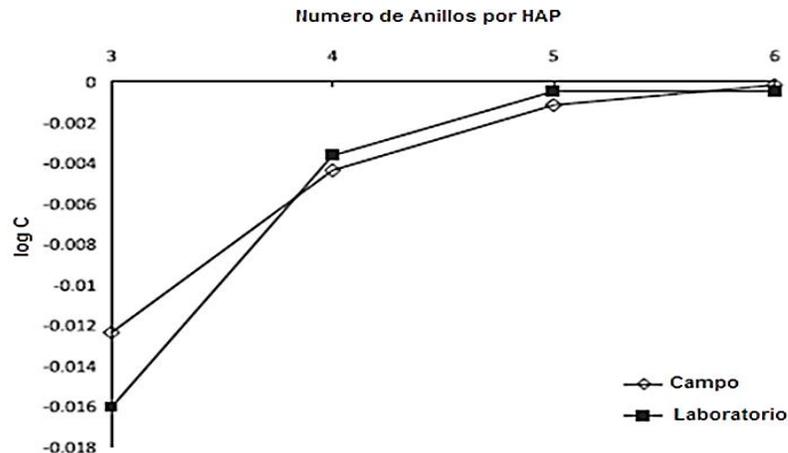
Tabla 5-3: Concentraciones de cada uno de los 16 HAP reportados por la EPA, en un suelo contaminado por HAP. Tomado y adaptado al español de (Lors, C et al., 2012).

	[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.

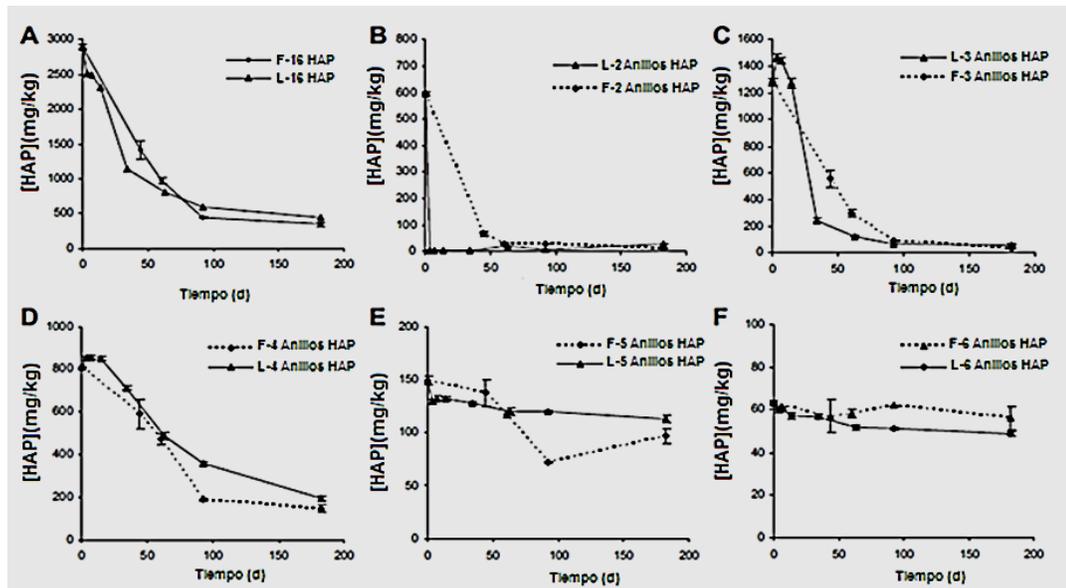
Concentración de cada uno de los 16 HAP (EPA) (reportadas en kg⁻¹ suelo seco mg) en el suelo Ti (el mismo suelo se utilizó en los experimentos de campo y de laboratorio).

Figura 5-15: Valores del crecimiento exponencial (log C) en función del número de anillos en HAP de 3, 4, 5 y 6 anillos, durante la biodegradación en los experimentos de laboratorio y de campo. Tomado y adaptado al español de (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. 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 predomina en contaminantes de 2,3 y 4 anillos (Lors, C et al., 2010b). La tasa relativa de degradación de los HAP de 3 anillos fue cerca de 30 veces mayor que la de los compuestos de 5 y 6 anillos mientras que sólo 7 veces superior a los de 4 anillos. 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 (figura 5-16) (Lors, C et al., 2012).

Figura 5-16: 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).



La figura 5-16 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 esperaba. 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).

La literatura registra gran avance en los géneros de hongos anteriormente enunciados, 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. 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.

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., 2014). 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 (Winquist, E et al., 2014). 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 (Tabla 5-3).

Tabla 5-4: 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>	
	Concentración (mg kg ⁻¹ dm)	Fracción de Bioacceso (%)	Concentración (mg kg ⁻¹ dm)	Degradación (%)	Concentración (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.

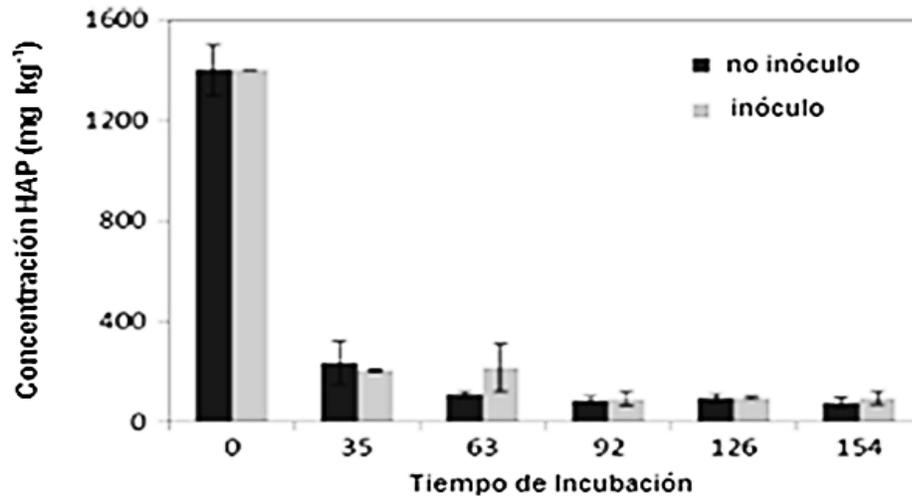
b. Valor promedio de tres repeticiones _ SD.

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). 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 inóculo con *Phanerochaete velutina* y los tratamientos no inoculados: 94% de los 16 HAP fueron degradados en tres meses. (Figura 5-17).

Figura 5-17: Concentraciones de HAP durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico. Tomado y adaptado al español de (Winqvist, E et al., 2014).



La figura anterior refleja la concentración de PAH durante el experimento de campo con o sin inóculo fúngico (valor promedio de dos repeticiones, las gamas 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).

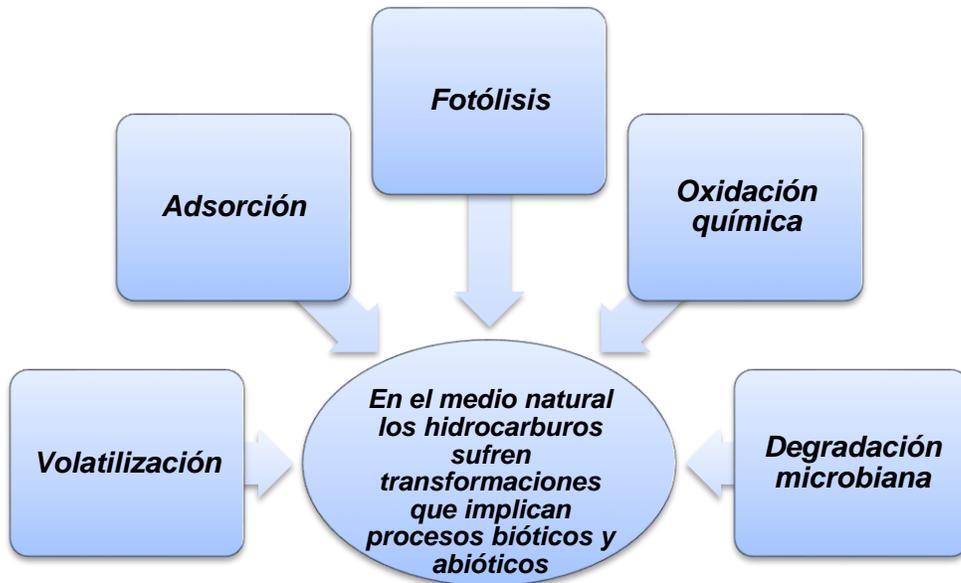
5.2.1 Factores que determinan la eficacia de la biorremediación

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).

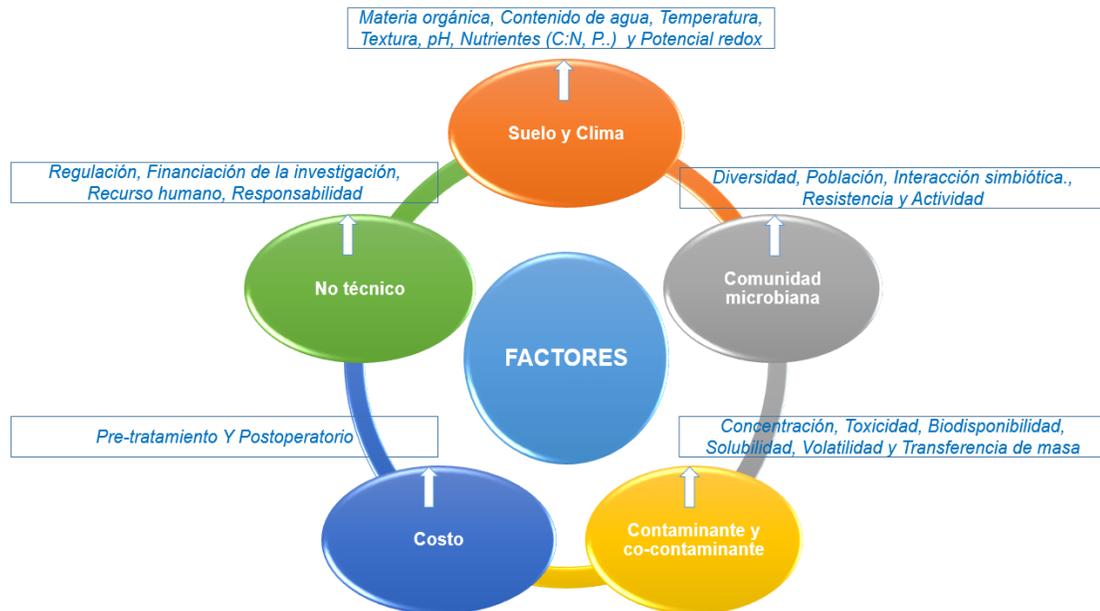
Es importante analizar en cada caso la necesidad real de añadir nutrientes al medio contaminado, pues estos pueden ser a su vez una fuente de contaminación. La efectividad del uso de poblaciones microbianas autóctonas o la adición de poblaciones exógenas (Aldrett, S et al., 1997). Es importante estimar 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).

Figura 5-18: Procesos que implican las degradaciones de los hidrocarburos en el medio (Fuente: Propia)



La tendencia actual muestra claramente el interés de los investigadores en los enfoques ecológicos y sostenibles. Aunque la mayoría de las tecnologías verdes o de biorremediación discutidos en esta revisión han sido reconocidos desde hace más de un siglo como ser capaz de remediar con éxito los suelos contaminado por HAP, en la mayoría de los casos las estrategias de remediación fallan en el campo a gran escala debido a varias limitaciones basadas en los factores tanto técnicos como no técnicos como se muestran en la figura 5-19.

Figura 5-19: Factores que afectan a la remediación de campo a gran escala de los suelos contaminados HAP. Tomado y adaptado al español de (Kuppusamy, S., et al, 2017)



Los factores técnicos que afectan a la remediación se pueden agrupar en cuatro clases interrelacionadas: suelo y el clima, comunidad de microorganismos, contaminante y co-contaminantes y los costos. La ubicación en el perfil del suelo y la distribución espacial de los HAP en el sitio afectado son puntos importantes a considerar al igual que las limitaciones específicas del sitio para su intervención. Se debe tener en cuenta el tipo de medio ambiente (suelo), la solubilización del contaminante, el estado de aireación (disponibilidad de oxígeno), la concentración y biodisponibilidad de los HAP, la temperatura, la biodisponibilidad de la fuente de carbono filial y nitrógeno, la optimización de las vías bioquímicas para los microorganismos, la presencia de otros contaminantes inhibitorios o compañeros de los contaminantes, los cuales puedan afectar el proceso, el contenido y la actividad del agua del suelo, la falta de nutrientes del suelo y la competencia microbiana influyen mucho en la eficiencia y la eficacia de un sistema de recuperación o rehabilitación del suelo en el campo de trabajo (Christofi y Ivshina, 2002).

Por lo tanto, dependiendo de la gravedad de la contaminación y los objetivos de remediación, la elección del método sea in-situ o ex-situ para la remediación, tiene que ser considerado cuidadosamente junto con el tipo de opciones de pre y post-tratamiento. Además, nuevos enfoques se pueden desarrollar en integración de las características importantes de las técnicas individuales que tienen más ámbitos para la exploración. Sin embargo, el costo de la reparación del suelo es el factor más limitante y tiene que ser bien pensado en tales casos. El desarrollo de objetivos inapropiados para remediarlo (incluyendo el tiempo, aspectos socioeconómicos y de salud humana), la falta de mantenimiento y vigilancia en la gestión son también causas del fracaso.

Además de las limitaciones técnicas, algunos de los factores no técnicos, tales como la percepción pública y una regulación favorable, capacidad para cumplir con las limitaciones

de tiempo y los riesgos aceptables en los contaminantes residuales que quedan tras la rectificación también afectan el proceso de limpieza. Las regulaciones no sólo los conducen a la limpieza de suelos contaminados, sino que también limitan el uso de algunos métodos de recuperación. Aunque se requiere una investigación más intensiva para la limpieza de suelos contaminados con HAP, la financiación o subvenciones para la realización de la investigación básica está disminuyendo lentamente sobre todo en los países en vía de desarrollo, siendo Colombia un ejemplo de ellos. Un programa de remediación con éxito requiere un enfoque multidisciplinario, que en la mayoría de los casos no se ofrece, es decir, la integración de profesionales idóneos entre microbiólogos, químicos, geólogos, ingenieros, con conocimiento del suelo, junto con los grupos de interés.

5.3 Avances en las tecnologías de remediación de HAP en suelos contaminados.

5.3.1 Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación en HAP de acuerdo con el tipo de tratamiento.

La biorremediación es una tecnología de tratamiento reconocida como una estrategia ambientalmente benigna. La biorremediación puede ser impulsada por funciones microbianas únicamente o por interconexión entre microorganismos (Fester et al., 2014). La biorremediación puede proporcionar más ventajas sobre otras tecnologías, una de estas es que el suelo rehabilitado o el sedimento pueden retener muchas de sus propiedades claves, lo que permite su reutilización después del tratamiento. El precio de la biorremediación es comparable a otras técnicas no biológicas, tales como la extracción química, la incineración y la desorción térmica, que oscilan entre 20 y 70 €/m³ (Elskens y Harmsen, 2007). Mientras que la Biorremediación tiene un costo en promedio por los 35 €/m³ (Ortega-Calvo et al., 2013). La siguiente tabla muestra una comparación más detallada de tratamientos según los autores sobre las tecnologías de remediación en suelos contaminados con HAP.

Tabla 5-5: Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación en HAP de acuerdo con el tipo de tratamiento. Tomado y adaptado de (Kuppusamy, S., et al, 2017; Trejo, 2002; Sungthong, R. 2014).

Tecnologías	Ventajas	Desventajas	Tratamientos para suelos contaminados con HAP	
			Tratamiento por Bioaumentación	Tratamiento por Compostaje
Biológicos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Son efectivos en cuanto a costos. ✓ Son tecnologías más limpias y benéficas para el ambiente y los suelos afectados. ✓ Los contaminantes generalmente 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Requieren mayores tiempos de tratamiento, dependiendo del peso molecular del Hidrocarburo. ✓ Es necesario verificar la toxicidad de 	<p>Aplicación: Implementado para tratar suelos contaminados con: Herbicidas, insecticidas, clorofenoles, (PCP) y nitrofenoles, Metales, BPC, HTP y HAP.</p>	<p>Aplicación: Usado con éxito para remediar suelos contaminados con PCP, gasolinas, HTP, HAP.</p>

	<p>son destruidos y consumidos por metabolismo de los microorganismos .</p> <p>✓ Generalmente no requieren de tratamientos posteriores en el suelo.</p> <p>✓ Al igual que el resto de las tecnologías de remediación, pueden realizarse <i>in situ</i> o <i>ex situ</i>.</p>	<p>intermediarios y productos.</p> <p>✓ No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano.</p> <p>✓ la biodegradación es la fuerza impulsora de la biorremediación de los HAP, los factores ambientales que influyen en su biodegradación, como la biodisponibilidad son importantes para efectividad de la tecnología y establece una gran limitación para evaluar la viabilidad de esta tecnología en el tratamiento de suelos y sedimentos contaminados.</p>	<p>Limitaciones: Antes de su implementación se debe realizar pretratamientos en la zona contaminada por medio de cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Alexander, 1994).</p>	<p>Limitaciones: En su implementación y operación es importante tener en cuenta la necesidad del espacio; necesidad de excavar el suelo contaminado, lo que puede provocar la liberación de COV y el incremento volumétrico del material a tratar (Van Deuren et al, 1997).</p>
			<p>Costos: Sus costos varían por debajo de los \$150 USD/m³ (Elskens F, Harmsen J, 2007).</p>	<p>Costos: Depende de: la cantidad y fracción de suelo a tratar; disponibilidad de agentes de volumen; tipo de contaminantes y proceso; necesidad de tratamientos previos o posteriores y necesidad de equipos para el control de COV. Lo cual oscilan entre 130 y 260 USD/m³ (EPA, 2001).</p>
			<p>Tratamiento por extracción con disolvente / lavado de suelos (SE/SW)</p>	<p>Tratamiento por oxidación química (CIUO)</p>
<p>Fisicoquímicos</p>	<p>✓ Son efectivos en cuanto a costos</p> <p>✓ Pueden realizarse en periodos cortos.</p> <p>✓ El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería.</p> <p>✓ Los tratamientos fisicoquímicos aprovechan las propiedades físicas y químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.</p> <p>✓ Los procesos Fisicoquímicos incluyen la destrucción, separación e inmovilización de contaminantes.</p>	<p>✓ Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos.</p> <p>✓ Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación en los suelos.</p> <p>✓ En casos se requieren tratamientos posteriores a los suelos.</p>	<p>Aplicaciones: El lavado de suelos se ha utilizado con éxito para tratar suelos contaminados con hidrocarburos, HAP, PCP, pesticidas y metales pesados.</p>	<p>Aplicaciones: Por este método pueden atacarse principalmente compuestos inorgánicos. Sin embargo, puede usarse con menor eficiencia para HAP, COV no halogenados y COS, gasolinas y pesticidas.</p>
			<p>Limitaciones: Las soluciones utilizadas y los solventes pueden alterar las propiedades fisicoquímicas del suelo, difícil tratar suelos poco permeables o heterogéneos, los surfactantes o tensoactivos utilizados en el lavado pueden adherirse al suelo y afectar su</p>	<p>Limitaciones: Puede ocurrir una oxidación incompleta o formación de compuestos intermediarios, dependiendo del contaminante y el agente oxidante usado. La presencia de aceites y grasas disminuye la eficiencia y los costos se incrementan para altas concentraciones de contaminantes (Gong et al, 2010).</p>

	<p>✓ Al igual que el resto de las tecnologías de remediación, las fisicoquímicas pueden realizarse <i>in situ</i> o <i>ex situ</i>.</p>		<p>porosidad y los fluidos pueden reaccionar con el suelo reduciendo la movilidad de los contaminantes (Khodadous et al, 2000).</p>		
			<p>Costos: Los costos para la inundación y extracción por solventes oscilan entre 20 y 200 USD/m³ y para el lavado el costo promedio es de 150 USD/m³ (EPA, 2001).</p>	<p>Costos: Es una tecnología cuyos costos oscilan entre 190 y 600 USD/m³ (EPA, 2001).</p>	
			<p>Tratamiento por Desorción térmica DT</p>	<p>Tratamiento por incineración</p>	<p>Tratamiento por pirólisis</p>
<p>Térmicos</p>	<p>✓ Alta remoción. ✓ Los procesos térmicos incluyen la destrucción, separación e inmovilización de contaminantes.</p>	<p>✓ Es el grupo de tratamientos más costoso. ✓ Se requieren tratamientos posteriores a los suelos para evitar su degradación. ✓ Los procesos térmicos utilizan alto gasto de energía para generar altas temperaturas e incrementar la volatilidad (separación), quemado, descomposición (destrucción) o fundición de los contaminantes (inmovilización). ✓ Las tecnologías térmicas de separación producen vapores que requieren de tratamiento y residuos sólidos (cenizas), en ocasiones, líquidos peligrosos que requieren de tratamiento o disposición. ✓ A diferencia que el resto de las tecnologías de remediación, las térmicas en su</p>	<p>Aplicaciones: La DT puede aplicarse en general, para la separación de compuestos orgánicos de desechos, así como para suelos contaminados con creosota e hidrocarburos. Los procesos de DTAT se utilizan principalmente para tratar COS, HAP, BPC y pesticidas, pero pueden aplicarse también para COV y gasolinas.</p>	<p>Aplicaciones : Se usa para remediar suelos contaminados con explosivos, residuos peligrosos como hidrocarburos clorados, BPC y dioxinas.</p>	<p>Aplicaciones : Puede aplicarse para tratar BPC, dioxinas, desechos de alquitrán y pinturas, suelos contaminados con creosota y con hidrocarburos. Ha mostrado buenos resultados en la remoción de HAP y otros compuestos orgánicos.</p>
			<p>Limitaciones: Su uso varía en función de la temperatura que pueda alcanzarse durante el proceso seleccionado. Estas tecnologías no son efectivas en zonas saturadas, suelos muy compactos o con permeabilidad variable, además de que producen emisiones gaseosas (Baker et al, 2007).</p>	<p>Limitaciones: Es necesario tratar los gases de combustión (dioxinas y furanos), para el tratamiento de BPC y dioxinas, deben emplearse incineradores fuera del sitio. Los metales pesados pueden producir cenizas que requieren estabilización, se necesitan sistemas de</p>	<p>Limitaciones: Se requieren tamaños de partícula específicos y manipulación del material, altos contenidos de humedad (mayor a 1%) aumentan los costos; es necesario tratar los gases de combustión (Baker et al, 2007).</p>

		mayoría solo pueden realizarse <i>ex situ</i> .		limpieza de gases; los metales pueden reaccionar con otros compuestos formando compuestos más volátiles y tóxicos (Acharya y Ives, 1994).	
			Costos: La limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos por DT varía entre 50 y 350 USD/m ³ . En términos generales, la DT con uso de vapor puede costar más de 400 USD/m ³ (EPA, 2001).	Costos: Los costos de incineradores fuera del sitio oscilan entre 200 y 1000 USD/ton; para tratar suelos contaminados con dioxinas y BPC los costos van desde los 1,500 a 6,000 USD/ton (EPA, 2001).	Costos: Sus costos pueden estar por encima de los 1000 USD/ton; para tratar los contaminantes (Alexander, 1994).

De acuerdo con la información antes presentada, puede decirse que la selección de una tecnología de remediación para un suelo con características particulares, contaminado con HAP o con más contaminantes en particular, básicamente depende de criterios como:

- ✓ Características ambientales, geográficas, demográficas, hidrológicas y ecológicas del sitio.
- ✓ Tipo de contaminante (orgánico o inorgánico), concentración y características fisicoquímicas.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas y tipo de suelo a tratar.
- ✓ Costo de las posibles tecnologías a aplicar

Aunque los tratamientos anteriormente físicos, químicos y biológicos se han demostrado ser eficaces en el tratamiento de HAP, todavía hay limitaciones en su aplicación a remediar los suelos de campo (Kuppusamy et al., 2016d). Según las investigaciones estos incluyen una efectividad reducida en remediación de suelos contaminados de hace mucho tiempo particularmente con HAP de HMW, con una acumulación de productos de transformación, mayor duración del proceso y aumento de los costos. Para hacer frente a estas limitaciones, los estudios recomiendan varias combinaciones de tratamientos integrados como: físico-químicas (por ejemplo, extracción con disolventes y oxidación química), físico-biológico (por ejemplo con extracción con disolventes y biorremediación), químico-biológica (por ejemplo con oxidación química y biorremediación), biológicas (por ejemplo con el aumento de la biorremediación por medio de bioaumentación y bioestimulación) y físico-químico-biológico (por ejemplo con lavado de suelos más oxidación química mas biorremediación) (Kuppusamy et al, 2016e).

5.3.2 Remoción de concentraciones de HAP en suelos contaminados según el tipo de tratamiento

Existen varias tecnologías reportadas en la literatura para la remediación de los suelos contaminados con HAP a diferentes escalas de prueba. Las cuales se consolidan y se muestra algunas de ellas en la Tabla 5-6. Se Incluyen una gama de tecnologías ampliamente aplicadas como: lavado de suelo / extracción por solvente, oxidación química, biorremediación, incineración, desorción termica y enfoques correctivos integrados para procesos nuevos y emergentes.

Tabla 5-6: Empleos a nivel mundial del potencial de remoción en las tecnologías establecidas para el tratamiento de suelos contaminados con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos HAP a escalas de campo, banco y piloto. Tomado y adaptado al español de (Kuppusamy, S., et al, 2017)

Tipo de tratamiento	Sitio	Estado de la aplicación	Descripción de la tecnología establecida	Volumen o superficie de tierra tratada	Concentración de HAP inicial (mg kg ⁻¹)	Duración de la operación (días)	HAP estudió	% PAH remediada	Tipo de estudio	Referencia
Térmicos	Superfundo sitio contaminado con residuos tóxicos en EE. UU	<i>Ex situ</i>	Incineración	142.000.000 kg	1000	480	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno	90	Escala de campo	(Acharya y Ives, 1994)
	Tratamiento de madera antigua en EE. UU	<i>In situ</i>	Desorción térmica	29,800,000 kg	30.6	130	Benzo[a]pireno	99.9	Escala de campo	(Baker et al, 2007)
	Residuos de Carbón y humo negro en EE. UU	<i>In situ</i>	Ventilación del suelo y Desorción térmica	70 kg	1000	35	Naftaleno, Fenantreno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Benzo [g,h,i] perileno, Indeno [1,2,3-cd] pireno	90	Escala de banco	(Hosseini, 2006)
Fisicoquímicos	Suelo contaminado en Bedford, Reino Unido	<i>Ex situ</i>	El lavado del suelo con agua y disolventes orgánicos mixtos	1 g	11600	1	Naftaleno, Fluoranteno, Fluoreno, Pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Benzo[a]pireno, Benzo [g, h, i] perileno, Indeno [1,2,3-cd] pireno	96.3	Escala de banco	(Khodadous et al, 2000)

Planta de Gas Manufacturado en Francia	<i>Ex situ</i>	La extracción con ciclodextrina	50 gramos	655	7	Fenantreno, Antraceno, Pireno	99	Escala de banco	(Viglianti et al, 2006)
Planta de Gas Manufacturado en China	<i>Ex situ</i>	Extracción con aceite de girasol	150 g	5453	7	Fluoreno, Fluoranteno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Criseno, Benzo[a]pireno, Benzo [g, h, i] perileno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno	81-100	Escala de banco	(Gong et al, 2010)
Planta de Gas Manufacturado en EE. UU	<i>Ex situ</i>	La oxidación con reactivo de Fenton	9 kg	1164	40	Criseno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Dibenzo [a, h] antraceno	87-95	Escala piloto	Pradhan et al. (1997)
Planta de coque en EE. UU	<i>Ex situ</i>	La oxidación con persulfato de magnetita activado	1 g	1300 y 1400	7	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g,h,i] perileno	50-60	Escala piloto	Usman et al. (2012)
Planta de fabricación de acero en Francia	<i>Ex situ</i>	La oxidación con KMnO ₄	10 g	1550	4	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno,	70	Escala de banco	Lemaire et al. (2013)

							Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno ,Benzo[k]fluoranten o, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno			
Biológicos	Planta de gas y tratamiento de la madera en República Checa	<i>Ex situ</i>	Bioaumentación con hongos	5 g	2320 y 612	42	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno ,Benzo[k]fluoranten o, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno	58-73	Escala de banco	(Leonardi et al, 2007)
	Suelo contaminado en Shenfu, China	<i>Ex situ</i>	Bioaumentación con hongos	5 g	15.7	30	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno ,Benzo[k]fluoranten o, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno	45-56	Escala de banco	(Li et al, 2008)

	Industria del horno de coque en Portugal	<i>In situ</i>	Landfarming	100 m ²	1140	150	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno	60	Escala de campo	Picado et al. (2001)
	Sector Industrial en Italia	<i>Ex situ</i>	Slurry- y biorreactores aeróbicos de fase semisólida	26 kg	3700	35	Naftaleno, Antraceno, Acenaftenos, Fluoreno, Fluoranteno, Fenantreno, Pireno, Criseno, Benzo[a]antraceno	60-70	Escala de banco	(Pinelli et al, 1997)
	Relleno sanitario en Italia	<i>Ex situ</i>	Biorreactor aerobio-fase de suspensión en presencia de cepas bacterianas autóctonas y tensioactivo	150 g	70.4	30	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno	60	Escala de banco	Di Gennaro et al. (2008)
	Plantas de Gas Manufacturado en Australia	<i>Ex situ</i>	Bioaumentación	5 g	889	60	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno,	40-50	Escala de banco	(Thavamani et al, 2012b)

							Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno			
	Planta de tratamiento de creosota, EE. UU	<i>Ex situ</i>	Sistema de pila de compost estático con estiércol de aves de corral	350 kg	1086.9	570	Naftaleno, Antraceno, Fenantreno, Fluoreno, Pireno, Criseno, Fluoranteno, Benzo[a]pireno	98	Escala de banco	(Atagana, 2004)
	Planta de gas de trabajo en Australia	<i>In situ</i>	Compostaje	1-1,5 kg	6915	210	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno	50-90	Escala de campo	(Guerin, 2000)
	Refinería de petróleo en Serbia	<i>In situ</i>	Biopila	2,7 m3	3.6	500	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno,	77	Escala de campo	(Maletic et al, 2009)

							Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno			
	Refinería de petróleo en México	<i>Ex situ</i>	Bioaumentación y bioestimulación	10 g	7560	35	Naftaleno, Acenaftenos, Acinaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Antraceno, Criseno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Indeno [1,2,3-cd] pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo [a, h] antraceno, Benzo [g, h, i] perileno	50-70	Escala de banco	(Mancera-López et al, 2008)

La Tabla 5-6 muestra variadas tecnologías aplicadas en diferentes zonas contaminadas con HAP a nivel mundial para países como China, Estados Unidos, Reino Unido, República Checa, Francia, Australia, Italia, Serbia, Portugal y México. Como en todo sector industrial, son diversos los actores en el campo de la remediación de suelos contaminados con HAP y cada uno desempeña una función relevante para el crecimiento y consolidación del mismo. Este campo en particular está conformado por: industrias generadores de residuos que afectan el ambiente, entre las que se destacan las petroleras, mineras, refinerías y zonas del sector Industrial por la gran cantidad de residuos que producen. Los estudios muestran variadas concentraciones iniciales de contaminación de los HAP, cantidades a tratar del suelo, días de remoción, HAP presentes, Escala de intervención, tipo de estudio y concentraciones de remoción. Todas estas son condiciones que se deben tener en cuenta para la aplicación de las tecnologías según la necesidad que se requiere.

Las tecnologías térmicas mostraron remociones de HAP hasta del 90-99% y fueron utilizadas en superficies de volúmenes grandes de suelo contaminado en estados de aplicación ex situ e in situ y por estudios de campo preferiblemente. Las tecnologías fisicoquímicas fueron utilizadas en estados de aplicación ex situ mostrando remociones del 80-99% en estudios de campo y banco al

igual que las tecnologías biológicas con remociones de 50-99% en estados de aplicación ex situ e in situ. Los resultados de los estudios muestran que las tecnologías obtienen mayor rendimiento de remoción cuando se someten a combinación entre las mismas.

Es importante saber que, aunque el uso de ciertas tecnologías puede generalizarse para cierto grupo de contaminantes, las características de los suelos y las condiciones ambientales las zonas contaminadas son completamente diferentes. Los suelos de Colombia son diferentes a los de países europeos, asiáticos y países como los Estados Unidos. Por lo tanto, es necesario implementar tecnologías que permitan adaptarse a las condiciones de formación, estructura y composición de los suelos a intervenir. Es recomendable en países como Colombia, comenzar con el uso de tecnologías biológicas como la biorremediación, las cuales son en gran parte llevadas a cabo de forma natural por los microorganismos, por atenuación natural y conlleva a generar la recuperación del recurso suelo evitando así su degradación.

En Colombia las empresas consultoras, son contratadas para realizar tratamientos de biorremediación con el objetivo de recuperar y restaurar entornos contaminados, o para controlar el daño ambiental que generan las fábricas, gasolineras y demás actores; la academia, por su parte, contribuye desarrollando investigación, principalmente, en algunas Universidades del país; otro actor es el conjunto de empresas o individuos que, a pesar de su escasa trayectoria y aunque no sean las que implementan la biorremediación, centran sus esfuerzos en patentar productos e innovar en el área. En el plano estatal también hay diversos actores que componen el sector: las corporaciones autónomas regionales, las secretarías de medio ambiente de los departamentos y municipios y el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Estas instituciones son las encargadas de velar por la protección del medio ambiente, producir normas que orienten las acciones de los demás actores y supervisar el correcto desempeño de las empresas en cuanto al impacto ambiental. Ahora bien, afirmar que ha habido una evolución en este campo en su conjunto es difícil, ya que los desarrollos e innovaciones analizados en esta revisión evidencian una baja investigación en el tema. Al reflexionar sobre las posibles razones que expliquen este fenómeno, se puede concluir que hay debilidades específicas técnicas y no técnicas para emplear mayor investigación en el tema para Colombia como el hecho de que muchas veces se carece de personal especializado en biorremediación, falta de mayor presupuesto en la recuperación de los sitios contaminados por parte de las empresas generadoras así como a aquellas que van a realizar el tratamiento y también es necesaria una mayor capacitación para los investigadores universitarios.

Según las investigaciones recientemente la investigación a nivel mundial le está apostando al uso de tecnologías emergentes para el tratamiento de suelos contaminados con HAP como: la remediación electrocinética, la biorremediación mediada por enzima, la fitorremediación multi-proceso y vermiremediación (Kuppusamy et al, 2016, Ekperusi y Aigbodion, 2015). Pero hay que tener en cuenta que las investigaciones existentes sobre la aplicación de estos tratamientos en suelos contaminados con HAP aún son muy limitados

Capítulo 6 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. Según las investigaciones, existen en la naturaleza alta variedad de microorganismos capaces de metabolizar los HAP y durante la última década, una variedad de estos microorganismos se ha aislado y caracterizado por su capacidad de degradación. Por lo que se espera que a largo o mediano plazo dependiendo del peso molecular del contaminante el proceso de biorremediación tenga respuestas más eficientes.
- 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.
- La revisión y el estudio bibliométrico en revistas especializadas evidencia un incremento a nivel mundial e interés de la comunidad científica durante el período 2000–2016 para el tema de biorremediación de HAP con más de 400 publicaciones.
- La revisión y el estudio bibliométrico sobre el tema de biorremediación de HAP muestra una tendencia en fase de crecimiento en invenciones para variadas áreas del conocimiento con más de 200 registros correspondientes a los productos patentados a nivel mundial según la base de datos Derwent innovations Index durante el período 1996 – 2016.
- Según el corpus de búsqueda a febrero de 2016 para la base de datos de Scopus, de los 10 países con más publicaciones, se observa que el mayor interés en la investigación sobre biorremediación de HAP se ha enfocado en China, Estados Unidos y la India; en estos países se ha realizado la mayor parte de las publicaciones en este tema. A su vez también es importante resaltar la investigación desarrollada en los países de América Latina donde Brasil es pionero en investigación sobre el tema.
- Según las tecnologías establecidas se estima que los tratamientos biológicos son ambientalmente más amigables y menos costosos que otros tratamientos. Sin embargo, los tiempos de limpieza pueden prolongarse hasta varios meses dependiendo de la magnitud de la zona contaminada y la concentración de los contaminantes.

- Los tratamientos de remediación fisicoquímicos pueden usarse para tratar sitios con características geológicas difíciles, sus costos no son demasiado elevados y los tiempos de limpieza son de corto a mediano plazo. Pero en la mayoría de los casos se requieren tratamientos posteriores a los suelos.
- Con las tecnologías térmicas es posible disminuir significativamente los tiempos de limpieza y los contaminantes, aunque generalmente son tecnologías exsitu y es necesario excavar el sitio contaminado. Son el grupo de tratamientos más costosos y requieren tratamientos posteriores a los suelos para evitar su degradación
- Para el uso de una tecnología de remediación, es indispensable contar con información del sitio y llevar a cabo su caracterización, así como la del contaminante a tratar. La tecnología puede elegirse con base en sus costos y a la disponibilidad de materiales y equipo para realizar el tratamiento.
- La biorremediación en la mayoría es lo que la gente prefiere, para lo cual es importante es investigar las futuras orientaciones propuestas en esta revisión, así como obtener una mejor comprensión de cómo las comunidades microbianas cooperan. No es práctico para restaurar todas las funciones naturales de los suelos contaminados con HAP y no todos los sitios siempre se pueden recuperar por completo a un estado óptimo, dada la limpieza de las condiciones de fondo.
- En Colombia es escasa la información disponible acerca de tecnologías de remediación utilizadas. Por lo cual puede pensarse que algunas de las razones que han provocado esta escasez de información puede ser que muchas de las tecnologías de remediación se encuentran aún poco desarrolladas en el país; falta de mayor voluntad por parte del gobierno con respecto a la implementación de una mayor normatividad en prácticas adecuadas y límites de limpieza para sitios contaminados con hidrocarburos y también en muchos casos hay desconocimiento de todas las zonas que tienen afectación de suelos contaminados por la industria minera y petroquímica, que conlleve a una mayor inversión y desarrollo tecnológico en la recuperación de suelos contaminados.
- Según las investigaciones a nivel mundial un gran número de tecnologías están todavía en el nivel de prototipo, mientras que otros se han aplicado en la práctica para la limpieza de lugares contaminados con HAP. Sin embargo, aun en muchos lugares no se ha podido resolver el problema de los HAP. Por lo cual se recomiendan opciones comerciales de éxito entre tecnologías fisicoquímicas, térmicas y biológicas seleccionadas. Esto es debido a que cada caso sitio es diferente, y la forma de gestionar requiere una cuidadosa ponderación de todos los factores pertinentes, junto con los límites establecidos por las políticas de remediación en un lugar, el apoyo financiero disponible y la aceptación del público.
- El país tiene como reto fortalecer los grupos de investigación en las universidades, como masa crítica y con rigor científico, para poder interactuar mejor con la industria y las entidades estatales. Es necesario, además, invertir recursos económicos y técnicos para diseñar políticas que garanticen un plan continuo con prioridades definidas y a largo plazo que permitan realizar investigación a profundidad y evitar lo que ocurre actualmente: las agencias gubernamentales

ambientales, la academia y las empresas realizan estudios o resuelven problemas según la financiación que logren captar.

Bibliografía

1998. An analysis of composting as an environmental remediation technology. 3. Office of Solid Waste and Emergency Response.

Acharya, P., Ives, P., 1994. Incineration at Bayou Bounfouca remediation project. *Waste Manag.* 14, 13e26.

Acosta-Ramírez D.S. 2009. Tratamiento Secuencial Bioestimulación/Cultivo con sustrato sólido de suelos contaminados para la remoción de plaguicidas organoclorados. Depto. De Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV. Noviembre 17.

Advanced, BioTech. 2000. Why add microbes? Advanced BioTech, California, USA. http://www.adbio.com/bioremed/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. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego. 302 pp.

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

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

Atagana, H.I., 2004. Co-composting of PAH-contaminated soil with poultry manure. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 163e168.

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.

Atlas, R., Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Ed. Addison Wesley. Madrid.561p.

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

Baker, R.S., Tarmasiewicz, D., Bierschenk, J.M., King, J., Landler, T., Sheppard, D., 2007. Completion of in situ thermal remediation of PAHs, PCP and dioxins at a former wood

treatment facility. In: International Conference on Incineration and Thermal Treatment Technologies, Orlando, Florida, US, pp. 14e18.

Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-occurrence and 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.

Bajwa, R. S., & Yaldram, K. (2013). Bibliometric analysis of biotechnology research in Pakistan. *Scientometrics*, 95, 529–540.

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.

BOLETIN TECNOLOGICO. 2014. Biorremediación de Sitios Contaminados. Superintendencia de Industria y Comercio. Patent Landscape Report. Banco de patentes SIC - ABRIL de 2014.

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.

Brusseu, 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.

Cebon, 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.

CENIT. (29 de julio de 2015). www.cenit-transporte.com. Obtenido de www.cenit-transporte.com: <https://www.cenit-transporte.com/>

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.
- Chen, Y., Zhao, R., Xue, J., Li, J., 2013. Generation and distribution of PAHs in the process of medical waste incineration. *Waste Manag.* 33, 1165-1173.
- Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., Liu, Y. 2016. Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds: a review. *Chem. Eng. J.* 284, 582-598.
- Christofi, N., Ivshina, I., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93, 915e929.
- 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., Cvanarová, M., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Kresinová, Z., Galli, E., Cajthaml, T. 2010. Inoculum carrier and 55 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., Wijffjes, A, H., Bakker.
- 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.
- Di Gennaro, P., Franzetti, A., Bestetti, G., Lasagni, M., Pitea, D., Collina, E., 2008. Slurry phase bioremediation of PAHs in industrial landfill samples at laboratory scale. *Waste Manag.* 28, 1338e1345.
- 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.

Duan, L., Naidu, R., Thavamani, P., Meaklim, J., Megharaj, M. 2013. Managing longterm polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1e15.

Ecopetrol. (6 de enero de 2015). Recuperado el 15 de Julio de 2015, de Ecopetrol: http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/ser-contratista/informacion/fomento-de-trabajo-seguro-limpio-saludable/!ut/p/z0/04_Sj9CPykssy0xPLMnMz0vMAfljo8ziLf0N3d09gq28_Y29TAwcHU1NDL2cLI0MPI30C7IdFQFy5V1_/

Elskens F, Harmsen J (2007) Costs of treatment chains. In: Bortone G, Palumbo L (eds), *Sustainable management of sediment resources: sediment and dredged material treatment*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 185-192

Fernández-Sánchez J.M., Rodríguez-Vázquez R., Ruiz-Aguilar G. & Alvarez P.J.J. 2001. PCB biodegradation in aged contaminated soil: interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *J. of Environ. Sci. and Health, part. A* 36(7),1145-1162.

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.

Fester T, Giebler J, Wick LY, Schlosser D, Kästner M (2014) Plant-microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Curr Opin Biotechnol* 27:168-175

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.

FUNDACION IDEAS PARA LA PAZ. (2013). *EL ELN Y LA INDUSTRIA PETROLERA*: BOGOTA: FUNDACION IDEAS PARA LA PAZ.

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.

Gan, S., Lau, E.V., Ng, H.K. 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater.* 172, 532-549.

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.

Gong, Z., Wang, X., Tu, Y., Wu, J., Sun, Y., Li, P., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from contaminated soils using fatty acid methyl esters. *Chemosphere* 79, 138-143.

- González, P, M.2009. Biorremediación y tratamiento de efluentes. Argentina: El Cid Editor. Apuntes: 4-6.
- Guerin, T.F., 2000. The differential removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from soil during bioremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 7, 19e26.
- Glanzel, W., & Zhou, P. (2011). Publication activity, citation impact and bi-directional links between publications and patents in biotechnology. *Scientometrics*, 86(2), 505–525.
- Gomez-Costa, B. M., Silva-Pedro, E., & Ribeiro-de-Macedo, G. (2013). Scientific collaboration in biotechnology: The case of the northeast region in Brazil. *Scientometrics*, 95(2), 571–592.
- 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.
- Hosseini, M.S., 2006. In Situ Thermal Desorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Lampblack Impacted Soils Using Natural Gas Combustion. PhD thesis. University of California, Los Angeles, UK, pp. 1e144.
- Hutchinson, S.L., M.K. Banks y A.P. Schwab 2001. Phytoremediation af aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403
- 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.

Jeong, S., & Kim, H. G. (2010). Intellectual structure of biomedical informatics reflected in scholarly events. *Scientometrics*, 85(2), 541–551.

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.

Junquera, B., & Mitre, M. (2007). Value of bibliometric analysis for research policy: A case study of Spanish research into innovation and technology management. *Scientometrics*, 71(3), 443–454.

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

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.

Khodadoust, A.P., Bagchi, R., Suidan, M.T., Brenner, R.C., Sellers, N.G., 2000. Removal of PAHs from highly contaminated soils found at prior manufactured gas operations. *J. Hazard. Mater.* 80, 159e174.

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.

Kreiner, I. 2002. Tecnologías para el tratamiento de residuos peligrosos. En: Cortinas, C. y C. Mosler (eds.). *Gestión de residuos peligrosos*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2016d. In situ remediation approaches for the management of contaminated sites: a comprehensive overview. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 236, 1e115.

Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2016e. Ex-Situ remediation technologies for environmental pollutants: a critical perspective. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 236, 117e192.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R. 2016b. Bioaugmentation with novel microbial formula vs. natural attenuation of a long-term mixed contaminated soil: treatability studies in solid-and slurry-phase microcosms. *Water Air Soil Pollut.* 227, 1-15.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y., Naidu, R., Megharaj, M. 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere.* 168, 944-968.

- 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.
- Lemaire, J., Bues, M., Kabeche, T., Hanna, K., Simonnot, M.O., 2013. Oxidant selection to treat an aged PAH contaminated soil by in situ chemical oxidation. *J. Environ. Chem. Eng.* 1, 1261-1268.
- Leonardi, V., Sasek, V., Petruccioli, M., D'Annibale, A., Erbanova, P., Cajthaml, T., 2007. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 60, 165e170.
- Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., Gong, Z., 2008. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J. Hazard. Mater.* 150, 21e26.
- 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.
- Maletic, S., Dalmacija, B., Roncevic, S., Agbaba, J., Petrovic, O., 2009. Degradation kinetics of an aged hydrocarbon-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 202, 149e159.
- Mancera-Lopez, M., Esparza-Garcia, F., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Vazquez, R., Saucedo-Castaneda, G., Barrera-Cortes, J., 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation and bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 61, 151e160.
- 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.
- Ministerio de Defensa Nacional. (2015). Logros de la Política Integral de Seguridad y defensa para la prosperidad. Bogota.
- 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.
- Mousset, E., Oturan, M.A., Van Hullebusch, E.D., Guibaud, G., Esposito, G., 2014. Soil washing/flushing treatments of organic pollutants enhanced by cyclodextrins and integrated treatments: state of the art. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 705-795.
- 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.
- Niqui-Arroyo JL, Cantos M (2013) Is it possible to increase bioavailability but not on PAH level and distribution in soils. *Environ Res* 111:193-198.
- NOTICIAS EL TIEMPO. 25 de julio de 2017. Recuperado el 27 de julio de 2017 de: www.eltiempo.com/economia/sectores/cano-limon-covenas-solo-ha-operado-1-de-cada-2-dias-este-ano-112922).
- 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.
- Ortega-Calvo JJ, Tejeda-Agredano MC, Jimenez-Sanchez C, Congiu E, Sungthong R, Niqui-Arroyo JL, Cantos M (2013) Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation? *J Hazard Mater* 261:733-745.
- OECD (2011). *Biotechnology R&D OECD science, technology and industry scoreboard 2011.* Paris: OECD Publishing.
- 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.
- Picado, A., Nogueira, A., Baeta-Hall, L., Mendonça, E., de Fatima Rodrigues, M., do Ceu Saagua, M., Martins, A., Anselmo, A.M., 2001. Landfarming in a PAHcontaminated soil. *J. Environ. Sci. Health A* 36, 1579e1588.
- Pineda-Flores, G., Mesta, A, M. 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Latinoam Microbiol.* 43(3):143-150.
- Pinelli, D., Fava, F., Nocentini, M., Pasquali, G., 1997. Bioremediation of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by using different aerobic batch bioreactor systems. *Soil Sediment. Contam.* 6, 243e256.
- Pinhassi, J., Hagstrom, A. 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol.* 21:245–256.

- 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.
- Pradhan, S., Paterek, J., Liu, B., Conrad, J., Srivastava, V., 1997. Pilot-scale Bioremediation of PAH-contaminated Soils. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer, Verlag, pp. 759e773.
- 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.
- Restrepo, R. 2002. Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. *ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo*.
- Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. Lewis Publishers. 542 pp.
- Rodríguez-Vázquez R. 2009. Reporte Final del Convenio GPA- 01-2008 PEMEX-CINVESTAV. Biorremediación de 35 000 m3 de suelo contaminado con hidrocarburos (fracción media) ex-traído de la zona No. 3, ubicado en el predio norte de la Ex refinería 18 de marzo.
- Rodríguez-Vázquez R., Roldán-Martín G.A. y Del Río Galván C.P., Patente Mexicana No. Número 291975: "Proceso de biorremediación en cultivo sólido con la adición de granos de café", otorgada el 9 de noviembre de 2011 por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., Ron, E, Z. 1992. Petroleum bioremediation– a multiphase problem. *Biodegradation*. 3:337-350.
- Sanchez, T, J. M.; Palop, F. 2002. Herramientas de software para la práctica en la empresa de la Vigilancia Tecnológica y la Inteligencia Competitiva. Evaluación Comparativa. Valencia: TRIZ XXI.
- 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: w. g t z. o r g . m x / s i t i o s - c o n t a m / a r t i c u l o s / 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.

Semple, K.T., B.J. Reid y T.R. Fermor 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollution* 112: 269-283.

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., Valásková, 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.

Sungthong, R. (2014). Impacts of oomycete mycelia and zoospores in bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).

Tejeda-Agredano MC, Mayer P, Ortega-Calvo JJ. 2014. The effect of humic acids on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons depends on the exposure regime. *Environ Pollut* 184:435-442 Tortella, G, R., Diez, M, C. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit Rev Microbiol*. 31:197–212.

Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R., 2012b. Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. *Biodegradation* 23, 823e835.

Trejo, J. A. V. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología. ISBN 9688175579, 9789688175576.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2001. *Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report*. 10th Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response. <http://www.epa.gov/TIO>.

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.

Usman, M., Faure, P., Ruby, C., Hanna, K., 2012. Application of magnetite-activated persulfate oxidation for the degradation of PAHs in contaminated soils. *Chemosphere* 87, 234e240.

Van Deuren, J., Z. Wang, Z. y J. Ledbetter. 1997. *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*. 3^a Ed. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

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.

Vergnoux A, Malleret L, Asia L, Doumenq P, Theraulaz F .2011. Impact of forest fires

Viglianti, C., Hanna, K., De Brauer, C., Germain, P., 2006. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged-contaminated soil using cyclodextrins: experimental study. *Environ. Pollut.* 140, 427e435. WADEP, 2010. Assessment Levels for Soil, Sediment and

Volke Sepúlveda T. y Velasco Trejo J.A. 2002. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. (México, INE-SEMARNAT) Isbn 968-817-557-9.

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.