



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E
INGENIERÍA**

**Degradación de hidrocarburos aromáticos
policíclicos por un consorcio bacteria-
Pleurotus ostreatus en suelo
contaminado con petróleo**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

ING. AMB. DAVID TIRADO TORRES

DIRECTOR: DR. OTILIO ARTURO ACEVEDO SANDOVAL

CO-DIRECTORA: DRA. MARTHA GAYOSSO CANALES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Dirección
Dean

AAQ-ICBI/1725/2016.

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Comité Revisor asignado al alumno **Ing. Amb. David Tirado Torres**, del **Doctorado en Ciencias Ambientales**, con número de cuenta **281352**, que presenta el manuscrito de tesis titulado **“Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por un consorcio bacteria-*Pleurotus ostreatus* en suelo contaminado con petróleo”**, después de revisar el trabajo antes referido, se ha decidido autorizar la impresión del mismo hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE	Dra. Yolanda Marmolejo Santillán
SECRETARIO	Dra. Martha Gayosso Canales
VOCAL	Dr. Otilio Acevedo Sandoval
SUPLENTE	Dra. Claudia Romo Gómez

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 15 de septiembre del 2016.

Dr. Orando Ávila Torres
Director del ICBI



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
Colonia Carboneras
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIAS

Dedico mi tesis doctoral a **Dios** que siempre ha estado a mi lado en mis exitos y mis fracasos, y cuando he dejado de creer en el siempre ha estado y me ha demostrado su amor incondicional volviendo a poner esta obeja descarriada en el camino de la fe. Gracias Dios padre.

A mi familia en particular a mi madre, Sra. Carmen Torres Ricárdez, que siempre tuvo confianza en mí y aunque hoy ya no está conmigo se que le haría feliz participar con mi regocijo.

A mis hermanos: Hilda Catalina, Ana patricia y Tesel, siempre han estado en mi corazon y un solo consejo, mirada o enojo han servido para que yo tomara buenas decisiones en mi vida.

A mis sobrinos y amigos.

A todas aquellas personas que he tenido la dicha de conocerlas a lo largo de mi vida y formación profesional.

"Cuando yo era niño, mi madre siempre me decia que la felicidad era la clave de la vida. Cuando fuí a la escuela, me preguntaron que quería ser cuando yo fuera grande. Yo respondí 'Feliz'. Me dijeron que yo no entendía la pregunta y yo les respondí, que ustedes no entendian la vida (jonh Lennon)".

AGRADECIMIENTOS

En todo trabajo de investigación la dirección y asesoría son fundamentales para el éxito y repercusión académica, por lo que no puedo dejar de lado mi agradecimiento eterno y profundo para:

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval

Dra. Martha Gayosso Canales

Dra. Claudia Romo Gómez

Dra. Yolanda Marmolejo Santillán

Gracias por su apoyo, consejo y coordinación.

Por otro lado, un individuo no se desarrolla por sí sólo en los diversos ámbitos de la vida profesional y de posgrado. En mi vida tuve la oportunidad de tomar ejemplos valiosos, motivación para ser mejor cada día y aprecio a la investigación para un México mejor. Por lo que vienen a mi mente personalidades como el Dr. Alberto José Gordillo Martínez, el Dr. Porfirio Mandujano Sánchez, Dr. Randy Adams, Dr. Aurelio Hernández Muños, M.C. Rosa María Márquez Haces, M.C. Edith y Esther García Gíl y todos mis maestros del Instituto Tecnológico de Minatitlán. En particular al Dr. Alejandro Barradas Rebolledo, quien jugó un papel muy importante para el logro de mis objetivos profesionales y de investigación. Cabe mencionar que reconozco la labor tan humanitaria para la formación profesional que les caracteriza.

En este agradecimiento es oportuno decir que conté con el valioso apoyo del Dr. Miguel Ángel Mígués Escorcia, Dra. Blanca Rosa Rodríguez pastrana, Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, Dr. Javier Piloni martini y Dr. Victor manuel Martinez Juarez, los cuales incidieron en el logro de mis compromisos académicos y de investigación.

Incluyo en este agradecimiento a mis amigos y compañeros de los que siempre se aprende algo o se cuenta con su apoyo.

Agradezco infinitamente a las dependencias de gobierno como el CONACYT y a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y sus institutos, el de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI) y el de Ciencias Agropecuarias (ICAp), en Pachuca de Soto y Tulancingo de Bravo, respectivamente; por promover programas de posgrado que inciden en el desarrollo local y nacional. Este doctorado en Ciencias Ambientales me proporcionó una visión científica que me permitirá abordar mi vida laboral con entusiasmo y capacidad investigativa para la solución de problemas ambientales y mejoramiento de mi amado país.

Contenido

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
I MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	3
1.1 Composición química del petróleo	3
1.1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	5
1.2 Contaminación del suelo con hidrocarburos	7
1.3 Legislación vigente en México en materia de suelos contaminados con hidrocarburos	8
1.4 Aplicación de tecnologías para remediar suelos contaminados con HAPs	10
1.4.1 Extracción con solventes.....	11
1.4.2 Oxidación química.....	14
1.4.3 Degradación fotocatalítica	16
1.4.4 Remediación electrocinética.....	17
1.4.5 Biorremediación	18
1.4.6 Tecnologías térmicas	25
1.4.7 La biorremediación integrada.....	26
1.5 Metabolismo de HAPs	27
1.6 El papel de los microorganismos en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos	28
1.6.1 Bacterias	29
1.6.2 Hongos.....	31
1.7 Uso de consorcios microbianos para la remediación de HAPs	32
1.7.1 Consorcios nativos	32
1.7.2 Consorcios preparados.....	34
1.8 Técnicas moleculares para identificar los microorganismos del suelo.....	34
1.8.1 Métodos bioquímicos	35
1.8.2 Técnicas basadas en ácidos nucleicos	36
1.8.3 Técnicas que enlazan la identidad microbiana con la función ecológica	42
1.8.4 Microarreglos.....	43
II JUSTIFICACIÓN.....	46
III HIPÓTESIS.....	47

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

IV OBJETIVOS	47
4.1 Objetivo general	47
4.2 Objetivos específicos	47
V METODOLOGÍA.....	48
5.1 Muestreo	48
5.1.1 Toma de muestras	48
5.1.2 Procedimiento de muestreo.....	48
5.1.3 Almacenamiento, transporte y preservación de la muestra	49
5.2 Caracterización fisicoquímica del suelo.....	49
5.2.1 Determinación del pH del suelo	49
5.2.2 Determinación de humedad del suelo.....	49
5.2.3 Determinación de materia orgánica del suelo	49
5.2.4 Determinación de nitrógeno total del suelo.....	50
5.2.5 Determinación de fósforo asimilable del suelo	50
5.2.6 Determinación de las densidades del suelo.....	50
5.2.7 Determinación de la textura del suelo.....	50
5.3 Cuantificación de HAPs en el crudo de petróleo	51
5.3.1 Curva de calibración de HAPs	51
5.4 Selección de la cepa bacteriana para el consorcio	52
5.4.1 Adaptación de los microorganismos degradadores de HAPs	52
5.4.2 Aislamiento de las cepas degradadoras de HAPs	53
5.4.3 Ensayos de emulsificación y degradación.....	54
5.4.4 Inactivación de las cepas bacterianas aisladas	55
5.4.5 Selección de la cepa bacteriana para el consorcio	55
5.5 Determinación de HAPs residuales.....	56
5.6 Identificación taxonómica de las cepas bacterianas	57
5.6.1 Pruebas fenotípicas	57
5.6.2 Pruebas Genotípicas.....	57
5.6.3 Análisis RFLP	58
5.7 Biodegradación de HAPs por <i>P. ostreatus</i> en cultivo líquido.....	59
5.7.1 Preparación del inoculo.....	59
5.7.2 Diseño experimental	59

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

5.7.3 Extracción de HAPs	59
5.8 Formación del consorcio bacteria- <i>P. ostreatus</i>	60
5.8.1 Preparación del cultivo bacteriano	60
5.8.2 Preparación del cultivo fúngico	60
5.8.3 Diseño experimental del consorcio bacteria- <i>P. ostreatus</i>	60
5.9 Análisis estadísticos.....	61
VI RESULTADOS	63
6.1 Caracterización fisicoquímica del suelo	63
6.2 Curva de calibración	63
6.3 Caracterización de HAPs en el crudo de petróleo	64
6.4 Selección de la cepa bacteriana	65
6.4.1 Caracterización fenotípica y ensayos de emulsificación y degradación de las cepas bacterianas	65
6.4.2 Identificación filogenética	66
6.4.3 Degradación de HAPs totales en el experimento de microcosmos	66
6.4.4 Degradación de cada HAP	68
6.5 Degradación de HAPs por <i>P. ostreatus</i> en medio líquido.....	70
6.6 Formación del consorcio bacteria- <i>P. ostreatus</i>	72
VII DISCUSIÓN	75
7.1 Degradación bacteriana de HAPs en microcosmos	75
7.2 Degradación de HAPs por <i>P. ostreatus</i> en medio líquido.....	77
7.3 Degradación de HAPs por el consorcio, en microcosmos	78
VIII CONCLUSIONES.....	82
XIX RECOMENDACIONES	83
Bibliografía.....	84
ANEXOS.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los componentes que predominan en el crudo de petróleo.....	3
Figura 2. Estructura molecular de HAPs más estudiados.	6
Figura 3. Rutas generalizadas para el metabolismo de HAPs por bacterias y hongos.	28
Figura 4. Triángulo de textura del sistema de clasificación de la USDA.	50
Figura 5. Estructuras químicas de los HAPs analizados en este estudio.	51
Figura 6. Proceso de aislamiento de los microorganismos.....	54
Figura 7. Separación de HAPs por HPLC-DAD/FLD.....	64
Figura 8. Parámetros visuales utilizados para medir el test de (a) emulsificación y (b) degradación.....	66
Figura 9. Árbol filogenético de las cepas SEB-02, SEB-08 y SA-04 (la barra de escala representa 0.05 secuencia de divergencia, los números de accesoión de las secuencias de ARNr se muestran en los paréntesis).	67
Figura 10. Degradación de diferentes concentraciones de HAPs por las cepas seleccionadas después de 80 días a 30°C.	67
Figura 11. Cinética de degradación de HAPs en suelo bajo diferentes tratamientos después de 110 días del proceso de biorremediación. Cada punto representa el valor medio de muestras por triplicado.	73
Figura 12. Cinética de degradación de HAPs en suelo bajo diferentes tratamientos después de 110 días de incubación. Cada punto representa el valor medio de muestras por triplicado.	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs.....	5
Cuadro 2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012).	10
Cuadro 3. Clasificación de las tecnologías de remediación de suelos contaminados con HAPs.	11
Cuadro 4. Estrategias de biorremediación que han usado consorcios microbianos.	24
Cuadro 5. Condiciones de corrida para la separación de HAPs por HPLC.	52
Cuadro 6. Composición del medio mineral enriquecido.	53
Cuadro 7. Tratamientos para evaluar la degradación bacteriana de HAPs en microcosmos.....	56
Cuadro 8. Tratamientos para evaluar la degradación de HAPs por el consorcio bacteria- <i>P. ostreatus</i>	61
Cuadro 9. Propiedades fisicoquímicas del suelo usado en microcosmos.....	63
Cuadro 10. Tiempo de retención de cada HAP, ecuación de la recta de regresión y valor de R ²	63
Cuadro 11. Concentración de HAPs en el crudo de petróleo.	64
Cuadro 12. Caracterización fenotípica de las bacterias aisladas, y ensayos de emulsificación y degradación del crudo de petróleo.	65
Cuadro 13. Degradación de cada HAP por las bacterias seleccionadas después de 80 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 13.1mg/kg.....	69
Cuadro 14. Degradación de cada HAP por las bacterias seleccionadas después de 80 días, cuando la concentración de total de HAPs fue de 24.25 mg /kg.....	69
Cuadro 15. Degradación de cada HAP por las bacterias seleccionadas después de 80 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 47.49 mg/kg.....	70
Cuadro 16. Degradación y bioacumulación de cada HAP por <i>P. ostreatus</i> después de 15 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 25.994 mg/l.....	70
Cuadro 17. Degradación y bioacumulación de cada HAP por <i>P. ostreatus</i> después de 15 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 49.006 mg/l.....	71
Cuadro 18. Degradación y bioacumulación de HAPs a una concentración de 80.051 mg/l.	72
Cuadro 19. Degradación de cada HAP por <i>O. intermedium</i> , <i>P. ostreatus</i> y el consorcio de ambos después de 110 días, a una concentración de HAPs de 138.35 mg/kg.	72

Cuadro 20. Concentración de HAPs en el suelo contaminado y degradación de los mismos bajo diferentes tratamientos después de 110 días de incubación.	73
Cuadro 22. Prueba de Tukey $P > 0.05$	119
Cuadro 23. Prueba de Tukey $P > 0.05$ entre tratamientos.	120

Listado de acrónimos

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AE:	Agar enriquecido
APM:	Alto peso molecular
ARDRA:	Amplificación ribosomal de ADN y análisis de restricción
ARN:	Ácido ribonucleico
βCD:	β-ciclodextrina
BTEX:	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
BPM:	Bajo peso molecular
COT:	Contenido Orgánico Total
CTAB:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DGGE:	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EFS:	Extracción con fluidos supercríticos
EPA:	Environmental Protection Agency
FID:	Detector de ionización en flama
HAP:	Hidrocarburo aromático policíclico
HAPs:	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPB:	Hongos de la pudrición blanca
HPCD:	Hidroxipropil-β-ciclodextrina
HPLC:	Cromatografía líquida de alta Resolución
HTPs:	Hidrocarburos Totales del Petróleo
LGEEPA:	Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente
MCD:	Metil-β- ciclodextrina
MME:	Medio Mineral Enriquecido
NCBI:	National Center for Biotechnology
NMX:	Norma Mexicana
NOM:	Norma Oficial Mexicana
PFLs:	Perfiles de fosfolípidos
pH:	Potencial de hidrógeno
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA:	Agar papa dextrosa
RISA:	Análisis del espacio intergénico ribosomal
RSGP:	Sondas de genoma reverso
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SEMARNAT:	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SIP:	Sondeo de isótopos estables

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

TE:	Trix-EDTA
TGGE:	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
T-RFLP:	Terminal de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
UFC:	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultravioleta

Nomenclatura

C	Carbono
°C	Grados Celsius
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CH ₄	Metano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Dióxido de carbono
CuSO ₄	Sulfato de cobre
FeCl ₃	Cloruro de hierro (III)
g	Gramos
H	Hidrógeno
HCl	Cloruro de hidrógeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
K ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de potasio
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
mg/kg	Miligramos por kilogramo
mg/l	Miligramos por litro
M	Molar
mM	Milimolar
MnSO ₄ ·H ₂ O	Sulfato de manganeso monohidratado
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio
NO _x	Óxidos de nitrógeno
O	Oxígeno
O ₃	Ozono
·OH	Radical hidroxilo
P	Fósforo
S	Azufre
SO _x	Óxidos de azufre
TiO ₂	Dióxido de titanio
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos recalcitrantes, tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos. Cuyos efectos sobre la flora y fauna resultan en la absorción y acumulación de tóxicos en las cadenas alimentarias y, en algunos casos, en graves problemas de salud y defectos genéticos en los seres humanos. Los HAPs liberados al medio ambiente pueden ser eliminados por volatilización, foto-oxidación, oxidación química, bioacumulación y biodegradación. Cómo el uso de consorcios microbianos es una estrategia promisoría para la biodegradación de HAPs, en este estudio se seleccionó una cepa bacteriana aislada de un sitio contaminado con petróleo, para formar un consorcio y se determinó el potencial de biodegradación de HAPs por dicho consorcio. La capacidad de biodegradación de HAPs de los aislados bacterianos fue evaluada a tres concentraciones de petróleo, equivalentes a 13.1, 24.15 y 49.47 mg de HAPs/kg de suelo, después de 80 días de incubación, en microcosmos. De las cuatro cepas que mostraron mayor biodegradación de HAPs se hizo la secuenciación del fragmento 16S ADNr. Por otra parte, se evaluó la degradación de HAPs por *P. ostreatus* en cultivo líquido a tres concentraciones de HAPs (25.99, 49.01 y 80.05 mg/l) después de 15 días de incubación. Finalmente, se determinó la degradación de HAPs por el consorcio bacteria - *P. ostreatus* a 138.35 y 268.23 mg/kg de HAPs después de 50, 80 y 110 días. Tres de las cuatro cepas estudiadas fueron identificadas y su secuencia fue enviada a la base de datos del NCBI cuyos números de acceso son: *Ochrobactrum intermedium* (KU551925), *Pandoraea pnomenusa* (KU551926) y *Ochrobactrum* sp. (KU551924). La mayor degradación a 13.1 mg/kg fue por la cepa SA2-09 (82.7%), mientras que a concentraciones de 24.5 y 47.49 mg/kg, *O. intermedium* presentó los mayores porcentajes de degradación, 69.8 y 80.9%, respectivamente. Las cuatro cepas fueron capaces de degradar HAPs del petróleo en el suelo contaminado. *P. ostreatus* obtuvo porcentajes de degradación de 85.8, 91.8 y 98.2% a concentraciones de 25.99, 49.01 y 80.05 mg/l de HAPs, respectivamente. El consorcio *O. intermedium*-*P. ostreatus* degradó 86.69 y 75.47% de 138.35 y 268.23 mg/kg, respectivamente; mientras que *P. ostreatus* degradó 83.3 y 68.29% y *O. intermedium* 72.04 y 69.91%, respectivamente. El consorcio bacteria-hongo presentó mayor capacidad para degradar HAPs que *O. intermedium* y *P. ostreatus* y puede considerarse como una alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are recalcitrant, toxic, carcinogenic and mutagenic compounds. Whose effects on flora and fauna cause absorption and accumulation of these toxics in food chains and, in some cases cause severe health problems and genetic diseases in human. PAHs released to the environment could be eliminated through volatilization, photo-oxidation, chemical oxidation, biodegradation and bioaccumulation. How the use of microbial consortia is a promising strategy for biodegradation of PAHs, in this study, a bacterial strain was selected for forming a consortium and it was determined its degradation PAHs potential. The ability to degrade PAHs from bacterial isolates was evaluated at three concentrations of oil, equal to 13.01, 24.15 and 49.47 mg of PAHs/kg soil, after 80 days of incubation in soil microcosm. From four the strains that showed highest PAHs degradation was made sequencing of 16S rDNA fragment. On the other hand, PAHs degradation by *P. ostreatus* in liquid culture at three concentrations of PAHs (25.99, 49.01 and 80.05 mg/l) after 15 days of incubation was evaluated. Finally, PAHs degradation by the consortium bacteria - *P. ostreatus* at 138.35 and 268.23 mg/kg of PAHs after 50, 80 and 110 days, was determined. Three of the four strains studied, were identified and their sequences was submitted to the NCBI database whose accession numbers are: *Ochrobactrum intermedium* (**KU551925**), *Pandoraea pnomenusa* (**KU551926**) and *Ochrobactrum* sp. (**KU551924**). The highest degradation at 13.1 mg/kg was the SA2-09 (82.7%) strain, and at concentrations of 24.5 and 47.49 mg/kg, *O. intermedium* showed the highest percentages of degradation, 69.8 and 80.9%, respectively. The four strains were able to degrade PAHs of petroleum in contaminated soil. *P. ostreatus* obtained degradation percentages of 85.8, 91.8 and 98.2% at concentrations of 25.99, 49.01 and 80.05 mg/l PAHs, respectively. The consortium *O. intermedium*- *P. ostreatus* degraded 86.69 and 75.47% of 138.35 and 268.23 mg/kg, respectively, while *P. ostreatus* presented a degradation of 83.3 and 68.29% and *O. intermedium* of 72.04 and 69.91%, respectively. The bacterium-fungus consortium has a higher ability to degrade PAHs that *O. intermedium* and *P. ostreatus* and, can be considered as an alternative for bioremediation of soil contaminated with hydrocarbons.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo con hidrocarburos de petróleo tiene un alto impacto ambiental, los derrames de crudo de petróleo causan serios problemas al medio ambiente. A pesar de que la explotación de este combustible fósil es una actividad económica vital y genera beneficios para la sociedad, los derrames ocasionados por el transporte inadecuado y la transformación del petróleo generan daños al ambiente (Jain et al., 2011). Entre los cientos de hidrocarburos que componen el petróleo, se encuentran los HAPs, que son de los más persistentes, éstos se generan durante los procesos de refinación y combustión del petróleo (Lors et al., 2012).

Los HAPs están catalogados por la Environmental Protection Agency (EPA) como compuestos altamente tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos para el ser humano (Wang & Tam, 2011). Su insolubilidad en agua es directamente proporcional al incremento de su peso molecular. Debido a su recalcitrancia permanecen un periodo largo de tiempo en el ambiente. Su poca solubilidad en agua hace que no se encuentren en altas concentraciones en ésta, concentrándose en suelo y aire (Juhasz & Ravendra, 2000). Los HAPs de 4 a 6 anillos (APM) son más difíciles de metabolizar en condiciones naturales, mientras que los de 2 y 3 (BPM) son menos recalcitrantes (Cui et al., 2014; Tam et al., 2003).

Aunque existen diversas tecnologías para la eliminación de HAPs, éstas tienen ciertas limitaciones; los métodos fisicoquímicos y térmicos remueven, alteran o aíslan el contaminante. A pesar de que los métodos térmicos son muy eficaces para eliminar HAPs del suelo, generan cenizas y tóxicos que son expulsados a la atmósfera sino se hace un lavado y purificación de gases; y el suelo queda como un residuo inerte. Además el alto costo y consumo de energía hacen a esta tecnología inaplicable en países subdesarrollados (Haritash & Kaushik, 2009).

Contrario a esto, la biorremediación es un proceso económico y amigable con el ambiente, al transformar los compuestos tóxicos en compuestos no peligrosos o menos peligrosos (Shi et al., 2010). Es viable para remover los hidrocarburos del ambiente y según del tipo de hidrocarburo a tratar, la remediación se logra en días o meses (Lisiecki et al., 2014). En la biorremediación, los microorganismos juegan un papel muy importante, se ha comprobado que las cepas puras o consorcios bacterianos degradan HAPs,

usándolos como fuente de carbono (Wolicka et al., 2009); la biodegradación se logra con hongos en cultivo puro o en consorcio con bacterias (Zhang et al., 2010). En procesos aerobios, la biotransformación de los contaminantes generalmente termina en la mineralización, con la producción de H₂O y CO₂; mientras que en procesos anaerobios se obtiene CH₄ y la biotransformación de los HAPs de alto peso molecular (APM) en metabolitos secundarios (Gan et al., 2009).

Para lograr la biorremediación a velocidades de remoción efectivas se deben tomar en cuenta las condiciones ambientales, el tipo de microorganismo y la estructura química del compuesto a degradar (Lors et al., 2012). La aplicación de consorcios microbianos nativos o exógenos en la descontaminación de suelos con HAPs es exitosa gracias al aumento de masa microbiana con la consecuente eficiencia de remoción del contaminante (Wu et al., 2013). Por lo antes mencionado en este estudio se evaluó el consorcio *O. intermedium*-*P. ostreatus* como una alternativa de biorremediación con potencial para degradar HAPs de crudo de petróleo en microcosmos de suelo.

I MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1 Composición química del petróleo

El crudo de petróleo es un líquido negro y viscoso, producto de la descomposición de la materia orgánica por medio de procesos anaeróbicos, a alta presión y temperatura, durante largos periodos de tiempo. Actualmente es uno de los contaminantes ambientales de mayor preocupación debido a su alto consumo y su persistencia en las distintas matrices ambientales (Head et al., 2006). En realidad el crudo es una mezcla altamente compleja de compuestos, en la que predominan los hidrocarburos, que tienen una amplia gama de estructuras moleculares (Fig. 1), entre las que se encuentran cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos. Las cadenas y anillos pueden presentarse tanto saturados como insaturados (Torres-Delgado & Zuluaga-Montoya, 2009). La composición elemental de un crudo es: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S, y de 0-4% de O y N, además de metales como el níquel y el vanadio (Howe-Grant, 1996).

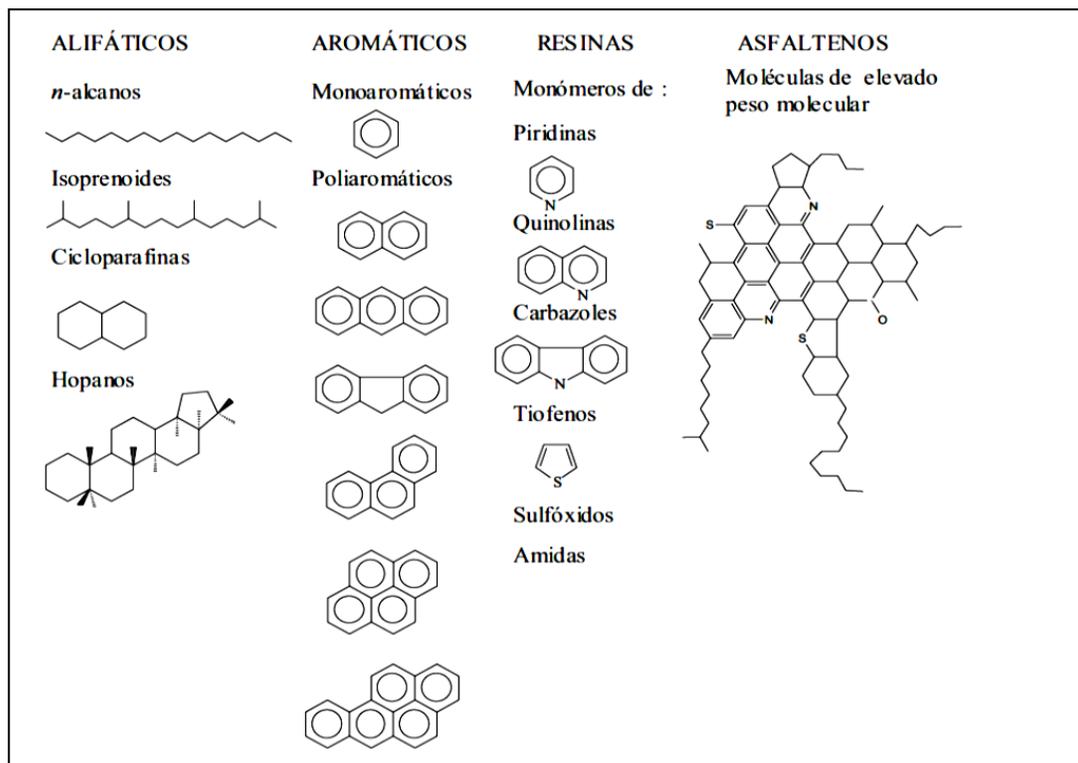


Figura 1. Estructuras químicas de los componentes que predominan en el crudo de petróleo (Torres-Delgado & Zuluaga-Montoya, 2009).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Los hidrocarburos son extraídos de las formaciones geológicas en estado líquido y gaseoso; al estado líquido se les conoce como petróleo mientras que al estado gaseoso se les denomina gas natural. Estos compuestos tienen gran importancia en la economía debido a que son los principales combustibles en uso, así como gran parte de la materia prima para todo tipo de plásticos y lubricantes, entre otros. Ortiz (2007), clasifica a los hidrocarburos de la siguiente forma:

- ❖ Hidrocarburos alifáticos
 - Saturados (parafinas-alcanos): No tienen enlaces dobles, triples, ni aromáticos. Involucran a los cicloalcanos, hopanos e isoprenoides (fitano y pristano).
 - Insaturados: Tienen uno o más enlaces dobles (alquenos u olefinas) o triples (alquinos o acetilénicos) entre sus átomos de carbono.
- ❖ Hidrocarburos cíclicos
 - Nafténicos: Tienen cadenas cerradas de 3, 4, 5, 6, 7 y 8 átomos de carbono saturados o no saturados (terpenoides y esteranos).
 - Aromáticos: Poseen al menos un anillo aromático además de otros tipos de enlaces (monoaromáticos, diaromáticos y poliaromáticos).

Otra forma de clasificar a los hidrocarburos para un estudio más detallado es agruparlos en las siguientes familias (Morrison & Boyd, 1998):

- ❖ Parafinas volátiles. Son n–alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C1 a C10, es la fracción más volátil del crudo y la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. El gas natural contiene principalmente a las parafinas volátiles de C1 a C5. Los isoprenoides volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano.
- ❖ Parafinas no volátiles. Son n–alcanos e isoprenoides entre C11 y C40. Los isoprenoides varían de C12 a C22 y constituyen entre 1-2% del crudo, llegando a 15% en crudos degradados. Los componentes entre C11 y C15 son de volatilidad intermedia.
- ❖ Naftenos. Están compuestos por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los ciclopentanos alquilados son los más abundantes en este grupo y representan hasta un 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos comprenden del 50 y 55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos.

- ❖ Oleofinas. Son alquenos se encuentran en concentraciones traza en el crudo de petróleo, pero son importantes en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de cracking, constituyendo hasta 30% de las gasolinas y hasta 1% en combustibles.
- ❖ Aromáticos. El crudo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos, compuesta por moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así se encuentran los hidrocarburos aromáticos monocíclicos (un anillo bencénico) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (dos o más anillos bencénicos).
 - ✓ Hidrocarburos aromáticos monocíclicos. Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad.
 - ✓ Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos).

1.1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los HAPs son compuestos aromáticos con dos o más anillos de benceno condensados, se forman durante la descomposición térmica de moléculas orgánicas y su posterior recombinación. La combustión incompleta a alta temperatura (500 a 800°C) o la unión de material orgánico a baja temperatura (100 a 300°C) durante períodos largos los produce (Clar, 1964). Éstos compuestos son incoloros, blancos o amarillo pálido con bajas solubilidades en agua, tienen alto punto de ebullición, puntos de fusión y presión de vapor bajos (Cuadro 1). Al aumentar el peso molecular su solubilidad en agua y la presión de vapor disminuyen, mientras que los puntos de fusión y de ebullición aumentan, también aumenta su persistencia (Patnaik, 1999).

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs (Clar, 1964).

HAP	F.M.	P. Ebullición (°C)	P. Fusión (°C)	P.V. (Pa a 25°C)	Solubilidad acuosa (mg/l)
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	218	80.2	11	30
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	340	100.5	2 x 10 ⁻²	1-2
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	342	216.4	1 x 10 ⁻³	0.015
Fluorantreno	C ₁₆ H ₁₀	375	108.8	1.2 x 10 ⁻³	0.25
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	150.4	393	6.0 x 10 ⁻⁴	0.12-0.18
Benzo (k) fluorantreno	C ₂₀ H ₁₂	480	215.7	5.2 x 10 ⁻⁸	---
Benzo (b) fluorantreno	C ₂₀ H ₁₂	481	168.3	6.7 x 10 ⁻⁵	---
Benzo (e) pireno	C ₂₀ H ₁₂	493	178.7	4 x 10 ⁻⁷	---
Benzo (ghi) perileno	C ₂₂ H ₁₂	500	277	6 x 10 ⁻⁸	---

Las estructuras químicas de algunos HAPs se dan en la Figura 2, se dividen en dos clases: los de bajo peso molecular (BPM), están formados por 2 a 3 anillos aromáticos como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno entre otros, y los de alto peso molecular (APM) tienen de 4 a 7 anillos aromáticos como el criseno y el pireno, entre otros (Howsan & Jones, 1998). Las fuentes de HAPs son naturales y antropogénicas; las naturales son los incendios en bosques y pastizales (en ocasiones provocados por el ser humano), las erupciones volcánicas y los exudados de árboles. Las antropogénicas incluyen la quema de combustibles fósiles, alquitrán de hulla, madera, aceite usado y los filtros de aceite (Kaushik & Haritash, 2006), así como la incineración de residuos sólidos urbanos, los derrames de petróleo y la descarga de lubricantes automotrices derivados del petróleo (IARC, 1983).

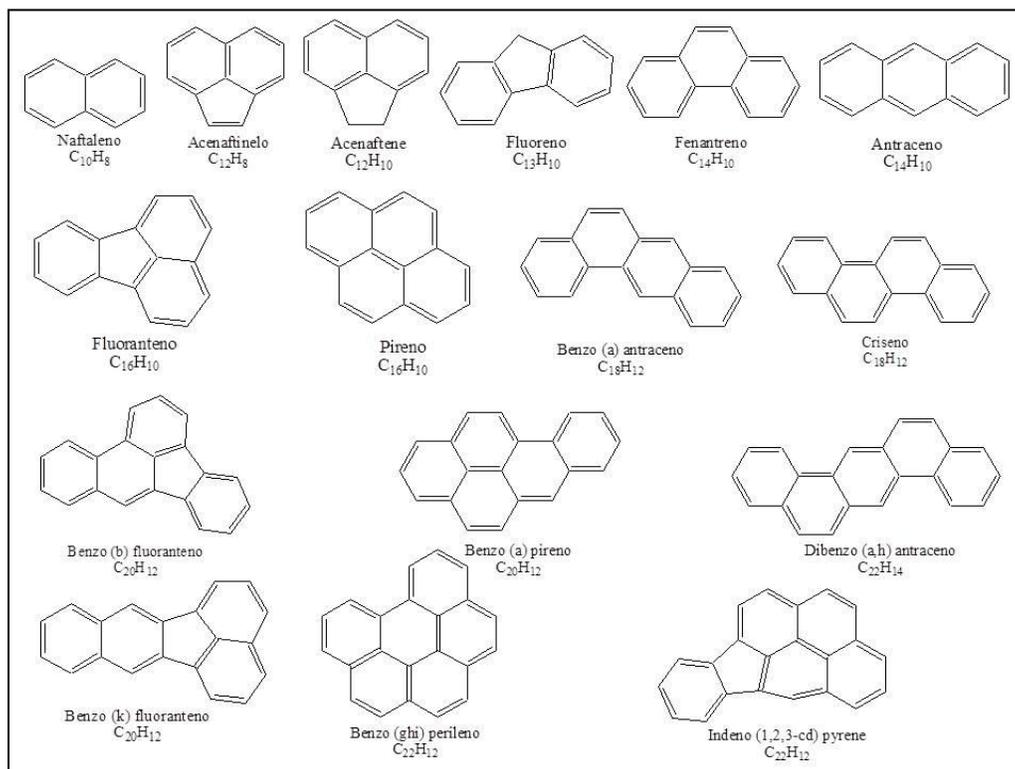


Figura 2. Estructura molecular de HAPs más estudiados (Tirado-Torres et al., 2015).

Los HAPs fueron los primeros carcinógenos ambientales reconocidos, no se degradan fácilmente en condiciones naturales (Cerniglia, 1992). Son un asunto de gran preocupación debido a su presencia en todos los componentes del medio ambiente, resistencia a la biodegradación y a su potencial de bioacumulación (Jacobo et al., 1986). A pesar de que son los principales contaminantes del aire (Haritash & Kaushik, 2011), el

suelo actúa como depositario final de éstos. Su destino en el ambiente incluye la volatilización, foto-oxidación, oxidación química, adsorción sobre las partículas del suelo, la lixiviación y la degradación microbiana (Wild & Jones, 1995). Los HAPs tienden a adsorberse en las superficies de partículas constituidas por materia orgánica del suelo, lo que dificulta su eliminación haciendo que estos compuestos, recalcitrantes en condiciones naturales (Singleton et al., 2006).

1.2 Contaminación del suelo con hidrocarburos

El suelo es un medio complejo, de composición variable, al que afectan fenómenos físicos, químicos, biológicos y climáticos; además de la acción del hombre a través de la contaminación (Agudo, 2010). Está constituido por tres fases: la fase sólida, compuesta a su vez por la fracción mineral y orgánica, la fase líquida y la fase gaseosa. En promedio la materia orgánica constituye un 5% del suelo, el agua 25%, el aire 25% mientras que la fracción mineral representa un porcentaje del 45% (Bardgett, 2005). La contaminación del suelo es una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de su productividad y como consecuencia aumenta la acumulación de sustancias tóxicas a concentraciones que superan su poder de amortiguamiento natural y que modifican negativamente sus propiedades.

Generalmente esta acumulación es consecuencia de actividades humanas (exógena), aunque también se puede producir de forma natural o endógena (Ortiz et al., 2007). Esto cambia las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo con efectos momentáneos o duraderos según del tipo de hidrocarburo y del tiempo de contacto con el contaminante. Esto retarda o impide el crecimiento de la vegetación y por ende de vida en el lugar afectado (Ruiz-Fernández et al., 2016). La explotación y derrames de petróleo y sus derivados han provocado a nivel mundial daños al suelo de proporciones incalculables, no sólo por la contaminación del medio ambiente sino por la toxicidad de los hidrocarburos para los seres vivos (Oleszczuk et al., 2014).

Cuando el suelo ha sido alterado con hidrocarburos de petróleo, el proceso de remediación es afectado por diversos factores e invariablemente, sus características influyen en la biodisponibilidad del contaminante (Kusmierz et al., 2016). Los espacios intersticiales entre las partículas que conforman el suelo ocasionan con frecuencia el enclaustramiento de compuestos no solubles, y así limitar el área de contacto entre el microorganismo degradador y el contaminante (Melnyk et al., 2015). La falta de contacto

entre los hidrocarburos y los microorganismos degradadores, los incapacita para realizar el proceso de biodegradación.

Para comprender los procesos que influyen en la biodisponibilidad, es esencial entender las interacciones que se presentan entre la matriz del suelo, el contaminante y los microorganismos. Estas interacciones dependen del tipo y estado fisicoquímico del agente xenobiótico, del tipo y estado fisicoquímico del suelo, del tipo de microorganismos y de factores externos tales como la temperatura y la presencia de nutrientes y oxígeno (Volkering et al., 1998). Así, las diferentes formas físicas en que se pueden encontrar los contaminantes orgánicos en el suelo son: I) partículas sólidas; II) película líquida; III) adsorbido sobre el suelo; IV) absorbido en el interior del suelo; V) en macro poros del suelo; VI) en micro poros del suelo (Volkering et al., 1998).

1.3 Legislación vigente en México en materia de suelos contaminados con hidrocarburos

En la industria petrolera, el manejo continuo de hidrocarburos y combustibles conlleva a la modificación del ambiente cuando ocurren fugas en los tanques, oleoductos y diversas instalaciones. Esto ocasiona migración del contaminante al suelo, al subsuelo y al agua subterránea, mientras que los componentes volátiles se integran a la atmósfera, lo que provoca un gran impacto negativo en materia ambiental. Debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo, que se manejan, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los petroquímicos básicos, además de lo difícil que resulta monitorear la infraestructura petrolera, integrada por:

- Pozos de explotación.
- Baterías de separación.
- Complejos procesadores de gas.
- Centrales de almacenamiento y bombeo.
- Redes de ductos y piletas para el confinamiento de desechos sólidos y líquidos procedentes de la perforación y mantenimiento de los pozos.
- Transporte y distribución en general.
- Estaciones de servicio de combustible, entre otras.

Estas instalaciones poseen riesgos inherentes de fugas de petróleo, diesel y gasolina por roturas de los ductos, por filtración de aguas aceitosas, por daños en las estructuras de almacenamiento y transporte, y por malas prácticas, entre otras, lo cual genera un riesgo a la ecología del ambiente (Laherrere, 2013).

México es uno de los países más importantes en cuanto a la extracción de petróleo, a causa de esto se tiene un gran número de sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo. En los últimos años las instituciones gubernamentales y privadas han puesto interés en la remediación de estos sitios que se han convertido en pasivos ambientales. Es importante tener el conocimiento del tipo de contaminación, así como su concentración para establecer las condiciones de remediación del sitio, el riesgo que representa y la selección de tecnologías apropiadas para la recuperación (Arce et al., 2004). Los límites de limpieza para hidrocarburos en suelos y aguas dependen de los criterios o normas vigentes en México.

La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA, 2012) establece los siguientes aspectos para atender la contaminación del suelo en los siguientes artículos:

Art. 134. Establece los criterios para la prevención y control de la contaminación; párrafo I. Corresponde al estado y a la sociedad prevenir la contaminación del suelo. II. Deben controlarse los residuos en tanto que constituyen la principal fuente de contaminación del suelo; IV. En los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos deberán llevarse a cabo acciones necesarias para recuperar o restablecer sus condiciones, de tal manera que puedan ser utilizados en cualquier tipo de actividad prevista por el programa o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable.

Art. 136. Los residuos que se acumulen o puedan acumularse y se depositen o infiltren en los suelos deberán reunir las condiciones necesarias para prevenir o evitar: I. Contaminación del suelo, II Las alteraciones nocivas en el proceso biológico de los suelos; III. Las alteraciones en el suelo que perjudiquen su aprovechamiento, uso o explotación y; IV. Riesgos y problemas de salud.

Art. 139. Toda descarga, depósito o infiltración de sustancias o materiales contaminantes en los suelos se sujetará a lo que disponga esta ley, la ley de Aguas Nacionales, sus disposiciones reglamentarias y las Normas Oficiales Mexicanas.

Art. 140. La generación, manejo y disposición final de los residuos de lenta degradación deberá sujetarse a lo que establezcan las Normas Oficiales Mexicanas que al respecto expida la Secretaría, en coordinación con la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

El Programa Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2001-2006, tiene como primer objetivo detener y revertir la contaminación de los recursos naturales, agua, aire y suelo, con el propósito de garantizar su conservación para las generaciones futuras.

La Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos específicos (Cuadro 2) en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

Cuadro 2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012).

Hidrocarburos Específicos	Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)			Método analítico
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial	
Benceno	6	6	15	
Tolueno	40	40	100	NMX-AA-141-SCFI-2007
Etilbenceno	10	10	25	
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100	
Benzo[a]pireno	2	2	10	
Dibenzo[a,h]antraceno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Benzo[a]antraceno	2	2	10	
Benzo[b]fluorantreno	2	2	10	
Benzo[k]fluorantreno	8	8	80	
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2	2	10	

Ante la situación descrita, el 20 de agosto de 2002 se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, la Norma Oficial Mexicana de Emergencia: Límites máximos permisibles de contaminación en suelos por hidrocarburos, caracterización del sitio y procedimientos para la remediación, la cual fue prorrogada por seis meses más, el 20 de febrero de 2003. Con el propósito de dar certidumbre en las acciones de caracterización y remediación a los causantes de la contaminación.

1.4 Aplicación de tecnologías para remediar suelos contaminados con HAPs

Las tecnologías más ampliamente aplicadas para el proceso de degradación de HAPs, son: la extracción con solventes, oxidación química, biorremediación y otras emergentes, tales como la remediación electrocinética. En el cuadro 3, se recopila información sobre

los distintos tipos de tecnologías aplicadas para realizar una remediación de suelos contaminados con HAPs.

Cuadro 3. Clasificación de las tecnologías de remediación de suelos contaminados con HAPs.

Clasificación	Tecnologías
Fisicoquímica	La extracción con solventes (agua y solventes orgánicos, agentes tensioactivos, ciclodextrinas, aceite vegetal), la extracción de fluido supercrítico, la extracción de fluido subcrítico
Biológica	Biorremediación tanto <i>in situ</i> como <i>ex situ</i> , compostaje, tratamiento aeróbico y anaeróbico, fitorremediación, entre otras.
Química	La oxidación química con diversos oxidantes (reactivo, ozono, KMnO_4 , H_2O_2 , persulfato de sodio activado de Fenton), degradación fotocatalítica y remediación electrocinética
Térmica	La incineración, desorción térmica, extracción de vapores del suelo térmicamente mejorada

1.4.1 Extracción con solventes

En la tecnología de extracción con solventes, los HAPs se extraen del suelo con un solvente o mezclas de solventes. Las dos etapas involucradas en la extracción de un compuesto a partir de una matriz sólida son; desorción del sitio de unión en la matriz sólida, seguido de la elución del analito en el líquido de extracción (Kubátová et al., 2002). Típicamente, mezclas de agua y co-solventes o agentes tensioactivos se utilizan para extraer o lavar HAPs de suelos contaminados. Los avances en este campo incluyen el uso de agentes de extracción no tóxicos y biodegradables tales como ciclodextrinas y aceite vegetal, así como el uso de fluidos supercríticos y subcríticos. Las técnicas de lavado de suelos se muestran a continuación:

Lavado del suelo con agua y solventes orgánicos: Agua y diversos solventes así como mezclas de solventes han sido probados a escala de laboratorio en agitadores rotatorios para eliminar los 19 HAPs del suelo contaminado (Khodadoust et al., 2000). La relación de extracción utilizada entre suelo-solvente ha sido de 1 g por 100 ml y un tiempo de extracción de 24 h, esto ha dado eficiencias de extracciones similares para los solventes utilizados tales como el etanol, 2-propanol, acetona y 1-pentanol. También se han probado mezclas ternarias de agua, 1-pentanol y etanol o 2-propanol en proporciones de volumen de 1-pentanol de 5 a 25% y de etanol o 2-propanol de 5 a 30%. Con la mezcla ternaria de 5:10:85 de 1-pentanol: etanol: agua se han logrado extraer más del 95% de HAPs en un proceso a contracorriente de lavado con solventes, de tres etapas con un tiempo de contacto de 1 h por etapa (Silva et al., 2005).

Lavado de suelos asistido con surfactantes: Los tensoactivos se usan como aditivos para contrarrestar la baja solubilidad acuosa de los HAPs y mejorar la eficiencia de lavado de suelos al utilizar agua como solvente. Estas moléculas anfipáticas tienen dos componentes principales, la cola insoluble (hidrófobo) y el grupo hidrófilo o soluble. Los tensoactivos pueden clasificarse como catiónicos, aniónicos o tensoactivos no iónicos. Ellos mejoran la solubilidad de los HAPs en agua mediante la formación de los núcleos hidrófobos de las micelas (Li & Chen, 2002). La presencia de micelas del tensoactivo también disminuye la superficie y tensiones interfaciales (Mulligan et al., 2001).

Ahn et al. (2008), investigaron la eficacia del lavado con cuatro tensoactivos no iónicos Tween 40, Tween 80, Brij 30 y Brij 35, en un suelo contaminado con fenantreno. El tensoactivo Brij 30 tuvo una eficiencia de lavado de 84.1% de eliminación de fenantreno a una concentración del tensoactivo de 2 g/l, debido a la alta capacidad del Brij 30 para solubilizar el fenantreno y disminuir así la adsorción de HAPs por el suelo. El rendimiento global al combinar ambas etapas de lavado y remover los HAPs con tensoactivos presenta una mayor eficiencia con Tween 80 y Brij 35. Otros tensoactivos no iónicos tales como T-Maz 80, T-Maz 20, CA 620 y TeraSurf 80, tensoactivos aniónicos tales como Dowfax 8390, dodecil sulfato de sodio y del acero 330 también son eficientes para la eliminación de fenantreno (Zhou & Zhu, 2007).

Extracción con ciclodextrinas: Las ciclodextrinas se han propuesto como una alternativa no tóxica y biodegradable a los solventes orgánicos y agentes tensoactivos para la eliminación de HAPs del suelo contaminado (Viglianti et al., 2006). Tres ciclodextrinas, β -ciclodextrina (β CD), hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD) y metil- β -ciclodextrina (MCD) fueron evaluadas como agentes de lavado para eliminar HAPs. De las tres, MCD produjo la eficiencia de eliminación más alta seguida de HPCD y por último BCD. La extracción de HAPs fue directamente proporcional a la concentración de HPCD. Del mismo modo, una tendencia cuasi-lineal de HAPs extraídos se logró con el aumento de la solución de lavado. La temperatura de la solución de lavado no afecta significativamente la extracción de HAPs a temperaturas de 5 a 35°C (Sánchez-Trujillo et al., 2013).

Extracción con aceite vegetal: Estudios recientes han defendido el uso de aceite vegetal como no tóxico, rentable y biodegradable. Es un medio de absorción fuerte para los compuestos hidrófobos tales como los HAPs. Además, las relaciones de solubilidad molar de HAPs en sus ácidos grasos libres son similares a los de los tensoactivos

químicos sintéticos (Bogan et al., 2003). Gong et al. (2006), evaluaron la eliminación de HAPs de suelos contaminados con aceite de girasol. Las pruebas de extracción inicial con 150 ml de aceite de girasol y 150 g de suelo contaminado, mostraron que casi todos los HAPs (81-100%) son removidos. Menor humedad en la muestra de suelo conduce a un aumento de la eficiencia de eliminación de los HAPs (Gong et al., 2005). Pannu et al. (2004), utilizaron el aceite de cacahuate para extraer HAPs en un proceso de agitación orbital, se obtuvieron eficiencias de extracción de más del 90% para el antraceno. El aumento de la temperatura mejora la eficacia de la extracción de un total de 10 HAPs del suelo, desde 51,5% a 20°C a 81,4% a 60°C.

Extracción con fluidos supercríticos (EFS): Esta técnica ha sido utilizada con éxito en química analítica y su aplicación se ha extendido a la tecnología de remediación de suelos (Miège et al., 2003). El fluido supercrítico es un fluido a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Por lo tanto, la exposición a un fluido continuo con la densidad de un líquido, de baja viscosidad, alta difusividad y de tensión superficial cero, hace que sea capaz de penetrar en matrices sólidas y hacer la extracción completa de los analitos (Spack et al., 1998).

Los HAPs que se depositan sobre la superficie sólida se extraen a través de la disolución, mientras que los componentes orgánicos que son absorbidos en las partículas del suelo se eliminan a través de un equilibrio adsorción/desorción (Akgerman, 1993). El dióxido de carbono se usa típicamente en EFS de suelos contaminados (Anitescu & Tavlarides, 2006). Librando et al. (2004) emplean CO₂ supercrítico (SCCD) con un 5% (v/v) de metanol como co-solvente a una temperatura óptima de 50°C y presión de 450 bares para eliminar los HAPs del suelo. La recuperación de los HAPs tanto del tubo de condensación como del tubo interno del extractor fue mayor del 90%, con la excepción del fluorantreno que tuvo una recuperación de aproximadamente el 88%. A diferencia de otros métodos de extracción con solventes, el aumento de la humedad del suelo influye positivamente en la eliminación de HAPs con SCCD (Hawthorne et al., 2002).

Extracción con fluidos subcríticos: El fluido subcrítico se mantiene en estado líquido por debajo de su punto crítico, bajo alta presión y temperatura. La extracción con agua subcrítica también conocida como extracción con agua caliente a presión (100°C a 274°C) para mantenerla líquida. A medida que se eleva la temperatura, la red de enlaces por puente de hidrógeno de las moléculas de agua se debilita, lo que resulta en una constante dieléctrica baja, disminuyendo su polaridad. Así, el agua subcrítica se hace más hidrófoba

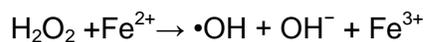
y orgánica y aumenta la miscibilidad de hidrocarburos ligeros en ella (Kronholm et al., 2002).

Lagadec et al. (2000) utilizan agua subcrítica para eliminar HAPs del suelo en una unidad de rehabilitación a escala piloto. El agua se calienta a lo largo de una bobina de calentamiento 30 min antes de pasar a través de una celda de extracción tubular. La extracción de agua subcrítica óptima a 275°C remueve todos los HAPs en 35 min. De manera similar, en otro estudio, extracciones de agua subcrítica se llevaron a cabo en arena enriquecida con HAPs a diversas temperaturas. Las recuperaciones de los HAPs fueron aproximadamente 80%, independientemente del tiempo de extracción. Además, las recuperaciones de los compuestos de mayor peso molecular, particularmente criseno y perileno aumentan casi un 41% al incrementar la temperatura de 200 a 300°C. Este es un resultado de la disminución en el valor de la constante dieléctrica que favorece la solubilidad de HAPs de baja polaridad (Kronholm et al., 2003).

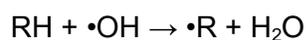
1.4.2 Oxidación química

Las reacciones de oxidación se pueden utilizar para remediar suelos contaminados con HAPs. Se han investigado diferentes tipos de oxidantes que van desde reactivos tales como el peroxiácido, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno y persulfato de sodio activado hasta gases oxidantes como el ozono. El Fenton es uno de los oxidantes más comúnmente estudiado. El reactivo Fenton (Fe (II)-H₂O₂) se puede utilizar para tratar HAPs en suelos contaminados, y las principales etapas implicadas en la reacción de Fenton son las siguientes (Flotron et al., 2005):

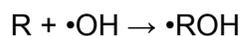
El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se descompone en radicales hidroxilo (•OH) en presencia de hierro ferroso (Fe²⁺):



Los radicales hidroxilos inestables formados se usan para degradar compuestos orgánicos (RH o R), ya sea por la abstracción del hidrógeno:



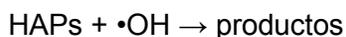
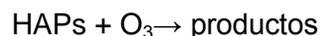
O mediante la adición del hidroxilo:



Lin et al. (2016) investigan el uso del reactivo de Fenton para estudiar la posible desorción o degradación de HAPs de lodos de una fábrica de textiles. Y obtienen un 83.5% de degradación comparado con el proceso de sonicación que solo alcanzó un 75.5%. Además se descubrió que los HAPs de APM se degradan con más facilidad que los de BPM. En otro estudio (Kawahara et al., 2005) utilizan un proceso de oxidación con el Fenton para tratar suelo contaminado con creosota de un sitio de tratamiento de la madera. Los resultados muestran que de 12 HAPs aumenta su remoción en un intervalo de 13-56% en las muestras de suelo, debido al debilitamiento de los enlaces de adsorción del complejo HAP formado con la superficie del suelo. El reactivo de Fenton se puede utilizar como un tratamiento de la remediación primaria que proporciona una mejora adicional para un tratamiento de remediación secundario más eficiente (Ferrarese et al., 2008).

El Fenton modificado se puede utilizar como un agente oxidante más fuerte para tratar HAPs más recalcitrantes. Aparte de los radicales hidroxilo, otros radicales altamente reactivos se forman a través de la adición de productos químicos tales como agentes quelantes y/o altas concentraciones de peróxido (Watts et al., 2000). Bogan & Trbovic (2003) concluyen que la susceptibilidad de HAPs a la oxidación química es una función del contenido orgánico total (COT) por encima de un valor umbral de 5% aprox. Para suelos de bajo COT, la oxidación depende en gran medida de la porosidad del suelo. Además, los HAPs de mayor peso molecular tienden a tener afinidades más fuertes a un suelo ácido húmico, dejándolos menos susceptibles a la oxidación del Fenton. Los resultados están de acuerdo con otro trabajo que demostró que la eficiencia de la oxidación química de los HAPs en el suelo depende de las características del suelo y las propiedades de los HAPs (Jonsson et al., 2007).

1.4.2.1 El ozono como oxidante: El ozono (O_3) puede iniciar reacciones de oxidación indirectas mediante la descomposición en radicales $\bullet OH$. La oxidación con ozono de los HAPs, puede ser a través de la reacción directa o de la reacción de radicales (Miller & Olejnik, 2004):



O'Mahony et al. (2006) utilizan el O_3 generado a partir de aire por descarga eléctrica para eliminar fenantreno en varios tipos de suelos agrícolas. El tratamiento de los suelos se lleva a cabo en una cámara de O_3 a una temperatura constante de $13^\circ C$. Los análisis de los suelos tratados muestran una reducción de más de 50% en las concentraciones de fenantreno en todos los suelos después del tratamiento de O_3 , durante 6 horas a una concentración de 20 mg/kg. También hay hasta un 85% de eliminación del fenantreno en suelos arenosos, en comparación con los suelos arcillosos debido a los espacios de los poros más grandes, que permiten un mejor transporte del O_3 gaseoso a través de las matrices del suelo.

El aumento del contenido de humedad tiene un efecto adverso sobre el tratamiento con O_3 esto debido a que es menos accesible al suelo cuando el agua ocupa los espacios de los poros. Jonsson et al. (2006) experimentan con O_3 como agente oxidante y logran un 95% de eliminación de fenantreno, 91% de pireno, mientras que el criseno se reduce sólo el 50% debido a su naturaleza más hidrófoba. Similar a la reacción de Fenton, se genera un número no identificado de subproductos más polares que los compuestos parentales, y así tener una mejor biodegradabilidad y solubilidad acuosa.

1.4.3 Degradación fotocatalítica

El proceso de degradación fotocatalítica utiliza fotocatalizadores para promover reacciones oxidantes que destruyen a los contaminantes orgánicos en la presencia de la radiación solar. La tecnología ha sido ampliamente establecida para el tratamiento de aguas residuales. Recientemente su aplicación se ha extendido al tratamiento de suelos contaminados. Zhang et al. (2008) hacen un estudio exhaustivo de la degradación fotocatalítica de fenantreno, pireno y benzo[a]pireno en suelo, utilizan dióxido de titanio (TiO_2) bajo la luz ultravioleta. La adición de TiO_2 como catalizador acelera el proceso de fotodegradación de HAPs de tres anillos aromáticos, el benzo[a]pireno se degrada más rápido.

La variación en la concentración de TiO_2 de 0.5 a 3%, no presenta ningún efecto significativo sobre la degradación de HAPs. Mientras que a longitudes de onda UV distintas, las tasas de degradación fotocatalítica son diferentes y la degradación del pireno y benzo[a]pireno se dan en condiciones ácidas, mientras que el fenantreno se degrada significativamente en condiciones alcalinas. Además, la presencia de ácido húmico en el suelo mejora la degradación fotocatalítica de HAPs mediante la sensibilización de los

radicales capaces de oxidar HAPs. Rababah & Matsuzawa (2002) desarrollan un reactor fotocatalítico de recirculación asistida, con H_2O_2 como agente oxidante para tratar un suelo enriquecido con fluorantreno. Se observa que la eficiencia de la degradación de fluorantreno es del 99% en presencia tanto de TiO_2 y H_2O_2 en comparación con una eficiencia de degradación inferior de 83% en presencia de TiO_2 por sí solo.

1.4.4 Remediación electrocinética

La remediación electrocinética *in situ* se puede aplicar para tratar suelos permeables, contaminados con metales pesados, radionucleidos y contaminantes orgánicos seleccionados. El principio detrás de este método es la aplicación de un potencial eléctrico de corriente continua de bajo nivel a través de electrodos, que se colocan en el suelo contaminado. Los contaminantes iónicos son transportados al electrodo de carga opuesta por electromigración. Además, el flujo electroosmótico proporciona una fuerza motriz para el movimiento de los contaminantes solubles. Aunque la tecnología ha sido conocida y utilizada durante más de una década, su aplicación en la eliminación de contaminantes hidrofóbicos como los HAPs, ha sido estudiada recientemente. Por lo tanto, se han utilizado agentes solubilizantes para mejorar la eficiencia de eliminación de HAPs.

Reddy et al. (2006) hacen una serie de experimentos a escala de laboratorio en suelo, utilizando diferentes agentes de lavado, además de dos tensioactivos (3% de Tween 80 y 5% de Igepal CA-720), un cosolvente (20% de n-butilamina) y una ciclodextrina (HPCD 10%). Los experimentos se realizan a 2.0 VDC/cm² gradiente de voltaje y 1.4 gradiente hidráulico. El flujo electroosmótico máximo se obtiene con 20% de n-butilamina, seguido por HPCD. Sin embargo, hay HAPs sin solubilizarse en los tensioactivos. La eficiencia más alta de remoción de los HAPs del suelo se logra con el surfactante Igepal CA-720. Todas las pruebas electrocinéticas se llevan a cabo en un gradiente de voltaje periódico de 2 VDC/cm² y en condiciones de pH neutro en el ánodo mediante la adición de 0.01 M de hidróxido de sodio. La migración de fenantreno va del ánodo al cátodo.

El control del pH en el ánodo afecta a la eliminación electrocinética de fenantreno (Saichek & Reddy, 1993). Al controlar el pH se aumenta la solubilización del contaminante y la migración de la región de suelo adyacente al ánodo, las concentraciones altas de contaminantes en las regiones medias del suelo indican una ineficiente migración de los contaminantes al causar deposición de estos y baja eficiencia global de eliminación.

1.4.5 Biorremediación

Los procesos de biorremediación aplicados a la matriz del suelo, se han dividido en *in situ* y *ex situ*. La estrategia *in situ* consiste en llevar a cabo la remediación sin excavación del suelo contaminado, mientras que en la *ex situ* es necesario excavar y remover el suelo a tratar para mantener un ambiente controlado (Song et al., 2000). Las técnicas *in situ* presentan una mayor ventaja económica sobre las *ex situ* ya que son menos costosas y generan una menor cantidad de residuos, aunque el tiempo de remediación es mayor (Daanae et al., 2001). Otra característica de estas técnicas es que utilizan microorganismos autóctonos y estos pueden degradar un gran número de constituyentes del suelo. Sin embargo, su eficiencia se ve afectada por la presencia de tóxicos a altas concentraciones. Es por eso, que se vuelve necesario aislar y reintroducir microorganismos de los sitios contaminados, ya que se ha observado que de esta manera pueden degradar los agentes xenobióticos y generan tolerancia a los niveles de toxicidad, adaptándose al sitio contaminado (Drysdale et al., 1999). De entre los métodos más utilizados para la biorremediación *in situ* y *ex situ* destacan los siguientes:

a) Atenuación natural. Esta técnica es la base de toda metodología de biorremediación ya que es considerada como un método pasivo. Reduce las concentraciones de los contaminantes mediante los procesos biológicos, físicos y químicos propios del suelo, por lo que los resultados que se generen, dependen en medida de la presencia o ausencia de los microorganismos degradadores adecuados, así como del oxígeno disuelto, la disponibilidad de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes (Menendez-Vega et al., 2007). Mediante la atenuación natural se ha reportado la degradación de más del 80% de HAPs, con respecto a la concentración inicial en suelo (Corona-Ramírez & Iturbide-Argüelles, 2005).

Se ha demostrado que después de las primeras 24 horas del proceso de atenuación, comienza a disminuir la producción de CO₂, este efecto se atribuye a la falta de aireación del suelo. La atenuación natural tiene una alta capacidad de degradación en agentes xenobióticos orgánicos, pero tiene menores porcentajes de remoción al compararla con otras estrategias de biorremediación (Bento et al., 2005). Al usar consorcios de *Bacillus* sp., se han reportado porcentajes de reducción de hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) del 52.79% durante los primeros tres meses del proceso de remediación, el 15% se ha atribuido a procesos abióticos (Gómez et al., 2009).

b) Bioaumentación. Es el término general empleado para referirse al incremento de la biomasa (virus, bacterias, actinomicetos, entre otros) en un suelo que carece de ella y así poder acelerar el proceso de descontaminación. Este proceso se puede llevar a cabo tanto *in situ* como *ex situ* (Jezequel & Lebeau, 2008). Su efectividad depende de diversos factores que van desde lo económico hasta el tipo de contaminante y de las facilidades para manejo *ex-situ* o la adquisición de los organismos biorremediadores requeridos (Rivera-Cruz et al., 2002). La bioaumentación también se aplica en suelos donde los microorganismos no son capaces de degradar el contaminante, por ejemplo cuando existe compuestos que requieran múltiples métodos para su degradación o en sitios pequeños en donde usar otras metodologías puede ser más costoso (Mrozik & Piotrowska-Seget, 2010).

Al utilizar un consorcio microbiano formado por *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas* sp. se obtienen porcentajes de degradación de 75 y 73% en la fracción ligera y pesada de los productos totales del petróleo a las 12 semanas de remediación. Durante las primeras dos semanas se ha logrado más del 50% de degradación, la disminución de la tasa de degradación después de las dos semanas se le puede atribuir a varios factores como: la falta de nutrientes esenciales en el suelo que provoca la disminución del metabolismo bacteriano; las condiciones climatológicas son factores no controlados de suma importancia cuando se realizan experimentos en campo, ya que un descenso de la temperatura disminuye el metabolismo de las bacterias, la falta de humedad óptima y la poca aireación, entre otros (Bento et al., 2005).

El uso de consorcios en lugar de solo un tipo de microorganismo es más eficaz, debido a que los productos del metabolismo de una especie pueden ser utilizados y degradados por otras especies, lo que aumenta la efectividad del proceso (Heinaru et al., 2005). Esta técnica es más eficaz que la atenuación natural, ya que la adición de nutrientes, aceptores de electrones y otros elementos estimula a los microorganismos a degradar con mayor facilidad los agentes xenobióticos (Gómez et al., 2009).

c) Landfarming. Es uno de los métodos más utilizados en la biorremediación, consiste en aprovechar la actividad biológica de la microflora del suelo para oxidar y volatilizar los hidrocarburos contenidos en el suelo (Silva-Castro et al., 2015). Uno de los puntos más fuertes de esta metodología es que la microflora tiene una amplia diversidad metabólica, por lo que tiene una mayor capacidad para degradar hidrocarburos. Sin embargo, está

altamente relacionada a las características físicas y químicas de los suelos, tales como pH, temperatura, humedad, oxígeno, disponibilidad de nutrientes y textura. Ligeros cambios en alguno de estos factores puede afectar el proceso de biodegradación (Jezequel & Lebeau, 2008).

Otro factor a tomar en consideración en esta metodología, es que la microflora no solo requiere de una fuente de carbono para su metabolismo, sino que también requiere de nitrógeno y fósforo, elementos que tienden a escasear rápidamente, por lo que es necesario considerar la adición de nutrientes para asegurar un proceso de degradación óptimo (Bento et al., 2005). Esta técnica ha sido utilizada para disminuir la concentración de cualquier constituyente derivado del petróleo (Marin et al., 2005). Además se ha demostrado que con solo asegurar una buena aireación y humedad óptima, basta para degradar los hidrocarburos en el suelo, aunque depende del tipo de microbiota a utilizar en el proceso por lo que es necesario tener una caracterización fisicoquímica del suelo a remediar, así como de sus componentes bióticos (Silva-Castro et al., 2015).

Al ser una técnica muy utilizada, su efectividad ha sido estudiada en una gran variedad de condiciones y climas, en climas áridos se ha logrado obtener un porcentaje de degradación de hidrocarburos del 80% en un periodo de 11 meses. En estudios realizados se ha logrado obtener en los primeros dos meses una degradación del 55% de hidrocarburos correspondientes a compuestos volátiles y más inestables (Marin et al., 2005).

Esta técnica también es útil en climas del ártico, en donde se ha reportado la reducción de hasta 80 y 90% la concentración de HTPs a lo largo de tres años (Paudyn et al., 2008). El solo control de la ventilación no ayuda a estimular la actividad microbiana, pero al adicionar nutrientes se incrementa la actividad metabólica, lo que se traduce en un menor tiempo de degradación de hidrocarburos. Otros estudios reportan que el principal factor que afecta a la velocidad y efectividad de la degradación de hidrocarburos en el suelo son las características iniciales del suelo, por lo que es necesario realizar una adecuada caracterización del suelo para lograr una mayor biorremediación (Silva-Castro et al., 2015).

d) Bioventeo. Es un método *in situ*, que consiste en inyectar O₂ en la zona afectada mediante el uso de pozos de inyección, para favorecer la degradación de los hidrocarburos por volatilización y migración de la fase más volátil del contaminante, esta

técnica también aprovecha la microflora del suelo para llevar a cabo la degradación del xenobiótico, ya que al incrementar las concentraciones de oxígeno estimula positivamente el metabolismo microbiano (Magalhães et al., 2009). Esta técnica ha ganado popularidad ya que al igual que la metodología de landfarming es de bajo costo y de alta eficiencia (Malina et al., 1998).

Es especialmente efectiva para la degradación de productos de peso medio como el diesel. A diferencia de otros métodos en los que se inyecta O_2 como el de la extracción de vapores del suelo, la técnica de bioventeo es efectiva en suelos no tan permeables (Baker & Moore, 2000). Para un mejor funcionamiento se requiere de la presencia de grandes concentraciones de microbiota autóctona para alcanzar índices aceptables de biodegradación (Tsao et al., 1998). También hay reportes en donde según las condiciones y características del suelo se puede llevar algunos meses hasta varios años concluir la remediación. La técnica no es eficiente en suelos saturados (Khan et al., 2004), por lo que es necesario realizar una caracterización del suelo a tratar para después concluir si esta estrategia es la mejor opción para llevar el proceso de descontaminación de la zona.

Existen reportes que indican que esta tecnología no es tan eficiente con ciertos hidrocarburos como la gasolina, por otra parte se ha reportado que ayuda a la rápida recuperación de la microbiota nativa (Osterreicher-Cunha et al., 2004). Con esta estrategia es posible alcanzar porcentajes de degradación de hasta 93% de los hidrocarburos aromáticos en un periodo máximo de siete meses (Frutos et al., 2010). Se han creado modelos matemáticos a partir de esta metodología, en los cuales se aprecia que un flujo bajo de oxígeno da mejores resultados en el proceso de degradación. Sin embargo, al ser un modelo es necesario llevar a cabo el ensayo correspondiente para validar estos resultados (Sui & Li, 2011).

e) Biosparging. Al igual que bioventeo, es un método *in situ* que consiste en inyectar O_2 a la zona afectada para favorecer la degradación del contaminante por volatilización y la actividad metabólica de la microflora del suelo. Y se diferencia de ésta porque además de O_2 , también se añaden nutrientes para facilitar la propagación de los microorganismos. Otra diferencia, es que puede utilizarse efectivamente en suelos saturados (Benavides, 2006). A pesar de que es una metodología apta para todo tipo de hidrocarburos, su efectividad disminuye con hidrocarburos pesados. Por lo que se recomienda utilizar en suelos contaminados por productos ligeros y de peso medio.

Una de sus ventajas es que los tiempos en que tarda en concluir la degradación de los hidrocarburos, es menor a dos años. Esta técnica solo puede usarse en suelos bien permeados (Khan et al., 2004). Estudios con consorcios demuestran que ésta estrategia modifica la dinámica metabólica de los suelos, cambiándola de anaerobia a aerobia, lo que permite que consorcios como *C. magnetobacterium*, *F. bacterium* y *B. bacterium* proliferaren y puedan reducir la concentración de distintos derivados del petróleo hasta en un 70% en un periodo de 10 meses (Kao, et al., 2008).

f) Biopilas. Es una técnica *ex situ*, adecuada cuando el suelo no se encuentra en condiciones saturadas. Consiste en formar pilas de material biodegradable (suelos contaminados, materia orgánica, composta) de una altura variable que va de 2 a 4 metros. En estas pilas, se aplica una aireación que puede ser activa (si se va volteando la pila) o pasiva (mediante el uso de tubos de aireación). Se suelen agregar nutrientes y minerales, asimismo se controla la humedad, pH y temperatura para estimular la actividad microbiana (Filler et al., 2001). Esta técnica es útil para degradar la mayoría de los hidrocarburos en el suelo, así como compuestos halogenados, no halogenados y pesticidas (Chaîneau et al., 2003).

La efectividad de esta técnica, puede verse afectada por la textura, permeabilidad, humedad, densidad del suelo y temperatura. En suelos con baja permeabilidad la distribución de la humedad, O₂ y nutrientes se dificulta, por lo que tiende a disminuir su efectividad. Debido a que estas características tienden a ser heterogéneas, es necesario voltear o arar el suelo para promover las condiciones ideales para fomentar la biodegradación (Khan et al., 2004). Es necesario vigilar el porcentaje de humedad y temperatura, puesto que si el porcentaje de humedad es alto, inhibe el flujo de aire necesario para el crecimiento bacteriano, mientras que, si la temperatura no se encuentre entre los 20 y 40°C, el crecimiento bacteriano no es óptimo, por lo que disminuye el proceso de remediación (Chaîneau et al., 2003).

El costo de esta metodología depende del contaminante que se pretende degradar, así como del pre o post tratamiento empleado. Existen ensayos en los que se reporta una remoción de hasta el 70% de HTPs en un periodo de cinco meses, siendo el primer mes cuando ocurre la mayor tasa de degradación. El agregar suficiente materia orgánica favorece la actividad microbiana, sin necesidad de agregar algún otro aditivo. Sin embargo, también se han obtenido porcentajes de remoción mucho más bajos (49.62%), lo cual puede ser atribuido a un exceso de urea, que inhibió la actividad metabólica de la

microbiota, lo que sugiere que debe tenerse un control estricto sobre la cantidad y el tipo de aditivos que se usen, de lo contrario podría conseguirse porcentajes bajos de remoción.

Esta técnica es útil en zonas frías y al adicionar composta, se obtienen porcentajes de remoción de HTPs de 74 a 82% a los 94 días. Matemáticamente esta técnica fue optimizada para climas fríos, en los que se ha obtenido 90.7% de degradación en el mismo periodo de tiempo, si se aplican 4.1 l/m³ del consorcio bacteriano comercial, así como 7% de composta (Gómez & Sartaj, 2014). Para climas polares, esta técnica es útil ya que se han alcanzado porcentajes de degradación de hasta 91% un año después de iniciado el experimento. Los porcentajes de remoción, en condiciones polares son mayores durante el verano, mientras que en el invierno la actividad microbiana disminuye considerablemente, lo que indica que la temperatura es uno de los factores más importantes para su buen funcionamiento (Whelan et al., 2015).

g) Bioslurry. Es una técnica *ex situ*, que consiste en combinar suelo contaminado, agua, aditivos y microfauna (previamente seleccionada) en un bioreactor en el cual, la parte sólida se encuentra en suspensión para asegurar que los microorganismos estén en contacto con los hidrocarburos. Debido a los aditivos y a las condiciones del bioreactor, la degradación suele ser muy veloz, el proceso de remediación se puede llevar a cabo desde un mes a seis meses (Kuyukina et al., 2003). Es útil para degradar la mayoría de los hidrocarburos y otros contaminantes halogenados, no halogenados y pesticidas.

Sin embargo, para garantizar la correcta degradación de estos contaminantes es necesario usar un consorcio bacteriano específico (Rodríguez-Rodríguez et al., 2012). Debido al tiempo que tarda el proceso y su capacidad para degradar gran variedad de contaminantes, es considerada como más efectiva que otros métodos de biorremediación. Al ser un sistema cerrado, es posible establecer un mayor control de las condiciones ambientales (pH, temperatura, oxígeno, nutrientes, etc.), lo cual ayuda a alcanzar mayores tasas de degradación. Sin embargo, la efectividad de esta metodología es afectada por el tipo de suelo, y aunado a que es necesario un tipo específico de bacteria o consorcio para asegurar la degradación, se vuelve necesario realizar una correcta caracterización del suelo y el tipo de contaminante presente. Debido a esto, suele ser más costosa que el resto (Khan et al., 2004).

Esta técnica se puede ver afectada por la tasa de carga del sustrato introducida al bioreactor, que en condiciones óptimas alcanza un 89.6% de degradación de antraceno (Prasanna et al., 2008). También es efectiva para remover HTPs en concentraciones superiores al 10%, que en otras metodologías inhiben la actividad biológica, por lo que en casos extremos de contaminación, podría ser la única técnica aplicable para la biorremediación. Sin embargo, bajo estas circunstancias, solo se alcanza un porcentaje de remoción del 49.68%, por lo que es necesario complementarla con otras técnicas de remediación para alcanzar los límites permisibles de distintas legislaciones ambientales, según el país en donde se aplique dicha estrategia (Rojano & Ruiz, 2012).

Las técnicas de biorremediación son metodologías viables y económicas para restaurar suelos contaminados por HAPs. Una gran ventaja que tienen estas técnicas frente a otras metodologías es que pueden ser combinadas entre ellas para incrementar los porcentajes de remoción y mejorar los tiempos que tardan en llevar a cabo este proceso. Es importante mencionar, que depende del escenario, se pueden presentar mejores resultados al usar una sola especie o un consorcio microbiano (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estrategias de biorremediación que han usado consorcios microbianos.

Estrategia de biorremediación	Aplicaciones con un consorcio	Aplicaciones con una especie bacteriana
Bioaumentación	Tanto el consorcio preparado como los microorganismos autóctonos en los sedimentos tienen capacidad para degradar HAPs logrando la degradación total del xenobiótico (Yu et al., 2005).	La degradación de HAPs por <i>Paracoccus</i> sp., en microcosmos bioaumentado alcanza un 23,2% a concentración de HAPs de 1300 mg/kg después de 28 días (Jezequel & Lebeay, 2008).
Bioestimulación + Bioaumentación	El uso de consorcios en suelos inertes es muy útil, pero no tanto en suelos con microflora nativa, difiriendo en efectividad hasta en un 6% (Li et al., 2009).	Los sistemas de bioaumentación con <i>Rhizopus</i> sp. y <i>A. sydowii</i> eliminan hidrocarburos por separado (Mancera-López et al., 2008).
Landfarming + Bioaumentación	En estas estrategias los consorcios preparados son capaces de degradar hasta el 20% de los HAPs de 300 mg/kg, comparado con las poblaciones de microorganismos autóctonos (Jacques et al., 2008).	La degradación de antraceno por <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. citronellolis</i> es de 20 a 35% a concentración de 150 mg/kg y pueden ser útiles para la degradación de HAPs para fines de biorremediación, <i>P. Citronellolis</i> es más efectiva (Jacques, et al., 2005).
Bioslurry	Un consorcio de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>P. aeruginosa</i> degrada HAPs, la aplicación del consorcio es hasta 7% más efectiva que al realizar la degradación con los microorganismos por separado (Nasseri et al., 2010).	

1.4.6 Tecnologías térmicas

Las tecnologías térmicas emplean calor para destruir o volatilizar los HAPs en suelos contaminados. La incineración del suelo a altas temperaturas, que oscilan entre 870 y 1,200°C, destruye eficazmente los contaminantes orgánicos como los HAPs. Sin embargo, hay algunas desventajas en la aplicación de esta tecnología. En primer lugar, la humedad en el suelo contaminado tiene que ser eliminada, ya sea por adición de cal u otros métodos, de modo que la combustión del suelo sea más completa. En segundo lugar, se deben instalar dispositivos de control de contaminación del aire para hacer frente a los gases generados en la combustión como el cloruro de hidrógeno (HCl), óxidos de azufre (SO_x), óxidos de nitrógeno (NO_x), dioxinas/furanos y las emisiones de metales (Acharya & Ives, 1993).

La desorción térmica es un proceso de separación física que aplica calor a los contaminantes orgánicos volátiles de matrices tales como suelos, lodos y sedimentos. Un sistema de gas portador o vacío barre los contaminantes orgánicos volatilizados en el sistema de tratamiento de gases de combustión secundaria o fuera de las instalaciones de eliminación. En un trabajo realizado por Renoldi et al. (2003), el suelo contaminado de una gasera fue tratado a escala de laboratorio por calentamiento indirecto en un horno tubular horizontal. La concentración de HAPs se registra en un detector de ionización en flama (FID) situado a la salida del gas portador del reactor.

Después del tratamiento a temperaturas superiores a 450°C, las concentraciones de 16 HAPs se reducen por debajo de 0.05 mg/kg de peso seco, que corresponden a una eficiencia de eliminación del 99.9%. Sin embargo, se observó que los compuestos de BPM, tal como naftaleno, fluoreno y acenafteno permanecen en el suelo tratado en porcentajes de 0.2% y 1.0%, respectivamente. Estos HAPs de BPM se forman por la ruptura de los HAPs de APM. Debido a las altas temperaturas se encuentran algunas moléculas oxigenadas tales como furanos y otros HAPs presentes en el suelo tratado, formados a través de la descomposición o la oxidación de los contaminantes originales por calentamiento.

Incluso Harmon et al. (2001) utilizan una extracción de vapores del suelo térmicamente mejorada a una escala de laboratorio, con un reactor para remediar aprox. 70 kg de suelo contaminado por hollín. El reactor se hizo funcionar durante 35 días a temperaturas que oscilan entre 650 a 700°C. Las temperaturas que van desde 250 a 300°C movilizan la

mayoría de los 11 HAPs estudiados y reducen la concentración total de HAPs en el suelo a una fracción residual de menos de 100 mg/kg en 10 días.

1.4.7 La biorremediación integrada

Cada una de las tecnologías de remediación discutidos en las secciones anteriores tiene sus propias fortalezas y debilidades. Para abordar las limitaciones de las técnicas de remediación individuales y para lograr mejores eficiencias de eliminación de HAPs, diversas combinaciones de tratamientos biológicos integrados con físicos y químicos se pueden utilizar para tratar la contaminación por HAPs en los suelos (Alcantara et al., 2008).

a) Tratamiento físico-biológico: Lee et al. (2001) describen el uso de solventes (acetona y etanol) para aumentar la biodisponibilidad de los HAPs en suelos contaminados con carbón, antes de la biodegradación aeróbica en un bioreactor. Los suelos se mezclan con solvente durante 24 h y se dejan evaporar en condiciones normales de ventilación, posteriormente se transfirieren a un reactor para la biodegradación a una temperatura de 21°C. El pretratamiento con solvente eleva la tasa de degradación, a un 90% del total de HAPs en 17 días de tratamiento en comparación con los 35 días requeridos para la biodegradación de suelo sin pretratamiento. El suelo residual de la evaporación puede ser utilizado como sustrato de crecimiento que conduce a una población microbiana más alta y posteriormente revelando las mejoras en la eliminación de HAPs de APM tales como criseno y el benzo[a]pireno.

b) Tratamiento biológico-químico: La combinación de tratamientos elimina de manera eficiente más del 90% de los HAPs de BPM con una ozonización de 3 h y los HAPs de APM se eliminan un 72% después de 13 h de tratamiento químico. El uso del O₃ como oxidante posbiológico (Derudi et al., 2007). El uso de la remediación biológica como un paso secundario después de la oxidación química esta demostrado, Kulik et al. (2006) evalúan la degradación de HAPs en arena o turba enriquecida artificialmente con creosota, usan como pretratamientos químicos Fenton y O₃. El uso de Fenton seguido de la biorremediación es más eficaz para la eliminación de HAPs en la arena mientras que la ozonización antes de la biorremediación es mejor para la turba. Nam et al. (2001) también demuestran que la biodegradación simultánea y la oxidación con Fenton modificado elimina más del 98% de HAPs de BPM y entre 70% y 85% APM.

c) Tratamiento biológico-fisicoquímico: Haapea & Tuhkanen (2006) estudian la viabilidad de la integración de lavado de suelos, ozonización y el tratamiento biológico para la remediación de un suelo contaminado con HAPs. Tres dosis diferentes de O₃ y lavado de suelos se experimentaron a diferente pH con el fin de evaluar su efecto sobre la degradación de HAPs. El objetivo de eliminar el 85% de HAPs no pudo lograrse con cualquiera de los métodos ensayados, pero se encontró que a varias combinaciones de los métodos ensayados el consumo de O₃ fue de 5 a 10 veces menor en los tratamientos integrados de lavado de suelos, ozonización y el tratamiento biológico, que sin prelavado.

1.5 Metabolismo de HAPs

Los hongos y las bacterias metabolizan una amplia variedad de HAPs, a través de diferentes rutas (Fig. 3). El metabolismo de los HAPs por bacterias aerobias lo inician las enzimas dioxigenasas, que incorporan O₂ en el HAP para formar uno o más isómeros *cis*-dihidrodiol (Cerniglia, 1993). Las dioxigenasas bacterianas son sistemas multienzimáticos, por ejemplo, la naftaleno dioxigenasa es una ferredoxina reductasa, una ferredoxina y una proteína de hierro-azufre terminal con enlaces α y pequeñas subunidades β (Habe & Omori, 2003). Los *cis*-dihidrodiolos se reducen por las enzimas deshidrogenasas dihidrodiolos para formar intermedios aromáticos hidroxilados (catecoles), que luego sirven como sustratos para los anillos de fisión por *orto* y *meta* dioxigenasas (Habe & Omori, 2003). Los productos de la ruptura del anillo son metabolizados a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y finalmente convertidos a CO₂.

Además, algunos *Streptomyces* y *Mycobacterium* spp. producen enzimas mono oxigenasas que oxidan HAPs a *trans*-dihidrodiolos (Sutherland, 2004). Los metabolitos *trans*-dihidrodiolos son con mayor frecuencia producidos por hongos. Se sabe que la biodegradación anaerobia de HAPs puede producirlos (Chang et al., 2002), aunque las rutas metabólicas para HAPs de APM son desconocidas. En general los microorganismos aeróbicos degradan HAPs de APM más lentamente que de BPM, debido a: su baja solubilidad en agua, la absorción más lenta en las células, la capacidad insuficiente para inducir enzimas degradantes y la menor producción de energía para el crecimiento de microorganismos (Kanaly & Harayama, 2000). Si los HAPs de APM son las fuentes de carbono y energía, la energía disponible a partir de las reacciones iniciales no puede ser suficiente para el crecimiento. Debido a la persistencia y la toxicidad de HAPs de APM en el medio ambiente, muchos laboratorios han estado examinando un espectro filogenético

más amplio de microorganismos potencialmente degradadores (da Silva et al., 2003; Gauthier et al., 2003).

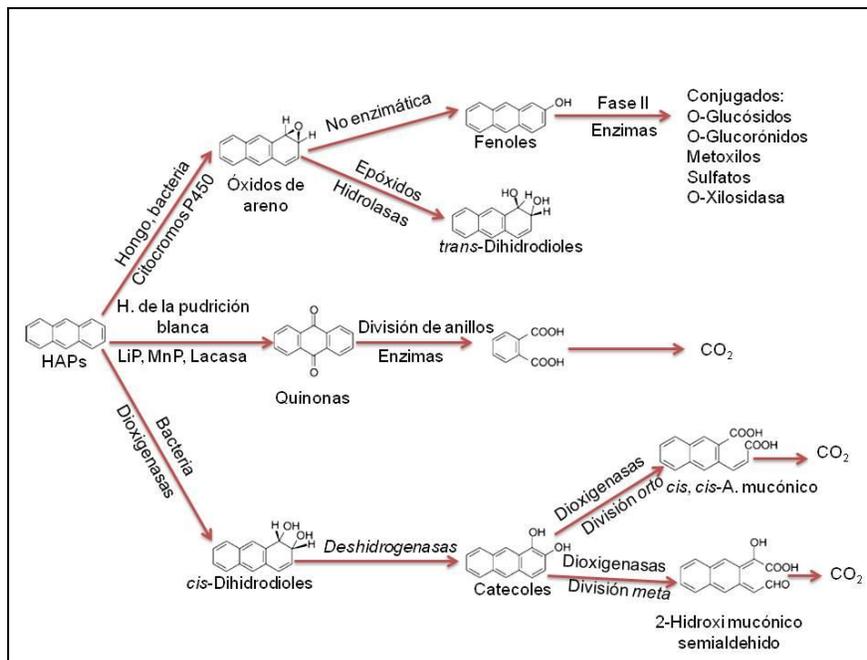


Figura 3. Rutas generalizadas para el metabolismo de HAPs por bacterias y hongos (Haritash & Kaushik, 2009).

1.6 El papel de los microorganismos en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos

La biorremediación es la herramienta para transformar los compuestos de formas peligrosas a menos peligrosas (Ward et al., 2003; Providenti et al., 1993); la degradación microbiana es el proceso más importante (Bumpus, 1989; Yuan et al., 2001). Aunque los HAPs pueden sufrir adsorción, volatilización, fotólisis y degradación química. Los peligros asociados con los HAPs se pueden superar mediante el uso de métodos convencionales que implican la eliminación, alteración o aislamiento del contaminante. Estas técnicas implican la excavación de suelos contaminados y su incineración o contención, estas tecnologías son caras y en muchos casos solo se transfiere el contaminante de una fase a otra.

Aunque es bien conocida la actividad catabólica de los microorganismos en la biorremediación, los cambios en las comunidades microbianas son aún impredecibles y la dinámica poblacional es una "caja negra" (Dua et al., 2002). Como los microorganismos degradadores de HAPs son bacterias, hongos o un consorcio, la descomposición de

compuestos orgánicos es la biotransformación en metabolitos menos complejos, que resultan en la mineralización, (H_2O , CO_2) en condiciones aerobias o en CH_4 cuando es vía anaerobia. La tasa y la velocidad de biorremediación dependen de las condiciones ambientales (pH, temperatura, oxígeno), del número y tipo de la población microbiana, de las propiedades de transporte celular, del grado de aclimatación, de la accesibilidad de los nutrientes, del coeficiente de partición del contaminante en el medio de crecimiento y de la naturaleza química del compuesto a degradar (Singh & Ward, 2004).

1.6.1 Bacterias

Sin duda, las bacterias están involucradas en la degradación de contaminantes orgánicos de sitios contaminados, se han estudiado numerosas especies para degradar HAPs, que por lo regular son aisladas del suelo o sedimentos contaminados. A largo plazo, los sitios contaminados con residuos petroquímicos albergarán bacterias degradadoras de HAPs. En tales residuos se encuentra el benzo[a]pireno (BaP), que es el más cancerígeno y tóxico de los HAPs; ya se ha demostrado que las bacterias pueden degradar el BaP cuando crecen con una fuente de carbono alternativa, en cultivo líquido (Haritash & Kaushik, 2009).

Además Ye et al. (1996) observan una disminución del 5% en la concentración de BaP (50 mg/l) después de 168 h durante la incubación con *Sphingomonas paucimobilis* cepa EPA 505. También las células en reposo de *S. paucimobilis* cultivadas en agar nutritivo suplementado con glucosa producen un 28% de $^{14}CO_2$, lo que significa la hidroxilación y la escisión del anillo formado por los carbonos 7, 8, 9 y 10. Y Aitken et al. (1991) aíslan 11 cepas de sitios contaminados (petróleo, aceite de motor, tratamiento de la madera y de refinería) con la capacidad para degradar BaP. Los organismos identificados son: tres especies de *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Sphingomonas*. También el BaP es degradado por *Rhodococcus* sp., *Mycobacterium* y por un cultivo mixto de *Pseudomonas* y *Flavobacterium*.

Asimismo Heitkamp et al. (1988) encuentran una bacteria que mineraliza pireno. Mientras que Romero et al. (2014) aíslan *Pseudomonas aeruginosa* de un arroyo contaminado por una refinería de petróleo. Y Rehmann et al. (1998) identifican, en suelo de una planta de gas, contaminado con HAPs, un *Mycobacterium* spp. que utiliza pireno como fuente de carbono metabolizando hasta 60% de pireno, a una concentración de 0.5 mg/ml en 8 días a 20°C. También Yuan et al. (2002) aíslan seis cepas bacterianas Gram negativas de un

sitio de eliminación de residuos petroquímicos, éstas bacterias degradan del 70-100% de acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno en 40 días de tratamiento. Dos de las seis cepas aisladas son *Pseudomonas fluorescens* y *Haemophilus* spp. Incluso Dean-Ross et al. (2002) aíslan dos cepas bacterianas, *Mycobacterium flavescens* y *Rhodococcus* spp. de sedimentos del río Grande Calumet. Ambas bacterias degradan HAPs a velocidades de 0.044 mg/l para la mineralización del pireno por *M. flavescens* y de 0.470 mg/l para la mineralización del antraceno por *Rhodococcus*.

Es evidente la creciente preocupación por el incremento de la concentración de los HAPs en el medio ambiente marino, los sedimentos de manglares, los humedales y los estuarios; la contaminación de éstos ecosistemas está estrechamente vinculada a las actividades humanas. Las bacterias aisladas de los sedimentos de manglares degradan fenantreno del 42% al 78% y el potencial de degradación depende del tipo de sedimento de que provienen (Tam et al., 2002). Además Romero et al. (1998) estudian la degradación de fenantreno por microorganismos aislados de sedimentos de un arroyo contaminado, e identifican *Rhodotorula glutinis* y *P. aeruginosa*. Estos microorganismos fueron cultivados en medio basal mineral líquido, donde la biotransformación del fenantreno casi se completa después de un mes de incubación, con ambos microorganismos.

Además en un estudio para la restauración de suelos contaminados con HAPs, al aplicar un cultivo microbiano mixto de *Acinetobacter* sp. y *Klebsiella* sp. se obtiene una reducción del 98% de los HAPs (250 mg/kg) durante los primeros seis meses. La concentración de HAPs con tres y cuatro anillos se reduce a 0.5% del contenido original en el suelo. Mientras que Daane et al. (2001) caracterizan bacterias asociadas a la rizósfera de plantas de pantanos salinos que degradan HAPs. Las bacterias aisladas se clasifican en tres grupos principales: Gram negativo, *Pseudomonas*; Gram positivo, *Nocardioforms* y el Gram positivo, *Paenibacillus*. Y crecen en medios enriquecidos con fenantreno y utilizan un mayor número de HAPs, que cuando crecen en medios enriquecidos con naftaleno. Más tarde se establece que *Paenibacillus* utiliza naftaleno o fenantreno como fuente de carbono (Daane et al., 2002). Además Verrhiest et al. (2002) estudian la interacción entre una mezcla de HAPs y las comunidades microbianas en los sedimentos de agua dulce natural.

1.6.2 Hongos

Hay hongos con la capacidad para degradar contaminantes persistentes en la naturaleza. Por ejemplo *Cunninghamella echinulata* variedad *elegans* degrada HAPs y la tasa de remoción de contaminantes es proporcional a la concentración del contaminante en el suelo y el tiempo de degradación depende de los microorganismos, el tipo de contaminante y su concentración (Cutright, 1995). Especialmente, en los últimos años se ha estudiado la capacidad degradativa de los hongos lignolíticos, debido a la estructura compleja de la lignina, estos hongos producen enzimas extracelulares que también degradan diferentes compuestos xenobióticos.

El sistema ligninolítico consta de tres grupos principales de enzimas: peroxidasas (lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa), fenol oxidasas (lacasas, tirosinasas) y las enzimas que producen H₂O₂ (Cajthaml et al., 2001). Los experimentos con enzimas purificadas demuestran que las enzimas lignolíticas son capaces de degradar los HAPs (Hofrichter et al., 1998). Dichas enzimas hacen una oxidación de radicales, producen radicales de cationes de los contaminantes, seguido por la aparición de quininas (Vyas et al., 1994). Clemente et al. (2001) investigan la degradación de los HAPs por 13 cepas fúngicas lignolíticas y encuentran que la degradación depende de la variación de las enzimas lignolíticas.

También se han estudiado los hongos del suelo en cuanto a su capacidad para degradar HAPs y producir enzimas lignolíticas en condiciones microaerobias (Silva et al., 2009). Se ha encontrado que *Aspergillus* sp., *Trichocladium canadense*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. y *Acremonium* sp. degradan una amplia gama de HAPs. El sistema de monooxigenasa del citocromo P450 también puede estar implicado en la degradación. Los epóxidos pueden reordenarse en derivados de hidroxilo o pueden ser hidrolizados a dihidrodioles vecinales. Cajthaml et al. (2002) estudian los productos de degradación de HAPs por el hongo *Irpex lacteus* y encuentran que los principales productos de degradación de antraceno y fenantreno son antraquinona y fenantreno-9,10-dihidrodiol, respectivamente.

Es bien sabido que los hongos de la pudrición blanca (HPB) pueden degradar contaminantes orgánicos y que la degradación se debe al sistema enzimático que degrada la lignina. Pero Boyle et al. (1998) encuentran que los HPB que crecen en el suelo no degradan cantidades importantes de HAPs, sin embargo, en cultivo líquido

degradan un alto porcentaje de HAPs. Además el nitrógeno inhibe el sistema de producción de lignina y la adición de aserrín o alfalfa al suelo inhibe la formación de metabolitos polares sin afectar la mineralización.

La degradación de BaP por HPB en medio líquido es más rápida, cuando los hongos son expuestos a los HAPs, lo que sugiere que el sistema de degradación es inducido. La degradación en el suelo del BaP se incrementa al adicionar tensoactivos, los factores responsables de una mayor degradación pueden aumentar la accesibilidad del BaP o inducir el sistema de degradación de los HPB. Entre cientos de HPB que exhiben actividades lignolíticas, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* y *P. ostreatus* se han estudiado ampliamente.

Aunque los compuestos intermedios como quinonas, hidroxilos y dihidroxilos han sido aislados en experimentos de degradación, no está claro si se acumulan como productos finales. La acumulación de quinonas se reporta en cultivo líquido para *P. chrysosporium* y para *B. adusta* (Kennes & Lema, 1994) y en el suelo para *P. ostreatus* (Anderson & Henryson, 1996). Además Eggen & Majcherczyk (1998) concluyen que en un suelo contaminado con creosota, *P. ostreatus* degrada el BaP durante el primer mes. Los hongos más abundantes en ambientes contaminados y las levaduras pueden oxidar HAPs como fuentes de carbono alternativas. Así la velocidad de degradación de fenantreno por *Rhodotorula glutinis*, aislada de un arroyo contaminado, es casi igual a la de *P. aeruginosa* (Romero et al., 1998).

1.7 Uso de consorcios microbianos para la remediación de HAPs

1.7.1 Consorcios nativos

Diversos estudios han demostrado que los microorganismos autóctonos degradan con mayor facilidad los contaminantes locales, que los contaminantes provenientes de otras regiones (Genside et al., 2008). Cuando las poblaciones microbianas se encuentran en bajas densidades, se retarda o no lleva a cabo la degradación del contaminante; sin embargo, la bioaumentación con la microflora nativa acelera la degradación en un suelo contaminado (D'Annibale et al., 2006). Es por eso que el uso de consorcios nativos para remediar suelos contaminados con HAPs, es una buena alternativa (Wang et al., 2010).

Como el proceso de degradación de HAPs por la flora nativa en suelos es lento, el aislamiento e identificación de los microorganismos con capacidad para degradar HAPs,

se vuelve una tecnología muy eficiente, ya que al bioaumentar la flora microbiana de un suelo se incrementa la velocidad de degradación del contaminante (Mao et al., 2012). Se ha estudiado una gran gama de géneros microbianos para la biodegradación de HAPs, entre ellos *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, *Gordonia* y *Marinobacter*, entre otras (Thavamani et al., 2012); y las concentraciones del contaminante oscilan entre 300 a 1000 mg/kg. Mientras que las especies nativas estudiadas son *Bacillus* sp. ASP1, *Pseudomonas* sp. ASP2, *Stenotrophomonas maltophilia* ASP3, *Staphylococcus* sp. ASP4, *Geobacillus* sp. ASP5 y *Alcaligenes* sp. ASP6, aisladas de sedimentos del astillero Alang-Sosiya, India (Vitas et al., 2013).

Por otra parte, la importancia del uso de consorcios estriba en que en ocasiones un solo microorganismo no es capaz de realizar la degradación completa del contaminante, y así genera metabolitos secundarios, que otra especie podría ser capaz de transformar en metabolitos más simples o incluso lograr la degradación completa (Técher et al., 2011). El primer paso para estudiar un microorganismo con capacidad degradativa es aislarlo de suelos contaminados por algún hidrocarburo, ya sea de campos petroleros (Xu et al., 2013; Ozaki et al., 2007), plantas químicas de coque (Sun et al., 2010), refinerías antiguas (Janbandhu & Fulekar, 2011) e incluso de suelos antárticos contaminados con diesel (Vázquez et al., 2013).

Para degradar HAPs se han aislado consorcios bacterianos de sedimentos en manglares, que tienen un gran potencial en los tratamientos de remediación de suelos salinos (HuiJie et al., 2011). Tal es el caso del consorcio formado por *Achromobacter* sp. BAB239, *Pseudomonas* sp. DV-AL2, *Enterobacter* sp. BAB240 y *Pseudomonas* sp. BAB241, aislado de los sedimentos del patio de un puerto en Gujarat, India. Este consorcio degrada de forma eficiente naftaleno en presencia de otros hidrocarburos, que utiliza como fuentes de carbono (Patel et al., 2012). Diversos estudios se enfocan en aislar consorcios de suelos contaminados con HAPs y en probar su eficacia para degradar estos contaminantes de forma individual (Tang et al., 2013; Festa et al., 2013), como es el caso del fenantreno (Chen et al., 2010).

La investigación en la remediación de suelos contaminados con HAPs no sólo ha llevado a aislar consorcios formados por bacterias, sino que también en combinación con hongos, que son capaces de degradar estos contaminantes, un ejemplo claro son los HPB (Darvishi et al., 2011). Además se han aislado consorcios nativos que estimulan la

degradación de hidrocarburos mediante la producción de biosurfactantes. Estos tensoactivos hacen que el contaminante esté más disponible mediante la emulsificación de los hidrocarburos y así ser asimilados por los microorganismos (Darvishi et al., 2011). Se han estudiado consorcios nativos halófilos para implementarse en la descontaminación de suelos salinos contaminados con HAPs (Dastgheib et al., 2012; Arulazhagan & Vasudevan, 2011; Vila et al., 2010).

1.7.2 Consorcios preparados

La preparación de consorcios es otra herramienta con fines de biorremediación de suelos contaminados. Por lo general se aplica a suelos contaminados, donde la flora nativa no presenta capacidad para degradar HAPs, también puede emplearse para formar un consorcio con mayor capacidad para degradar éstos. Ya se han preparado consorcios artificiales con flora nativa combinada con cepas exógenas. Asimismo, se han formado consorcios de hongos (*P. chrysosporium*, *Cuunninghamella* sp., *Alternaria alternata*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*) con bacterias (*Bacillus* sp., *Zoogloea* sp. y *Flavobacterium* sp.) para remediar suelos contaminados con HAPs (Li et al., 2009).

Incluso hay consorcios microalgas-bacterias para mejorar la degradación de dichos tóxicos, tal ha sido el caso de *Sphingomonas* GYB2 y *Burkholderia cepacia* GS3C, junto con *Pseudomonas* GP3A y *Pandoraea pnomenusa* GP3B, ambas consorcios se han formado en laboratorio, y éstos no solo degradan HAPs, sino que también degradan los hidrocarburos alifáticos (Tang et al., 2010). *P. aeruginosa* (UKMP-8T), *Rhodococcus* sp. M15-2 (UKMP-5T) y *Rhodococcus* sp. ZH8 (UKMP-/T) son otras especies combinadas en laboratorio (Hamzah et al., 2013). En laboratorio se han estudiado en consorcio cepas bacterianas obtenidas de diferentes ambientes, para probar en conjunto su capacidad de degradación de las fracciones de diesel y petróleo (Grace-Liu et al., 2011). *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* y *Stenotrophomonas maltophilia* son otras especies estudiadas para degradar HAPs, tanto en forma individual como en consorcio, en consorcio presentan una tasa mayor de degradación (Kim et al., 2009).

1.8 Técnicas moleculares para identificar los microorganismos del suelo

Anteriormente, la caracterización de las comunidades microbianas en suelos contaminados se limitaba al cultivo de los microorganismos a partir de muestras ambientales y sólo una pequeña parte de los microorganismos encargados de la

biodegradación de contaminantes se podían cultivar en el laboratorio. Hoy en día se ha estimado que la comunidad microbiana en un gramo de suelo puede contener más de mil especies bacterianas diferentes (Desai et al., 2009), y menos del 1% de éstos puede ser cultivable.

De este modo, los organismos de crecimiento rápido o cepas mejor adaptadas a las condiciones de cultivo particulares crecen preferentemente y por lo tanto no son representativas de la composición de la comunidad microbiana real de ambientes contaminados (Gilbride et al., 2006). Con el uso de las técnicas actuales se supera el requisito del cultivo, incrementando así nuestra comprensión de la diversidad microbiana y de su función en el medio ambiente. Estas técnicas se basan en la caracterización de componentes celulares, tales como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos grasos y otros componentes específicos (Mapelli et al., 2009).

1.8.1 Métodos bioquímicos

1.8.1.1 Ácidos grasos de fosfolípidos derivados: Los fosfolípidos son componentes importantes de las membranas celulares vivas y constituyen una proporción significativa de la biomasa del organismo en condiciones naturales (Kozdroj & van Elsas, 2001). Los microorganismos tienen la capacidad de cambiar la composición lipídica de sus membranas en respuesta a las condiciones ambientales tales como el estrés químico (Hamady et al., 2008) y fluctuaciones de temperatura (Bartlett, 1999). Los cambios en el perfil de fosfolípidos (PFLs) generalmente están relacionadas con la variación en la abundancia de grupos microbianos y esto puede interpretarse gracias a una base de datos de cultivos puros y rutas biosintéticas conocidas (Zelles, 1999).

Los ácidos grasos extraídos se analizan cuantitativamente por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Zelles & Bai, 1993), la comparación de datos con información de la base de datos de ácidos grasos permite la identificación de los PFLs extraídos (Widmer et al., 2001). Aunque los PFLs extraídos directamente del suelo no permite la identificación de los microorganismos hasta el nivel de la especie, son un medio eficaz para predecir los cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Nannipieri et al., 2003). Los estudios del PFLs de una comunidad microbiana tienen diferentes enfoques (Haack et al., 2004); se han utilizado métodos como tabulación de ácidos grasos únicos y comparaciones con base en sus relaciones dentro del perfil de ácidos grasos (Haack et al., 2004). Asimismo, el análisis del PFLs emplea estadística multivariante,

como el análisis de componentes principales para discriminar entre perfiles compuestos (Langworthy et al., 1998).

Kamaludeen et al. (2003) investigan la ecotoxicidad de los suelos contaminados a largo plazo con residuos de las curtidurías, el estudio evalúa la estructura y la actividad de la comunidad bacteriana por el PFLs. Los PFLs de bacterias específicas disminuyeron significativamente a medida que el nivel de contaminación de cromo aumentó, lo que indica que la concentración de cromo en el suelo contaminado con residuos de curtiduría tiene un efecto significativo sobre la estructura de la comunidad microbiana. Los PFLs también se han empleado para caracterizar la comunidad microbiana de sedimentos contaminados con HAPs (Langworthy et al., 1998).

1.8.2 Técnicas basadas en ácidos nucleicos

1.8.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa: La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene la capacidad de producir millones de copias de una porción de un gen deseado, gen entero o grupos de genes con alta fidelidad en 3 o 4 h. Es el método más utilizado para la amplificación del gen 16S rARN, antes de los estudios de huellas dactilares. Los métodos basados en PCR también se han utilizado en la detección y cuantificación de microorganismos que se encuentran en el suelo (Nyysönen et al., 2006). La técnica se puede aplicar también para el análisis de genes catabólicos implicados en la biodegradación de los contaminantes orgánicos (Wilson et al., 1999).

A menudo, para la detección de organismos o genes de ambientes contaminados se usan dos variantes de la técnica; PCR sencillo y PCR multiplex. La PCR simple utiliza un par de cebadores en una única reacción de amplificación, mientras que la PCR multiplex utiliza múltiples pares de cebadores para amplificar simultáneamente varios genes en una sola reacción (Markoulatos et al., 2002). La amplificación por PCR es dependiente de la calidad y rendimiento de la extracción y de la purificación de ácidos nucleicos de las muestras ambientales. La lisis insuficiente de células da como resultado la extracción preferencial del ADN de las bacterias Gram negativas, mientras que los tratamientos excesivamente persistentes pueden resultar en la fragmentación del ADN (Wintzingerode et al., 1997). Además, la eficiencia de la amplificación de la PCR puede verse severamente obstaculizada por la presencia de sustancias inhibitoras como los ácidos húmicos, la materia orgánica y las partículas de arcilla (Kirk et al., 2004).

La toma, el transporte y el almacenamiento de las muestras, antes de la extracción de ácidos nucleicos influyen en el sesgo que puede darse en el análisis microbiano (Schryver et al., 2006). Con el almacenamiento prolongado de la muestra, estos factores pueden alterar la composición microbiana de ahí la necesidad de extraer ADN/ARN después de tomar la muestra. Entre las aplicaciones de la PCR multiplex están el trabajo de Said et al. (2010) para caracterizar la población microbiana que degrada petróleo en un suelo contaminado con éste. Y Baldwin et al. (2003), quienes determinan la participación de las enzimas naftaleno dioxigenasa, bifenilo dioxigenasa, tolueno dioxigenasa, xileno monooxigenasa, fenol monooxigenasa y tolueno monooxigenasa en la hidroxilación del anillo en una sola reacción de PCR.

Aunque la PCR multiplex puede ahorrar tiempo y recursos en la detección de microorganismos o genes implicados en la biodegradación, la aplicación exitosa depende de la combinación de varios pares de cebadores que sean capaces de realizar de forma fiable una sola reacción (Gilbride et al., 2006). Otra variante de la técnica de PCR que puede detectar y cuantificar el producto amplificado simultáneamente mientras la reacción está ocurriendo en tiempo real (PCR-TR). Esto permite la detección y cuantificación de las amplificaciones de la PCR durante la fase exponencial temprana de la reacción (Schryver et al., 2006). La PCR-RT tiene una mayor capacidad de cuantificación de las copias de genes presentes en una muestra dada (Lerat et al., 2005). Esto requiere el uso de marcadores fluorescentes para cuantificar el producto al final de cada ciclo de amplificación y la cantidad de fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad de producto al final de cada ciclo en la reacción (Saleh-Lakha et al., 2005).

La PCR-RT se ha utilizado en varios estudios ambientales tales como el seguimiento de carbazol 1,9a-gen dioxigenasa (carAa) en suspensión del suelo (Widada et al., 2002), el gen del catabolismo de la atrazina, la identificación y cuantificación del gen arsenato reductasa y la oxigenasa en aromáticos (Devers et al., 2004; Sun et al., 2004; Baldwin et al., 2003; Beller et al., 2002). También se ha utilizado en la cuantificación de la proporción de microorganismos que contienen la enzima alcano monooxigenasa y la evaluación de los cambios de la comunidad microbiana en un suelo antártico contaminado de hidrocarburos (Powell et al., 2006).

Las ventajas que ofrece la PCR-RT son mayor velocidad, sensibilidad y precisión y la posibilidad de la automatización robótica (Powell et al., 2006). Aunque en la PCR-TR se

pueden medir la cantidad de genes, los resultados obtenidos no relacionan la expresión de genes con una actividad microbiana específica o población. El ARN extraído de muestras de suelo es bajo en rendimiento y a menudo no representa a la población microbiana del suelo (Saleh-Lakha et al., 2005). Además, el ARN tiene una vida media corta y se degrada rápidamente después de la extracción por lo que es un desafío para la aplicación de la PCR-TR en microbiología ambiental. Y las sondas específicas utilizadas en las reacciones de amplificación pueden no captar la diversidad de secuencia que está presente dentro de las muestras ambientales (Saleh-Lakha et al., 2005).

Aunque las técnicas moleculares de la PCR han revolucionado completamente la detección de ADN/ARN, especialmente en estudios ecológicos microbianos, la amplificación diferencial de los genes diana tales como 16S rARN puede tener sesgo en los estudios de diversidad (Powell et al., 2006). Las secuencias con un menor contenido de guanina y mayor de citosina se separan más eficientemente en la etapa de desnaturalización de la PCR y por lo tanto son preferencialmente amplificadas (Baldwin et al., 2003). Los productos que se ven en geles o en tiempo real pueden ser productos quiméricos de la PCR (Gilbride et al., 2006). La PCR es una técnica muy sensible puede producir falsos positivos o falsos negativos debido a la contaminación (Spiegelman et al., 2005).

1.8.2.2 Perfil de la comunidad microbiana: En los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares han conducido a estrategias más rápidas y precisas para el examen de la diversidad microbiana, incluyendo el descubrimiento y la identificación de nuevos microorganismos y los genes catabólicos involucrados en la biodegradación de los contaminantes orgánicos en el suelo (Gentry et al., 2006; Mahmood et al., 2005). La identificación microbiana y caracterización de su diversidad se ha mejorado mediante la utilización del gen 16S rARN altamente conservado en todos los microorganismos (Watanabe, 2001). Secuencias del gen 16S rARN se conservan lo suficiente como para permitir el diseño de cebadores que se dirigen a diferentes grupos taxonómicos (desde el reino al género), pero con suficiente variabilidad para proporcionar comparaciones filogenéticas de las comunidades microbianas (Rogers et al., 2007).

Las composiciones de las comunidades microbianas pueden ser analizadas sobre la base de los perfiles generados a partir de la separación física de las secuencias del rARN o del ADN en un gel (Murrell & Radajewski, 2000). Varias técnicas basadas en la amplificación

y la comparación de secuencias de ADN amplificadas por PCR se han desarrollado y utilizado para caracterizar las comunidades microbianas de ambientes contaminados. Estos métodos detectan diferencias entre las secuencias de ADN/ARN, que a menudo incluyen fragmentos de genes 16S rARN amplificadas por la PCR. Actualmente se emplean diferentes métodos para la identificación microbiana, como el análisis de amplificación ribosomal de ADN y análisis de restricción (ARDRA), análisis del espacio intergénico ribosomal (RISA), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)/electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y la terminal de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (T-RFLP).

1.8.2.2.1 Amplificación ribosomal de ADN y análisis de restricción (ARDRA): Para el ARDRA, los fragmentos amplificados del 16S rARN por PCR se digieren o se cortan en sitios específicos con enzimas de restricción y el residuo resultante se separa por electroforesis en gel. Diferentes secuencias de ADN se cortan en diferentes lugares y dan lugar a un perfil único. La divergencia del rARN patrón de restricción en un gel está muy influenciada por el tipo de enzima de restricción utilizada (Gentry et al., 2006). Los patrones de bandas en ARDRA se pueden utilizar para detectar clones o para medir la estructura de la comunidad bacteriana (Bai et al., 2006). El ARDRA es simple, rápido y barato, además es útil en la identificación microbiana (Kita-Tsukamoto et al., 2006; Krizova, et al., 2006).

La composición de la comunidad microbiana en un acuífero expuesto a fenol, tolueno e hidrocarburos alifáticos clorados es evaluada por ARDRA para identificar la comunidad microbiana dominante involucrada en la biodegradación del tricloroetileno mediante bioestimulación. El análisis revela que los miembros de la comunidad microbiana dominantes son estables y se evidencian por las bandas de huellas digitales producidas en el gel (Fries et al., 1997). El ARDRA detecta cambios estructurales en las comunidades microbianas pero no mide la diversidad microbiana ni detecta grupos filogenéticos específicos dentro de un perfil de huella dactilar de la comunidad (Watts et al., 2001).

Además se requiere la optimización con enzimas de restricción que a menudo es difícil si las secuencias son desconocidas y aún más para producir patrones de huellas digitales característicos de la comunidad microbiana (Spiegelman et al., 2005). La franja de patrones en diversas comunidades se vuelve demasiado compleja para analizar el uso de ARDRA (Kirk et al., 2004). En estudios recientes, el ARDRA se ha combinado con otras

técnicas moleculares, tales como T-RFLP y DGGE para caracterizar las comunidades microbianas de fuentes contaminadas (Haack et al., 2004).

1.8.2.2.2 Análisis del espacio intergénico ribosomal: RISA es una técnica basada en la PCR que amplifica la región entre los operones 16S y 23S rARN. La región espaciadora intergénica tiene variabilidad tanto en la secuencia y la longitud, 50-1500 pb (Ranjard et al., 2001). Esta característica única facilita la identificación taxonómica de microorganismos (Spiegelman et al., 2005).

En las investigaciones para el mejoramiento del medio ambiente, el RISA se ha utilizado para detectar las poblaciones microbianas implicadas en la degradación de HAPs a baja temperatura en suelo enriquecido bajo condiciones aeróbicas con bacterias nitrato-reductoras (Eriksson et al., 2003). El RISA es un método muy rápido y simple, pero su aplicación para el análisis de la comunidad microbiana de fuentes contaminadas se limita en parte debido a la base de datos limitada para secuencias espaciadoras intergénicas ribosomales, ya que no es tan grande o tan amplia como la base de datos de secuencia de 16S (Spiegelman et al., 2005). El RISA puede ser demasiado grande para aplicaciones ambientales, como su nivel de resolución taxonómica es mayor que el del gen 16S rARN puede conducir a perfiles muy complejos de la comunidad (Spiegelman et al., 2005).

1.8.2.2.3 Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización/Electroforesis en gel con gradiente de temperatura: La DGGE o TGGE separan los fragmentos amplificados de rADN de la misma longitud pero con diferentes composiciones de pares de bases. La separación de las bandas, tanto en DGGE y TGGE depende de la disminución de la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN de doble cadena parcialmente fundidas en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente lineal de desnaturalizantes o un gradiente de temperatura lineal (Wakase et al., 2007). Los fragmentos de ADN amplificados por PCR son generalmente de 500 pb, con diferentes secuencias de bases. El número de bandas producidas durante DGGE o TGGE es proporcional a la cantidad de especies dominantes en la muestra.

La DGGE/TGGE es elegida cuando la información requerida no es filogenéticamente exhaustiva, como la proporcionada por bibliotecas de clones del gen 16S rARN, de modo que es preciso determinar los miembros dominantes de las comunidades microbianas con resolución filogenética (Sanz & Kochling, 2007). Para las muestras de fuentes ambientales o contaminadas donde la diversidad microbiana es desconocida en gran

parte, la técnica de DGGE/TGGE permite la identificación de la población microbiana a través de la escisión y la secuenciación de las bandas (Forney et al., 2004). La DGGE en particular ha sido ampliamente utilizada para la evaluación de la estructura de las comunidades microbianas en suelos contaminados (El-Latif-Hesham et al., 2006; Cummings et al., 2003; Kleikemper et al., 2002; Chang et al., 2000; Ralebitso, et al., 2000). Además de los perfiles de la comunidad microbiana, la técnica se ha utilizado para examinar grupos de genes, tales como sulfito reductasa subunidad beta (*dsrB*), genes sulfato reductasa en comunidades bacterianas (Geets et al., 2006) y genes de cepas bacterianas de acuíferos contaminados con hidrocarburos (Hendrickx et al., 2006).

1.8.2.2.4 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminal: La T-RFLP es una modificación de ARDRA. Los cebadores de la PCR utilizados en el análisis T-RFLP son fluorescentes y los productos de la PCR resultantes se visualizan y cuantifican (Liu et al., 1997). La T-RFLP se basa en las variaciones de las posiciones en los sitios de restricción entre las secuencias y se hace la determinación de la longitud de fragmentos de restricción terminales marcados con fluorescencia por electroforesis en gel de alta resolución en un secuenciador de ADN automatizado. El uso de cebadores marcados con fluorescencia limita el análisis a sólo los fragmentos terminales de la digestión (Marsh, 1999). Esto simplifica el patrón de bandas y permite el análisis de comunidades complejas, además proporciona información sobre la diversidad que cada banda visible representa o una sola unidad taxonómica operativa o ribotipos (Tiedje et al., 1999).

Fahy et al. (2005) utilizando T-RFLP observan que a largo plazo, la presencia de benceno en el agua subterránea reduce la diversidad y la estructura de la comunidad bacteriana en comparación con las de fuentes de aguas subterráneas limpias. Y en otro estudio se evalúa la fiabilidad del T-RFLP en el seguimiento de las poblaciones microbianas que se caracterizan por una baja diversidad y las altas abundancias relativas de unos pocos grupos dominantes, en un ambiente marino contaminado con hidrocarburos (Denaro et al., 2005). También en los suelos contaminados, el T-RFLP se ha utilizado con éxito para describir comunidades bacterianas en presencia de bifenilos policlorados (Fedi et al., 2005) y para comunidades microbianas que decloran tricloroetileno a eteno (Richardson et al., 2002). El uso de sistemas de detección automática y la electroforesis capilar en T-RFLP permite un alto rendimiento y un análisis cuantitativo más exacto de la comunidad microbiana que cualquier método de huella genética.

A pesar de la alta resolución y sensibilidad, el T-RFLP depende de la amplificación por PCR del gen 16S rARN, afectado por el método de extracción de ADN (Kirk et al., 2004). Diferentes enzimas producen incomparables huellas genéticas de la comunidad y la digestión incompleta por las enzimas de restricción da lugar a una sobreestimación de la diversidad (Osborn et al., 2000; Dunbar et al., 2000); es importante utilizar al menos de dos a cuatro enzimas de restricción (Tiedje et al., 1999). Los perfiles generados por T-RFLP con una enzima de restricción en una comunidad microbiana compleja conducen a conclusiones erróneas sobre la abundancia de una cepa particular o especies (Osborne et al., 2006).

1.8.3 Técnicas que enlazan la identidad microbiana con la función ecológica

1.8.3.1 Sondeo de isótopos estables: El SIP permite la caracterización o identificación de las poblaciones microbianas que participan en los procesos metabólicos específicos en un entorno con el fin de vincular la filogenia microbiana con su función (Radajewski et al., 2000). El SIP requiere la incorporación de sustratos marcados con un isótopo estable en biomarcadores celulares que se utilizan para identificar organismos que asimilan el sustrato (Boschker & Middelburg, 2002). Los biomarcadores como PFLs (Bull et al., 2000), rARN (Manefield et al., 2002) y ADN (Radajewski et al., 2000) se han desarrollado y utilizado en los estudios ecológicos sobre poblaciones microbianas.

Ésta técnica se ha aplicado con éxito en la caracterización e identificación de bacterias provenientes de aguas subterráneas contaminadas con gasolina que degradan benceno en condiciones anaeróbicas (Kasai et al., 2006); también para la identificación de bacterias no cultivables provenientes de suelos contaminados con HAPs (Singleton et al., 2006). Aparte de la identificación microbiana, las técnicas de ADN con SIP se utilizar en el aislamiento de grandes fragmentos de ADN de las comunidades microbianas no cultivables para el análisis metagenómico (Dumont et al., 2006). El SIP como cualquier otra técnica utilizada para la caracterización microbiana tiene sus limitaciones; la sensibilidad depende de los métodos de extracción y purificación de ADN/ARN. La incorporación insuficiente del sustrato y la incubación con ADN/ARN-SIP pueden conducir a un sesgo de enriquecimiento que no representa el metabolismo natural en el medio ambiente (Neufeld et al., 2007).

1.8.3.2 Sondas de genoma reverso (RSGP): Esta técnica es una variación de las metodologías de hibridación y permiten la identificación de microorganismos en

muestras ambientales por la hibridación de ADN genómico. En el análisis RSGP el ADN cromosomal desnaturalizado de los microorganismos a estudiar es depositado sobre un filtro base. El ADN preparado de la muestra ambiental se marca e hibridiza con el filtro para identificar cuál de los genomas bacterianos depositados sobre el papel filtro base es más predominante en la muestra (Bae & Park, 2006). Se requieren cultivos bacterianos puros para desarrollar una matriz, que pueda ser utilizada para analizar el ADN extraído. Los genomas con más del 70% de hibridación cruzada son considerados como la misma especie (Greene & Voordouw, 2003). Luego se prepara una matriz del genoma o el filtro principal a partir del genoma con menos hibridación cruzada. Las sondas de ADN de un área de interés están preparadas y luego se utilizan para hibridarse con la matriz del genoma (Loy et al., 2005; Greene & Voordouw, 2003).

La RSGP se ha utilizado en la caracterización de las comunidades microbianas bioestimuladas con una mezcla de hidrocarburos aromáticos (Greene et al., 2000). El análisis de suelos contaminados y no contaminados no revela diferencias en la población microbiana mientras que la sucesión de las poblaciones microbianas detectada por RSGP se reduce a *Pseudomonas* y *Rhodococcus* spp. y la dominación eventual por *Alcaligenes* spp., observaciones similares de una disminución de la sucesión microbiana provocada por la contaminación se han reportado en el uso de otras técnicas de huella genética (Fahy et al., 2005; Frostegard et al., 1993). En suelos contaminados con tricloroetileno se ha observado que éste afecta la composición de la comunidad microbiana al metabolizarse de forma activa en los suelos (Hubert et al., 2005).

La parte determinante de esta técnica es la elección del organismo a utilizar como estándar en la preparación de las matrices del genoma, ya sea en suelo o agua contaminados, donde la identidad de los microorganismos es desconocida o no son cultivables, así como la fisiología y la bioquímica de las poblaciones microbianas degradantes.

1.8.4 Microarreglos

La tecnología de microarreglos es una herramienta taxonómica y funcional muy potente que se utiliza para estudiar los procesos biológicos, así como las comunidades microbianas incluyendo mezclas de ellas. Esta técnica es similar a la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), pero proporciona un medio para el análisis simultáneo de muchos genes (Cho & Tiedje, 2002). Los microarreglos de ADN, son una matriz miniatura

de sondas de ADN complementarias (500-5000 nucleótidos de longitud) u oligonucleótidos (15 a 70 pb) unidos directamente a un soporte sólido, lo que permite la hibridación simultánea de un gran conjunto de sondas complementarias a su ADN correspondiente (West et al., 2008).

Se ha utilizado con éxito en el análisis de la expresión génica global en cultivos puros (He et al., 2007; DeRisi et al., 1997), aunque es complicada para muestras ambientales debido a los numerosos retos como la especificidad, sensibilidad y cuantificación (Zhou & Thompson, 2002). A pesar de estos desafíos, existen tres formas principales de microarreglos para los formatos ambientales, los arreglos de genes funcionales, FGA (Rhee et al., 2004; Tiquia, et al., 2004; Wu et al., 2001), los arreglos de comunidad genómica, CGA (Wu et al., 2006; Wu et al., 2004) y los arreglos de oligonucleótidos filogenéticos, POA (Chandler et al., 2006; ElFantroussi et al., 2003).

El análisis de la comunidad microbiana en muestras ambientales se ha desarrollado con FGA para identificar o medir los genes que codifican enzimas clave en un proceso metabólico (Liu & Zhu, 2005; Rhee et al., 2004). Esto proporciona información vital acerca de la presencia de genes importantes, así como la expresión de los genes en el entorno midiendo el mRNA (Gentry et al., 2006). En la biodegradación de los contaminantes, los FGA se han desarrollado para la detección de genes oxigenasa aromáticos específicos en un contaminante como es el PCB (Denef et al., 2003) y la expresión de genes degradantes de naftaleno (Rhee et al., 2004).

Los CGA son similares en concepto a RSGP (Voordouw et al., 1992), excepto que CGA utiliza superficies de hibridación no porosas y sistemas de detección basados en fluorescencia para análisis de alto rendimiento, aunque tiene una menor sensibilidad (Wu et al., 2004). Esta técnica es pionera como una herramienta para la detección de microorganismos específicos dentro de una comunidad microbiana natural. Además, está demostrado que la temperatura de hibridación tiene un potencial añadido para la determinación de la relación genómica de bacterias aisladas (Gentry et al., 2006). La principal desventaja de los CGA es que se necesitan organismos cultivables para la preparación de la matriz, con lo que la aplicación en el campo, aparte de los estudios de laboratorio es casi imposible.

Finalmente, los POA se basan en el uso del gen 16S rARN y son un medio conveniente para identificar de forma simultánea muchos microorganismos de una muestra. Varios

estudios han empleado POA en las investigaciones ambientales para identificar las poblaciones microbianas de suelo (Loy et al., 2005) y de lodos activados (Adamczyk et al., 2003). Sin embargo, es necesario tener una evaluación y desarrollo sistemático más rigurosos para aprovechar todo el potencial de los microarreglos para la detección y análisis de la comunidad microbiana (Zhou, 2003). Actualmente solo detectan las poblaciones dominantes en muchos entornos (Rhee et al., 2004) y las sondas diseñadas pueden cruzarse con secuencias similares o desconocidas y producir señales engañosas (Gentry et al., 2006).

El suelo, el agua y los sedimentos a menudo contienen ácidos húmicos y otros materiales orgánicos que pueden inhibir la hibridación de ADN en microarreglos (Saleh-Lakha et al., 2005). Las limitaciones en la extracción de ARN de calidad de muchas muestras ambientales demandan avances en la extracción de ARN y en los métodos de purificación y amplificación para realizar un análisis de microarreglos con mayor expresión génica en una gama más amplia de muestras (Gentry et al., 2006).

II JUSTIFICACIÓN

Entre los 2000 y 2012 se han derramado en suelos mexicanos más de 12,000,000 barriles de petróleo, esto ha ocasionado que una gran pérdida de suelos, sobre todo de los aptos para la agricultura. El gran problema de los derrames de petróleo es su composición tan compleja, ya que está compuesto de diversos hidrocarburos que son tóxicos para los seres vivos. Una de las alternativas para remediar los suelos contaminados con petróleo es la biorremediación ya que es una tecnología limpia, su tratamiento es económico y se logran altas eficiencias de descontaminación sin necesidad de alterar las características fisicoquímicas del suelo. Se ha comprobado que los microorganismos son capaces de generar enzimas que degradan o convierten los contaminantes en sustancias menos peligrosas. El uso de un consorcio bacteria-hongo puede dar mejores resultados en la remediación del suelo contaminado con petróleo, ya que estudios con bacterias o hongos han dado buenos resultados.

III HIPÓTESIS

Un consorcio bacteria-hongo formado por *P. ostreatus* y alguna bacteria autóctona de un sitio contaminado es capaz de degradar HAPs del petróleo en suelo *in vitro*.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la degradación de HAPs por bacterias autóctonas aisladas de un sitio contaminado con hidrocarburos y en consorcio con *Pleurotus ostreatus*, bajo condiciones de microcosmos para fines de biorremediación de suelos.

4.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar la cepa bacteriana con mayor capacidad para degradar HAPs, mediante pruebas de emulsificación y degradación para conformar el consorcio bacteria-*P. ostreatus*.
2. Identificar las cepas bacterianas aisladas mediante técnicas moleculares para reportar la especie como un potencial degradador de HAPs en la base de datos del NCBI.
3. Formar el consorcio bacteria-*P. ostreatus* para evaluar su capacidad de degradación de HAPs en microcosmos.

V METODOLOGÍA

5.1 Muestreo

Los criterios para la selección del lugar fueron los siguientes:

- Ubicación geográfica del sitio contaminado
- Ubicación de las zonas urbanas colindantes al área contaminada
- Características del contaminante
- Ubicación hidrogeológica del sitio contaminado
- Características climatológicas del sitio
- Tiempo del derrame

El sitio seleccionado fue el municipio de Poza Rica, Ver. El área contaminada se ubicó en lugares céntricos y donde el suelo ha sido contaminado no solo por los derrames de hidrocarburos, también por las aguas residuales generadas por la urbanización. Las coordenadas del sitio son 20°32'28.77" N y 97°28'02.60" O.

5.1.1 Toma de muestras

Se tomaron dos tipos de muestras, unas para aislar las bacterias degradadoras de HAPs y otras de suelo sin contaminar, representativo de esa región para evaluar la biodegradación de HAPs del crudo de petróleo por las cepas aisladas.

Para el aislamiento de las cepas degradadoras de HAPs se tomaron ocho muestras de suelo contaminado y cuatro muestras de sedimentos del arroyo que sirven de transporte del contaminante. Las muestras de suelo se tomaron a una profundidad de 5 a 20 cm mientras que las muestras de sedimentos se tomaron a una profundidad del arroyo de 50 cm. Todas las muestras fueron recolectadas en frascos estériles.

5.1.2 Procedimiento de muestreo

La flora microbiana en suelos es de gran importancia por su relación con la fertilidad del suelo y con los ciclos biogeoquímicos de los elementos, además del uso potencial de algunos miembros específicos para aplicaciones ambientales. El procedimiento de muestreo se llevó a cabo de acuerdo a la NOM-001-SEMARNAT-1996, en donde se establece como realizar un muestreo microbiológico tanto en aguas residuales como en sedimentos. El muestreo se realizó a juicio de expertos, se tomaron muestras en sitios

con mayor acumulación del contaminante ocasionado por las condiciones geográficas del lugar.

5.1.3 Almacenamiento, transporte y preservación de la muestra

Las muestras de suelo para el aislamiento de bacterias degradadoras de HAPs fueron transportadas en un contenedor sellado, para evitar contaminación externa, se mantuvieron a una temperatura de 4°C para su conservación. Por otra parte, el suelo colectado para uso de microcosmos, se almacenó en bolsas y se colocó bajo sombra. Una vez en el laboratorio, las muestras se almacenaron en cámara de refrigeración a 0°C hasta su análisis.

5.2 Caracterización fisicoquímica del suelo

Antes de llevar a cabo la caracterización fisicoquímica del suelo, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente, y tamizadas (malla No. 10), con la finalidad de eliminar partículas o cuerpos extraños, posteriormente se efectuó la prueba correspondiente para cada parámetro a medir. La caracterización fisicoquímica se realizó de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de los suelos. Cada análisis fisicoquímico se realizó por cuadruplicado a muestras compuestas.

5.2.1 Determinación del pH del suelo

El pH del suelo se midió por el método desarrollado por Aguilera & Domínguez (1980). La relación suelo-agua utilizada fue de 1:2.5. La medición se realizó con un potenciómetro HANNA modelo 3500.

5.2.2 Determinación de humedad del suelo

El porcentaje de humedad en el suelo se midió por el método gravimétrico de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.

5.2.3 Determinación de materia orgánica del suelo

El método utilizado para calcular la materia orgánica del suelo fue la oxidación con ácido crómico y ácido sulfúrico (Muños-Iniestra et al., 2012).

5.2.4 Determinación de nitrógeno total del suelo

Para la determinación de nitrógeno total se aplicó la técnica Micro-Kjeldahl de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.

5.2.5 Determinación de fósforo asimilable del suelo

La cuantificación de fósforo asimilable se llevó a cabo por el método de Bray de acuerdo a Muños-Iniestra et al. (2012).

5.2.6 Determinación de las densidades del suelo

Tanto la densidad aparente como la real son importantes para estudios cuantitativos del suelo. La densidad aparente es fundamental para calcular los movimientos de agua, el grado de formación de arcilla, entre otras. Mientras que la densidad real nos dice la porosidad que puede presentar un suelo.

Densidad aparente. Se calculó por el método volumétrico (Fernández-Linares et al., 2006).

Densidad real. La densidad real se calculó con el método del picnómetro (Aguilera & Domínguez, 1980).

5.2.7 Determinación de la textura del suelo

Para determinar la textura del suelo se aplicó el método del hidrómetro (Muños-Iniestra et al., 2012). Con los porcentajes obtenidos se estableció la clase textural del suelo, de acuerdo al triángulo de texturas (Fig. 4).

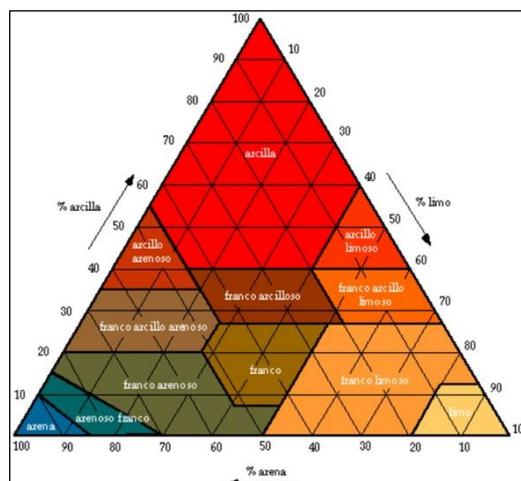


Figura 4. Triángulo de texturas del sistema de clasificación de la USDA.

5.3 Cuantificación de HAPs en el crudo de petróleo

La cuantificación de HAPs se realizó con el fin de determinar en qué concentraciones estaban presentes en el crudo de petróleo y así poder calcular las concentraciones a utilizar en el experimento de biodegradación en microcosmos. La caracterización del crudo de petróleo se hizo de acuerdo a Teixeira et al. (2007), con algunas modificaciones, para lo cual las muestras de petróleo se diluyeron en ciclohexano y se pasaron por cartuchos C-18, el eluido fue concentrado a 2 ml y resuspendido en acetonitrilo (3 ml). Cada muestra fue filtrada y colocada en viales para su caracterización por HPLC. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.3.1 Curva de calibración de HAPs

Para la estandarización del método se utilizó una mezcla de estándares de HAPs (Sigma-Aldrich), con un grado de pureza de 98-99%; enlistados por la Agency Protection Environmental (EPA) como contaminantes orgánicos persistentes: benzo[b]fluorantreno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[k]fluorantreno, indeno[1,2,3-cd]pireno, acenafteno, fluorantreno, naftaleno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, criseno, antraceno, fluoreno, fenantreno, pireno y dibenzo[a,h]antraceno (Fig. 5).

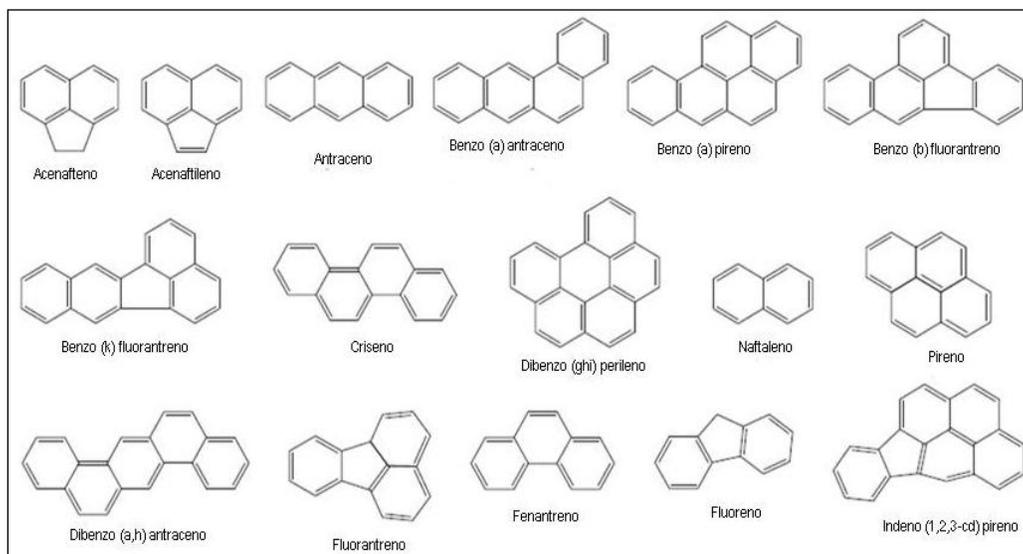


Figura 5. Estructuras químicas de los HAPs analizados en este estudio.

Para la cuantificación de HAPs se utilizó un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) Agilent 1260 Series Infinity (Alemania), equipado con una bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos (DAD) y fluorescencia (FLD). En el cuadro 5 se muestran las condiciones de análisis y la columna de separación utilizada, la metodología

usada fue la de Bellah et al., (2014), se establecieron los tiempos de retención de cada analito mediante la preparación de una solución de 100 mg/l de cada analito en acetonitrilo grado HPLC y se realizaron análisis simultáneos a diferentes longitudes de onda de mayor sensibilidad en ambos detectores.

Cuadro 5. Condiciones de corrida para la separación de HAPs por HPLC.

Columna	Agilent ZORBAX Eclipse PAH C18 4.6 x 50 mm, 1.8µm	
Flujo	0.8 ml/min	
Temperatura de la columna	18°C	
Volumen de inyección	10 µL	
Fase móvil	A = H ₂ O desionizada	B = CH ₃ CN
Gradiente	T (min)	% B
	0	60
	1.5	60
	7	90
	13	100
Detector	Diodos a 230 nm (acenaftileno) y fluorescencia variando la excitación y emisión de las longitudes de onda	
Tiempo de retención (min)	λ _{ExEm} (nm)	HAP detectado
0-5	260/352	Nap, Ace, Flu, Fen, Cri
0-14	260/420	Ant, Pir, BeP, DahA, BghiP
0-14	260/460	Fln, 1,2BaA, BeA, BkF, InP
Tiempo de corrida	16 min	

Una vez establecido el método se procedió a realizar la curva de calibración con seis concentraciones diferentes de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/l.

5.4 Selección de la cepa bacteriana para el consorcio

Se seleccionaron tres muestras de suelo y dos muestras de sedimentos para realizar el proceso de adaptación y aislamiento de microorganismos degradadores de HAPs, a partir de las muestras colectadas para tal fin.

5.4.1 Adaptación de los microorganismos degradadores de HAPs

Se utilizó medio mineral enriquecido (MME) descrito por Okoro et al. (2012), con algunas modificaciones (Cuadro 6), además se añadió 1 g de dextrosa por cada 100 ml, como fuente de carbono, una vez preparado se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 0.1 M, posteriormente se añadieron 100 ml de MME a matraces Erlenmeyer de 250 ml, y se esterilizaron por 15 min, a una temperatura de 121°C y presión de 1.05 kg/cm². Bajo condiciones asépticas, se preparó el inóculo agregando 1 g de muestras de suelo y sedimento al MME previamente esterilizado, posteriormente se incubaron por 7 días a 30°C y agitación constante de 150 rpm (Chagas-Spinelli et al., 2012).

Cuadro 6. Composición del medio mineral enriquecido.

Componente	g/l	Reactivo	µg/l
KH ₂ PO ₄	2.22	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100
K ₂ HPO ₄	2.22	MnSO ₄ ·H ₂ O	20
NH ₄ NO ₃	2.22	CuSO ₄	0.05
MgSO ₄	0.22	FeCl ₃	0.03
NaCl	1.11	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02

Pasados los siete días, se tomaron 10 ml de cada cultivo y se añadieron a 90 ml de MME previamente esterilizado. A partir de la segunda resiembra se añadieron 1 g de petróleo y 1 g de dextrosa como fuente de carbono. La tercera resiembra se hizo como la segunda, pero la fuente de carbono solo fue 1 g de petróleo. Se efectuaron 5 resiembras más añadiendo petróleo como única fuente de carbono. Las condiciones de incubación fueron las mismas para todas las resiembras (Run et al., 2010).

5.4.2 Aislamiento de las cepas degradadoras de HAPs

Una vez que los microorganismos se adaptaron a la presencia del crudo de petróleo, se procedió a aislar las cepas bacterianas por la técnica de estriado en placa.

Con las diluciones seriadas se disminuyó la carga microbiana de las muestras para el aislamiento de cultivos puros. El diluyente fue agua peptonada al 2%, esterilizada. Para lo cual se tomó 1 ml del cultivo enriquecido y se añadió a 9 ml de agua peptonada, se efectuó una homogenización por 30 segundos en Vortex. Luego 1 ml de esta dilución fue añadido a otro tubo de ensaye con 9 ml de agua peptonada. Las diluciones se llevaron a cabo hasta tener una dilución de 10⁻⁸ por cada muestra de cultivo enriquecido (Pérez-Sánchez et al., 2011).

Con la misma composición del MME se preparó agar enriquecido (AE), se añadió agar-agar (15 g/l) como agente gelificante. El pH del agar fue ajustado a 7.0 ± 0.2 con NaOH 0.1 M, luego el agar fue esterilizado en autoclave por 15 min. Antes de gelificar se le añadieron 10 ml de petróleo como única fuente de carbono y se mezcló, luego se vertieron 20 ml de AE aprox. en cajas de Petri. Una vez gelificado el agar, las cajas de Petri fueron inoculadas con las diluciones pares de la muestra (Fig. 6). 0.1 ml de dilución fue extendido por toda la placa. Se incluyeron cajas de Petri sin inóculo como testigo de esterilidad. Las placas inoculadas se sellaron con plástico adherible y se incubaron en forma invertida (tapa hacia abajo) para evitar contaminación. La temperatura de incubación fue de 30°C bajo oscuridad con un periodo de incubación de 72 hrs (Zhang et al., 2012).

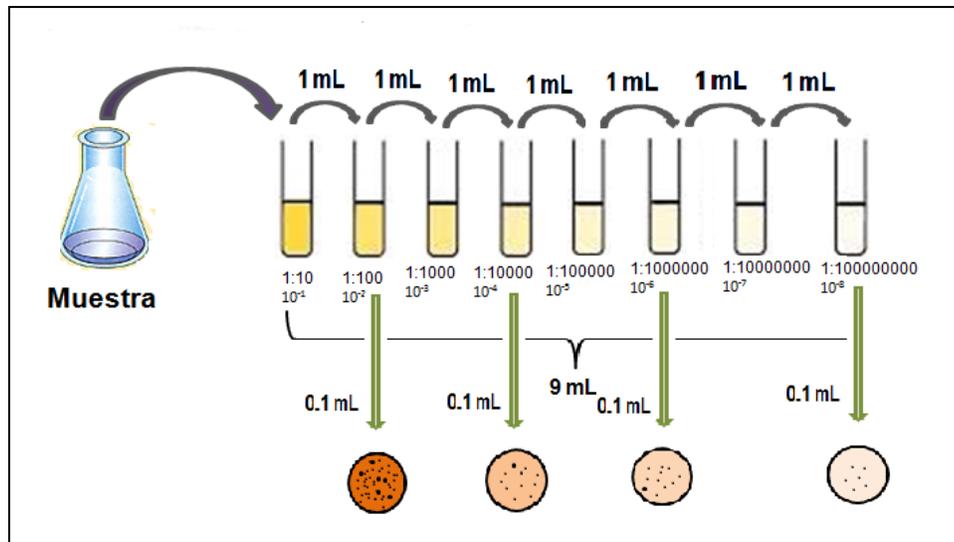


Figura 6. Proceso de aislamiento de los microorganismos.

Se seleccionaron colonias para resiembra que presentaron mayor crecimiento en placa. Una vez que las colonias fueron separadas, se resembraron en nuevas cajas de Petri con AE e incubaron a 72 h en oscuridad (Pérez-Sánchez et al., 2011). Para aumentar la posibilidad de obtener cepas puras, se efectuaron nueve resiembras bajo las condiciones antes mencionadas.

5.4.3 Ensayos de emulsificación y degradación

Se efectuaron ensayos de emulsificación y degradación para todas las cepas bacterianas aisladas, con la finalidad de seleccionar las mejores cepas para el experimento de degradación de HAPs en microcosmos del suelo.

5.4.3.1 Ensayo de emulsificación. En este ensayo se evaluó la capacidad emulsificante de las cepas aisladas en medio líquido, para esto se recurrió a la técnica reportada por Ibn-Abubakar et al. (2012), cada cepa aislada fue inoculada en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de MME esterilizado y 1 ml de petróleo como fuente de carbono. Las muestras se incubaron por 7 días a 30°C y 150 rpm en oscuridad, asimismo, se prepararon matraces con MME y petróleo sin inóculo como testigo.

5.4.3.2 Capacidad degradativa de HAPs. Las cepas aisladas fueron inoculadas en cajas de Petri con AE y petróleo como fuente de carbono. El inóculo se incubó por 72 h a 30°C en oscuridad. Cada 24 h se observó el crecimiento de las colonias bacterianas. Para determinar la capacidad degradativa se midió la dispersión de las colonias en el

contaminante y la disminución de los halos de petróleo. Las muestras se compararon con el testigo (Zeng et al., 2010).

5.4.4 Inactivación de las cepas bacterianas aisladas

En la inactivación de las cepas bacterianas aisladas se procedió a conservarlas en criogenia. Para su conservación se preparó una solución con glicerol al 50% y se esterilizó por 15 min a 121°C. Con un asa se tomaron colonias bacterianas de las placas de Petri y se añadieron a tubos Eppendorf que contenían glicerol. Las 23 cepas aisladas se almacenaron a una temperatura de $-90 \pm 3^\circ\text{C}$ para su inactivación y preservación.

5.4.5 Selección de la cepa bacteriana para el consorcio

Una vez seleccionadas las cepas bacterianas mediante ensayos visuales de biodegradación y emulsificación, se realizó un experimento en microcosmos del suelo con cada una de las cepas, exponiéndolas a diferentes concentraciones del contaminante.

Microcosmos del suelo. Para el establecimiento de los microcosmos se tomó un suelo representativo del sitio en donde se recolectaron las muestras para la extracción de cepas bacterianas con capacidades de degradar HAPs. Se verificó que el suelo colectado no estuviera contaminado de HAPs. Por cada tratamiento se colocaron 50 g de suelo seco en frascos de vidrio de 135 ml, posteriormente se ajustaron a una humedad del 80% y una relación C:N:P de 100:10:1 (Li et al., 2010). El suelo fue esterilizado por 45 min, una vez que las muestras se temperaron se añadió petróleo a tres distintas concentraciones de HAPs (13.10, 24.15 y 47.49 mg/kg). Cada muestra fue homogenizada vigorosamente. Por último se adicionaron 2 ml de inóculo de cada cepa bacteriana (3.2×10^8 UFC/ml). Las muestras fueron incubadas por 80 días en oscuridad a 30°C (Manli et al., 2013).

Diseño experimental. El diseño experimental utilizado para comprobar la degradación de HAPs por metabolismo bacteriano fue un diseño factorial 4X3, con un testigo abiótico para cada concentración y tres réplicas por tratamiento. El número de tratamientos está dado por el producto de los factores de variación, por lo tanto en este diseño se tienen 12 tratamientos y un control abiótico para cada concentración. Se efectuaron tres replicas para fines estadísticos (Cuadro 7). Considerando cuatro cepas bacterianas y tres concentraciones de HAPs.

Cuadro 7. Tratamientos para evaluar la degradación bacteriana de HAPs en microcosmos.

Tratamiento	Factor 1 (bacteria)	Factor 2 (concentración HAPs)
T1	T	[1]
T2	T	[2]
T3	T	[3]
T4	A	[1]
T5	B	[1]
T6	C	[1]
T7	D	[1]
T8	A	[2]
T9	B	[2]
T10	C	[2]
T11	D	[2]
T12	A	[3]
T13	B	[3]
T14	C	[3]
T15	D	[3]

T: Testigo, A: SE A/04, B: SE B/02, C: SE B/08, D: SA 2/09. [1]: 13.1 mg/kg ss [2]: 24.2 mg/kg ss [3]: 47.3 mg/kg ss

5.5 Determinación de HAPs residuales

Los procedimientos para la extracción de HAPs del suelo y limpieza para su caracterización se mencionan abajo.

Extracción: Se aplicó la extracción con solventes. En un tubo de ensayo de 50 ml se pesaron 2 ± 0.3 g de suelo, luego se adicionaron 15 ml de la mezcla de solventes acetona:diclorometano con una relación de volumen 1:5. Las muestras fueron sonicadas en un baño de ultrasonido (BRANSON, modelo 1800) por 40 min a 15°C. El procedimiento se realizó dos veces, obteniendo un volumen total de 30 ml de extracto (Song et al., 2002). De acuerdo a Chen et al. (2010), los extractos fueron colocados en tubos para centrifuga de 50 ml y centrifugados a 5000 rpm por 15 min en una centrifuga refrigerada a 15°C (HERMLE modelo Z 36K). El sobrenadante fue concentrado a 2 ml en un rotavapor (BÜCHI modelo R,215, V-855, B-491), a 50 rpm al vacío y una temperatura de 55°C. La muestra concentrada fue resuspendida en 2 ml de ciclohexano y almacenada en refrigeración a -4°C hasta su limpieza (Mao et al., 2012).

Limpieza: La limpieza se realizó para eliminar interferencias que provocan lecturas erróneas, y prolongar la vida útil de la columna del HPLC. Para ello se realizó una extracción en fase sólida (SPE), con cartuchos Supelclean LC-18 SPE de 6 ml empacados con 1 g de sílice gel marca SUPELCO (Siemers et al., 2015). Cada cartucho se activó con 2 ml de acetonitrilo grado HPLC, inmediatamente se añadieron 2 ml de ciclohexano y antes de terminarse de filtrar se agregó la muestra de HAPs resuspendida en ciclohexano. La muestra se eluyó con 15 ml de mezcla diclorometano:hexano (2:3)

(Tian et al., 2008). El eluyente de cada muestra fue colectado y concentrado en rotavapor como se menciona arriba. Finalmente el concentrado fue resuspendido en 2 ml de acetonitrilo y se almacenó bajo refrigeración a -4°C hasta su análisis por HPLC.

5.6 Identificación taxonómica de las cepas bacterianas

5.6.1 Pruebas fenotípicas

Tinción de Gram. La tinción de Gram se realizó de acuerdo a lo reportado por Pérez-Sánchez et al. (2011).

Morfología en microscopio óptico. Cada cepa bacteriana fue observada en microscopio óptico con aceite de inmersión con el fin de estudiar la morfología de cada cepa.

5.6.2 Pruebas Genotípicas

Las pruebas genotípicas se realizaron mediante técnicas moleculares para identificar las especies bacterianas que presentan capacidad para degradar HAPs.

5.6.2.1 Extracción de ADN bacteriano. Las células bacterianas se cultivaron en 50 ml de caldo Luria Bertani a 30°C bajo oscuridad por una noche. El ADN genómico fue extraído de acuerdo al método de Sambrook & Russell (2001), con algunas modificaciones, para ello se colocaron 1.5 ml de cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 3 min, posteriormente se vertió el sobrenadante, al fondo quedaron las células bacterianas. Se añadieron 600 µl de tampón TE 1X (tris 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) como solución amortiguadora. La lisis celular se realizó añadiendo 70 µl de SDS al 20%, 20 mg de lisozima y 20 µl de RNAsa, se mezcló vigorosamente y se incubó a 40°C durante 1 h.

Luego se añadieron 90 µl de CTAB/NaCl 5M y se incubó nuevamente a 65°C por 20 min. Cada muestra fue centrifugada a 10,000 rpm por 3 min y se recolectó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf, 800 µl de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) frío se adicionaron, la muestra fue homogenizada y centrifugada a 10,000 rpm durante 3 min. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y fue transferido a otro tubo Eppendorf, asimismo se añadieron 800 µl de fenol:cloroformo (24:1), nuevamente se volvió a homogenizar y centrifugar a 10,000 rpm durante 3 min, luego se retiró el sobrenadante y se colocó a otro tubo Eppendorf, al cual se le añadieron 500 µl de alcohol absoluto frío y se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 min para precipitar el ADN. Por último, se añadieron

500 µl de alcohol al 70% para limpiar el tubo de sales residuales y ADN, el alcohol fue evaporado del tubo a temperatura ambiente, una vez seco se añadieron 50 µl de agua desionizada esterilizada para preservar el ADN genómico bajo congelación a -20°C hasta su uso.

5.6.2.2 Amplificación por PCR. La amplificación del gen 16S rARN de cada cepa bacteriana se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los cebadores universales (Borneman et al 1996) Eu 530F (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG GAC CCG CGG-3') y Eu 1449R (5'-TGA CTG ACT GAG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'). Las reacciones de la PCR se realizaron con un volumen total de 50 µl que contenía 25 µl de Master Mix (Vivantis), 5 µl de cada primer (20 pmol), 0.5 µl de MgCl₂, 3 µl de ADN genómico y el resto de agua desionizada estéril. También se preparó un control negativo que difiere de las otras reacciones por la ausencia de ADN genómico, junto con un control positivo de ADN genómico de la bacteria *Pseudomonas* sp.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf Mastercycler epGradient 5341), los parámetros utilizados para la amplificación del ADN fueron: 5 min a 95°C inicial y 30 ciclos de desnaturalización (1 min a 95°C), hibridación (45 s a 55°C) y extensión (1:30 min a 72°C), seguido de una extensión de 5 min a 72°C. La integridad del producto de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% por tinción con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador UV.

5.6.2.3 Análisis filogenético. El fragmento 16S rARN amplificado se envió a secuenciar a Macrogen, Korea. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de base de datos utilizando el sistema BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Las secuencias de las bacterias fueron enviadas a la base de datos de secuencia genética en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de nucleótidos del 16S rARN fueron alineadas con las secuencias publicadas en la base de datos GenBank utilizando software de comparación NCBI BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.6.3 Análisis RFLP

Se añadieron 15 µl de los productos de la PCR y se digirieron con las enzimas de restricción Hinf 1 y ECO 1, se incubaron según las instrucciones del fabricante. Después de la digestión el ADN se corrió por electroforesis en gel a 50 V durante 4 h, Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y luego se visualizaron en un transiluminador UV.

5.7 Biodegradación de HAPs por *P. ostreatus* en cultivo líquido

5.7.1 Preparación del inóculo

El organismo utilizado fue la cepa de *Pleurotus ostreatus* ATCC 38540 crecida en agar papa dextrosa (PDA) (Difco, Detroit, MI, USA). Se tomó una pequeña parte del micelio fúngico y se sembró en cajas de Petri que contenían PDA previamente esterilizado, el inóculo se incubó en oscuridad a una temperatura de 27°C. Cuando el micelio alcanzó el borde de la caja de Petri se realizaron cortes cilíndricos del micelio de aproximadamente 5 mm de diámetro. Se transfirieron 10 trozos de micelio a matraces Erlenmeyer (250 ml) que contenían 100 ml de medio mínimo para basidiomicetos y se llevaron a incubación a 27°C con agitación a 150 rpm en oscuridad por 10 días antes de su uso (Ting, et al., 2011).

5.7.2 Diseño experimental

El experimento se realizó en medio líquido por lo que se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio mínimo para basidiomicetos e inóculo de *P. ostreatus* de 10 días de incubación. El diseño experimental fue de bloques completamente al azar con tres tratamientos, concentraciones de HAPs de 25.994 ± 0.28 , 49.006 ± 0.28 y 80.051 ± 0.55 mg/l.

Para solubilizar los HAPs presentes en el crudo de petróleo, se añadieron 1000 mg/l de Tween 80. Se manejó un control abiótico para evaluar la remoción de HAPs por causas de naturaleza abiótica. Cada tratamiento se preparó por triplicado. Todos los tratamientos se incubaron en oscuridad a 27°C y 150 rpm con un tiempo de incubación de 15 días.

5.7.3 Extracción de HAPs

Se tomaron 10 ml de cultivo y se añadieron a un embudo de separación, luego fueron adicionados 30 ml de hexano y se agitó vigorosamente por 3 min. Cada extracto se recolectó en viales color ámbar, se realizaron dos extracciones por muestra. Los extractos fueron concentrados en rotavapor, por último cada muestra concentrada fue resuspendida en ciclohexano, posteriormente se realizó la limpieza del extracto, concentración y resuspensión como se mencionó con anterioridad. Las muestras fueron almacenadas en viales color ámbar a -4°C hasta su análisis.

El micelio fue lavado con acetona y secado a 55°C por 24 h, luego 1 g aprox. de micelio seco fue colocado en un tubo de ensaye y los HAPs fueron extraídos por sonicación, como se indicó arriba. La concentración, limpieza y resuspensión del extracto se llevó a cabo como se mencionó con anterioridad. Las muestras fueron preservadas a -4°C hasta su análisis. La determinación de HAPs residuales por HPLC en el caldo de cultivo y en el micelio se realizó bajo las condiciones ya mencionadas.

5.8 Formación del consorcio bacteria- *P. ostreatus*

5.8.1 Preparación del cultivo bacteriano

Se tomaron 100 µl del cultivo preservado a 80°C en glicerol y se añadieron en 50 ml de ME esterilizado, después se incubó a 30°C bajo oscuridad con agitación de 150 rpm durante 5 días. Una vez activada la cepa bacteriana se tomaron 2 ml del inóculo y se añadieron en 200 ml de ME esterilizado. El cultivo se incubó por 2 días y se realizó la cuenta microbiana.

5.8.2 Preparación del cultivo fúngico

Se inoculó micelio de *P. ostreatus* en 150 ml de MMB y se incubó a 27°C durante 10 días a 150 rpm en oscuridad. Por otra parte, 10 g de sustrato hidratado, una mezcla de rastrojo de maíz: pulpa de café (1:1) fueron colocados en frascos de vidrio con tapa de rosca para ser esterilizados a 121°C por 60 min. El inóculo de *P. ostreatus* incubado por 10 días se molió en un mezclador en condiciones estériles, luego 1 ml de ésta suspensión fue añadido al sustrato esterilizado. El sustrato inoculado se incubó en oscuridad a 27°C durante 6 días para obtener el crecimiento de biomasa fúngica.

5.8.3 Diseño experimental del consorcio bacteria-*P. ostreatus*

El microcosmos del suelo se estableció para evaluar la biodegradación de HAPs tanto por el consorcio conformado por la mejor cepa bacteriana- *P. ostreatus* como por cada microorganismo. Ésta evaluación se hizo bajo un diseño factorial 3X3X2, con 18 tratamientos y sus respectivos controles abióticos. Los factores de variación fueron los agentes biodegradadores, es decir *P. ostreatus*, la cepa bacteriana y el consorcio de ambos, el tiempo de incubación (50, 80 y 110 días) y la concentración del contaminante (138.35 y 268.23 mg/kg). Para el microcosmos con la cepa bacteriana se añadieron 50 g de suelo a frascos de 135 ml, ajustando la humedad a 70% y la relación C:N:P fue de 100:10:1. Las muestras se esterilizaron a 121°C por 60 min. Se contaminó el suelo

artificialmente a concentraciones de HAPs de 138.35 y 268.23 mg/kg presentes en crudo de petróleo y se homogenizó. Por último se añadieron 3 ml de inóculo bacteriano con una concentración de 3.2×10^8 UFC/ml posteriormente las muestras fueron incubadas a 30°C bajo oscuridad a tres periodos de incubación.

Para el microcosmos con *P. ostreatus* y en consorcio con la bacteria, 40 g de suelo y se colocaron en un frasco de 135 ml. La humedad del suelo fue del 70% y la relación C:N:P 100:10:1. Luego los frascos fueron esterilizados a 121°C durante 60 min. 10 g de sustrato invadido por micelio de *P. ostreatus* crecido durante 10 días fueron añadidos a cada frasco. Para preparar el consorcio fueron añadidos 3 ml de inóculo bacteriano, todos los tratamientos se incubaron por 50, 80 y 110 días a 30°C bajo oscuridad. La extracción y cuantificación de los HAPs se llevó a cabo como se describió con anterioridad.

5.9 Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la separación de medias por prueba de Tukey ($P < 0.05$), (Cuadro 8), el software utilizado fue SAS versión 9.0.

Cuadro 8. Tratamientos para evaluar la degradación de HAPs por el consorcio bacteria-*P. ostreatus*.

Tratamiento	Factor (b) Inoculo	Factor (c) Concentración mg/kg	Factor (a) Tiempo/ días
T1	PLEU	138.35	50
T2	PLEU	268.23	50
T3	PLEU	138.35	80
T4	PLEU	268.23	80
T5	PLEU	138.35	110
T6	PLEU	268.23	110
T7	BACT	138.35	50
T8	BACT	268.23	50
T9	BACT	138.35	80
T10	BACT	268.23	80
T11	BACT	138.35	110
T12	BACT	268.23	110
T13	CONS	138.35	50
T14	CONS	268.23	50
T15	CONS	138.35	80
T16	CONS	268.23	80
T17	CONS	138.35	110
T18	CONS	268.23	110
T19	CONT1	138.35	50
T20	CONT1	268.23	50
T21	CONT1	138.35	80
T22	CONT1	268.23	80
T23	CONT1	138.35	110
T24	CONT1	268.23	110
T25	CONT2	138.35	50

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Tratamiento	Factor (b) Inoculo	Factor (c) Concentración mg/kg	Factor (a) Tiempo/ días
T26	CONT2	268.23	50
T27	CONT2	138.35	80
T28	CONT2	268.23	80
T29	CONT2	138.35	110
T30	CONT2	268.23	110

PLEU: *P. ostreatus* BACT: bacteria CONS: bacteria-*P. ostreatus* CONT1: Suelo sin inoculo CONT2: Suelo y sustrato sin inoculo

VI RESULTADOS

6.1 Caracterización fisicoquímica del suelo

Las características fisicoquímicas del suelo se muestran en el cuadro 9. El suelo estudiado presentó una textura franco-limoso C1.

Cuadro 9. Propiedades fisicoquímicas del suelo usado en microcosmos.

Parámetro	
Arena (%)	20.2 ± 1.6
Limo (%)	63.6 ± 5.1
Arcilla (%)	16.2 ± 0.8
Humedad (%)	70 ± 5
Densidad aparente (g/cm ³)	1.12 ± 0.1
Densidad real (g/cm ³)	2.36 ± 0.1
Materia orgánica (%)	2.37 ± 0.1
pH	7.24 ± 0.3
N (%)	0.14 ± 0.0
P (mg/kg)	17 ± 0.6

6.2 Curva de calibración

En la Fig. 7 se muestran los cromatogramas de la separación de los HAPs, mientras que el Cuadro 10 muestra los tiempos de retención de cada HAP, así como la λ de mayor sensibilidad y la ecuación de la recta de regresión. Con el FLD se detectaron la mayoría de los analitos, mientras que con el DAD se identificó el acenaftileno a una λ de 230 nm.

Cuadro 10. Tiempo de retención de cada HAP, ecuación de la recta de regresión y valor de R².

HAP	Tiempos de retención (min)				Ec. de regresión	R ²
	*DAD 230	**FLD 460	FLD 352	FLD 420		
Naftaleno			2.167		Y= 0.6251 + 53.406	0.9933
Acenaftileno	2.574				Y= 0.0785 + 0.2693	0.9866
Acenafteno			3.572		Y= 1.1032 - 14.73	0.9989
Fluoreno			3.819		Y= 1.4622 + 11.814	0.9983
Fenantreno			4.220		Y= 3.8031 + 38.133	0.9979
Antraceno		5.182			Y= 1.2941 + 6.3974	0.9979
Fluorantreno		6.116			Y= 1.2105 + 3.1829	0.9971
Pireno				6.483	Y= 2.8398 + 14.403	0.9975
Benzo[a]Antraceno				8.274	Y= 5.2206 + 15.197	0.9972
Criseno				8.742	Y= 2.1926 + 5.8679	0.9927
Benzo [b]Fluorantreno		10.444			Y= 4.9239 + 13.734	0.9976
Benzo[k]Fluorantreno				11.295	Y= 13.398 + 78.773	0.9965
Benzo[a]pireno				12.251	Y= 15.294 + 44.525	0.9981
Benzo[g,h,i]Perileno				13.937	Y= 2.3234 - 4.4772	0.9945
Indeno[1,2,3-cd]Pireno				14.403	Y= 4.4561 - 5.0593	0.9952

*DAD: Detector de arreglo de diodos. **FLD: Detector de fluorescencia.

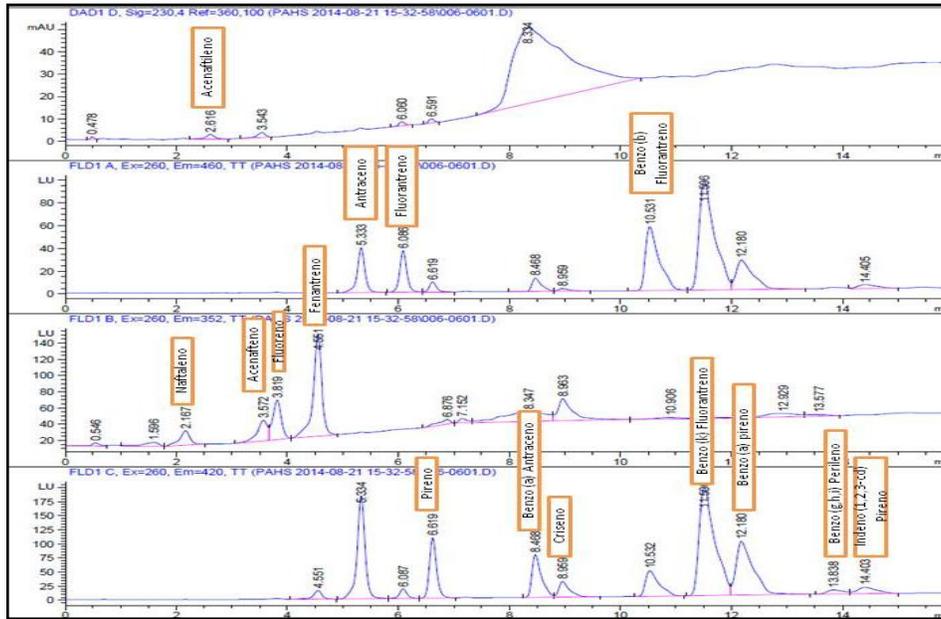


Figura 7. Separación de HAPs por HPLC-DAD/FLD.

6.3 Caracterización de HAPs en el crudo de petróleo

El crudo de petróleo tuvo 0.2% de HAPs, el perfil de HAPs mostró 14 compuestos aromáticos, los más abundantes fueron el acenafileno>naftaleno>acenafteno>fenantreno, la suma de estos cuatro compuestos representa el 84.14% del total de HAPs (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentración de HAPs en el crudo de petróleo.

HAP	mg HAPs/kg petróleo	% HAP
Acenafileno (ACI)	105.56 ± 0.71	52.79 ± 0.35
Naftaleno (NAF)	34.40 ± 0.35	17.22 ± 0.18
Acenafteno (ACE)	16.20 ± 0.28	8.11 ± 0.14
Fenantreno (FEN)	12.00 ± 0.28	6.02 ± 0.14
Antraceno (ANT)	6.70 ± 0.42	3.37 ± 0.21
Fluorantreno (FLT)	2.10 ± 0.28	1.07 ± 0.14
Criseno (CRI)	3.60 ± 0.28	1.79 ± 0.14
Pireno (PIR)	2.30 ± 0.28	1.18 ± 0.14
Benzo[a]antraceno (BaA)	3.00 ± 0.14	1.50 ± 0.07
Benzo[b]fluorantreno (BbF)	2.00 ± 0.14	0.99 ± 0.07
Benzo[k]fluorantreno (BkF)	1.00 ± 0.07	0.40 ± 0.03
Benzo[a]pireno (BaP)	2.00 ± 0.28	1.01 ± 0.14
Benzo[g,h,i]perileno (BghiP)	5.50 ± 0.28	2.73 ± 0.14
Indeno[1,2,3-cd]pireno (I123-cdP)	3.60 ± 0.14	1.81 ± 0.07
HAPs Totales	200.0 ± 3.96	100.00

Los datos se representan como medias ± SD.

6.4 Selección de la cepa bacteriana

6.4.1 Caracterización fenotípica y ensayos de emulsificación y degradación de las cepas bacterianas

De suelos contaminados por hidrocarburos fueron aisladas 23 cepas bacterianas, de las cuales 20 fueron Gram negativas con forma de cocos, además todas las colonias aisladas presentaron color blanco (Cuadro 12).

Cuadro 12. Caracterización fenotípica de las bacterias aisladas, y ensayos de emulsificación y degradación del crudo de petróleo.

Cepa	Origen	Gram	Forma	emulsificación	degradación
SA2-01	Suelo	-	Cocos	0	A
SA2-02	Suelo	+	Bacilos	0	A
SA2-03	Suelo	+	Cocos	0	A
SA2-04	Suelo	-	Cocos	2	A
SA2-05	Suelo	-	Cocos	2	B
SA2-06	Suelo	-	Cocos	2	A
SA2-07	Suelo	-	Cocos	2	B
SA2-08	Suelo	-	Cocos	1	A
SA2-09	Suelo	-	Cocos	2	C
SA2-10	Suelo	-	Cocos	1	A
SA2-11	Suelo	-	Cocos	2	B
SEB-01	Sedimento	-	Cocos	1	B
SEB-02	Sedimento	-	Cocos	2	C
SEB-03	Sedimento	+	Cocos	2	C
SEB-04	Sedimento	-	Cocos	1	A
SEB-05	Sedimento	-	Cocos	2	B
SEB-06	Sedimento	-	Cocos	1	B
SEB-07	Sedimento	-	Cocos	1	B
SEB-08	Sedimento	-	Cocos	2	C
SEA-01	Suelo	-	Cocos	1	A
SEA-02	Suelo	-	Cocos	1	A
SEA-03	Suelo	-	Cocos	1	A
SA-04	Suelo	-	Cocos	2	C

(+): Gram positivo, (-): Gram negativo, (0): Sin emulsificación, (1): Baja emulsificación, (2): Alta emulsificación, (A): Baja degradación, (B): Mediana degradación and (C): Alta degradación.

La emulsificación y la degradación se estimaron visualmente (Fig. 8), de las 23 cepas evaluadas 11 tuvieron alta emulsificación, nueve presentaron baja emulsificación y el resto no emulsificó. En lo que concierne al ensayo de degradación de HAPs, 11 cepas mostraron baja degradación, mientras que siete presentaron degradación moderada y solo cinco cepas tuvieron degradación alta del petróleo (Cuadro 12). Las cepas SEB-02,

SEB-08, SA-04 y SA2-09 fueron seleccionadas para estudiar su capacidad para degradar HAPs en microcosmos.

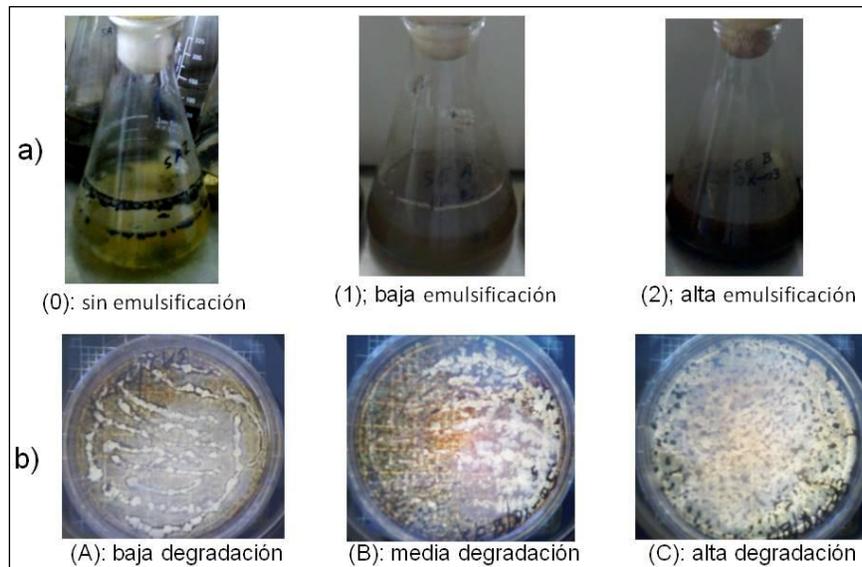


Figura 8. Parámetros visuales utilizados para medir el test de (a) emulsificación y (b) degradación.

6.4.2 Identificación filogenética

La secuencia de nucleótidos correspondientes a 1000 pb del gen 16S ARNr de los aislados se determinó en ambas direcciones (5' a 3' y de 3' a 5'). Así, la alineación de la secuencia en comparación con las secuencias reportadas para este gen 16S en la base de datos del GenBank del NCBI mostró que la cepa SEB-02 tiene total similitud (100%) con el gen 16S rARN de *Ochrobactrum intermedium*, que la cepa SEB-08 tiene total similitud (100%) con el gen 16S rARN de *Pandoraea pnomenusa* y que la cepa SA-04 mostró una alta similitud (99%) con *Ochrobactrum* sp. (Fig. 9). La filogenia de la cepa SA2-09 no se pudo establecer debido a que no se logró la amplificación del ADN.

6.4.3 Degradación de HAPs totales en el experimento de microcosmos

La degradación de los HAPs evaluada a tres concentraciones para cada una de las cuatro cepas seleccionadas, en microcosmos, después de 80 días de incubación se muestra en la Fig. 10. El tipo de cepa bacteriana tuvo un efecto altamente significativo ($p > 0.0001$) sobre la degradación de HAPs totales a las tres concentraciones de contaminantes probadas, cuando la concentración fue de 13.10 ± 0.5 mg de HAPs/kg de suelo, la cepa con mayor capacidad degradativa fue SA2-09 al eliminar 10.83 ± 0.5 mg/kg de HAPs (82.7%), seguida por *Ochrobactrum* sp. que logró degradar 9.06 ± 0.2 mg/kg (69.2%),

mientras que no hubo diferencia significativa en las tasas de degradación de *O. intermedium* y *P. pnomenusa*, que alcanzaron a degradar 4.51 ± 0.6 y 4.27 ± 0.2 mg de HAPs/kg de suelo (34.4 y 32.6%), respectivamente.

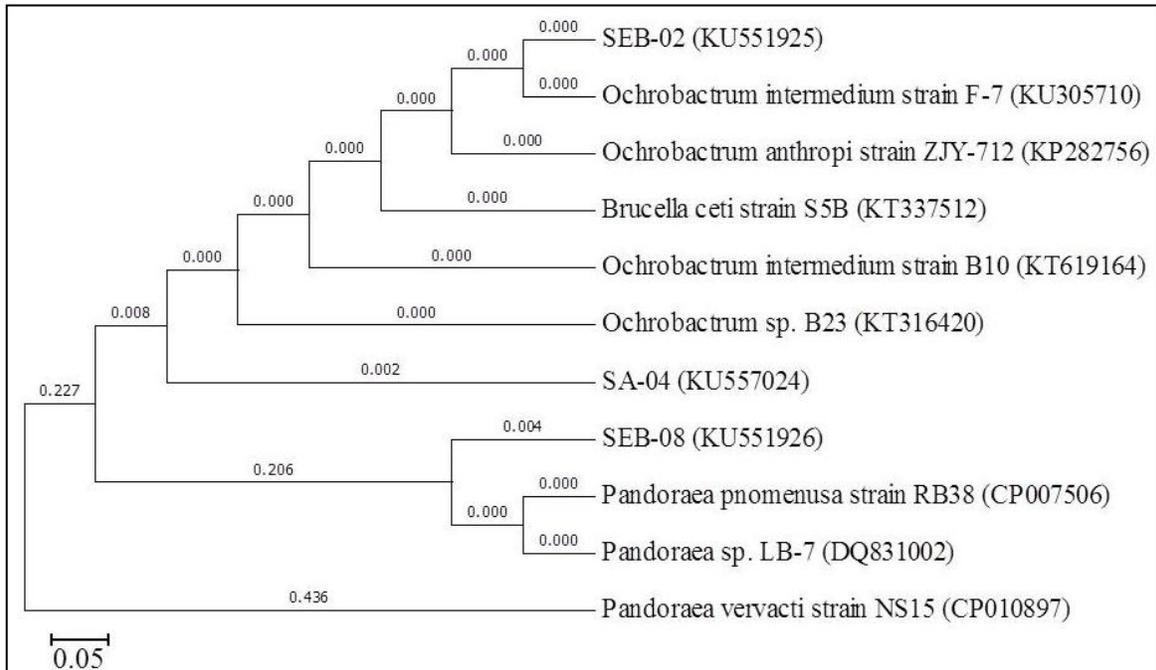


Figura 9. Árbol filogenético de las cepas SEB-02, SEB-08 y SA-04 (la barra de escala representa 0.05 secuencia de divergencia, los números de accesión de las secuencias de ARNr se muestran en los paréntesis).

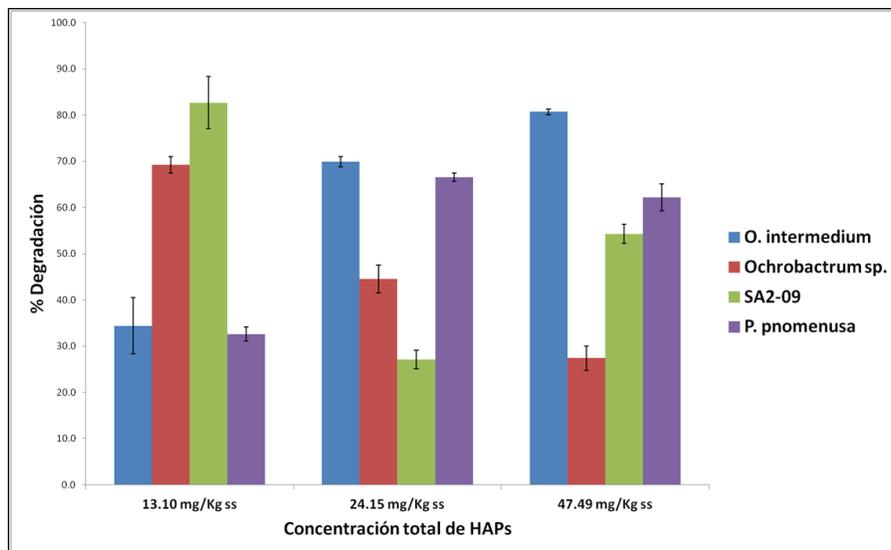


Figura 10. Degradación de diferentes concentraciones de HAPs por las cepas seleccionadas después de 80 días a 30°C.

En el caso de la concentración de 24.15 ± 0.3 mg de HAPs/kg de suelo, el mejor agente degradante fue *O. intermedium* al eliminar 16.88 ± 0.3 mg/kg (69.9%), seguido por *P. pnomenusa* que degradó 16.07 ± 0.2 mg/kg, mientras que *Ochrobactrum* sp. se vio afectada por el aumento del contaminante y removió 10.74 ± 0.5 mg/kg (44.5%), así la cepa SA2-09 presentó la menor degradación, 6.55 ± 0.5 mg de HAPs /kg (27.1%). Por último, a la concentración de 47.49 ± 0.7 mg de HAPs/kg de suelo, también *O. intermedium* fue el mejor tratamiento al degradar 38.34 ± 0.3 mg/kg (80.7%), seguida por *P. pnomenusa* que degradó 29.53 ± 0.2 mg/kg (62.2%), mientras que la cepa SA2-09 degradó 25.79 ± 0.5 mg/kg (54.3%), y *Ochrobactrum* sp. 13.00 ± 0.8 mg/kg (27.4%).

6.4.4 Degradación de cada HAP

A la concentración de 13.10 ± 0.5 mg de HAPs/kg de suelo, después de 80 días de incubación los HAPs mayoritariamente eliminados fueron: acenaftileno 8.29 ± 0.1 mg/kg (95%), 1.10 ± 0.0 mg/kg de naftaleno (62.3%), antraceno 0.6 ± 0.0 mg/kg (88.2%), benzo[g,h,i]perileno 0.42 ± 0.0 mg/kg, (87.5%) y el pireno 0.09 ± 0.0 mg/kg (100%). Todas las cepas fueron capaces de degradar HAPs de BPM (2 y 3 anillos) con porcentajes de degradación que fluctuaron entre el 29.9 y el 70.2%, mientras que los de APM (4 a 6 anillos) se degradaron de 46.9 a 63.3%, (Cuadro 13). En general, la cepa más hábil para degradar tanto HAPs de BPM como de APM fue la SA2/09, aunque no hay diferencia significativa en las tasas de degradación de HAPs de APM entre *Ochrobactrum* sp. y SA2/09.

La concentración de HAPs de 24.15 ± 0.3 mg/kg en suelo fueron eliminados hasta 11.48 ± 0.3 mg/kg (80.7%) de ACI, 2.24 ± 0.1 mg/kg (68.9%) de NAF, 1.12 ± 0.0 mg/kg (100%) de FEN, 0.96 ± 0.0 mg/kg (83.5%) de ACE y 0.63 ± 0.0 mg/kg (65.6%) de ANT, esto con respecto a los HAPs de BPM. Así *O. intermedium* tuvo las tasas más altas de degradación de NAF, ACE y ANT, mientras que *Ochrobactrum* sp. fue la mejor para degradar FEN y *P. pnomenusa* para eliminar ACI y ANT. En general, los HAPs de BPM, cuya concentración fue de 20.70 ± 0.3 mg/kg fueron biodegradados de un 6.7 a un 70.7%, siendo el mejor biodegradador *O. intermedium*, seguido por *P. pnomenusa* (67.4%).

En relación a los HAPs de APM, las cuatro cepas fueron capaces de eliminar totalmente el FLT (0.24 mg/kg), el 100% de PIR (0.29 mg/kg) fue eliminado por *P. pnomenusa*, el BaP fue degradado en un 95.7% (0.22 mg/kg) por *P. pnomenusa* y 95.5% (0.21 mg/kg)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

del BbF fue biodegradado por SA2/09. Además *P. pnomenusa* eliminó 0.51 mg/kg (68.9%) de BghiP y *O. intermedium* degradó 0.50 mg/kg (73.5%) de BaA (Cuadro 14).

Cuadro 13. Degradación de cada HAP por las bacterias seleccionadas después de 80 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 13.1mg/kg.

HAP	Anillos	Control mg/kg	<i>O. intermedium</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp.	SA2/09	<i>P. pnomenusa</i>
			HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg
NAF	2	1.77 ± 0.1	0.13 ± 0.0(7.3) _c	0.37 ± 0.0(20.9) _b	0.90 ± 0.0(50.8) _a	1.10 ± 0.0(62.1) _a
ACI	3	8.72 ± 0.1	3.19 ± 0.1(36.6) _b	7.07 ± 0.2(81.1) _a	8.29 ± 0.1(95.1) _a	1.56 ± 0.1(17.9) _c
ACE	3	0.46 ± 0.1	0.31 ± 0.0(67.4) _a	0.12 ± 0.0(26.1) _b	0.11 v 0.0(23.9) _b	0.33 ± 0.0(71.7) _a
ANT	3	0.68 ± 0.1	0.19 ± 0.0(27.9) _c	0.60 ± 0.0(88.2) _a	0.59 ± 0.0(86.8) _a	0.49 ± 0.0(72.1) _b
BPM totales	2 y 3	11.63 ± 0.3	3.82 ± 0.0(32.8)_c	8.16 ± 0.1(70.2)_b	9.89 ± 0.0(85.0)_a	3.48 ± 0.1(29.9)_c
CRI	4	0.27 ± 0.0	0.15 ± 0.0(55.6) _a	0.13 ± 0.0(48.1) _c	0.16 ± 0.0(59.3) _a	0.10 ± 0.0(37.0) _b
PIR	4	0.09 ± 0.0	0.02 ± 0.0(22.2) _b	0.00 ± 0.0(0.0) _c	0.09 ± 0.0(100) _a	0.03 ± 0.0(33.3) _b
BaA	4	0.14 ± 0.0	0.02 ± 0.0(14.3) _b	0.02 ± 0.0(14.3) _b	0.05 ± 0.0(35.7) _a	0.01 ± 0.0(7.1) _b
BbF	5	0.15 ± 0.0	0.02 ± 0.0(13.3) _c	0.14 ± 0.0(93.3) _a	0.10 ± 0.0(66.7) _b	0.13 ± 0.0(86.7) _a
BkF	5	0.05 ± 0.0	0.02 ± 0.0(40.0) _b	0.04 ± 0.0(80.0) _a	0.00 ± 0.0(0.0) _c	0.00 ± 0.0(0.0) _c
BaP	5	0.07 ± 0.0	0.02 ± 0.0(28.6) _b	0.01 ± 0.0(14.3) _b	0.01 ± 0.0(14.3) _b	0.04 ± 0.0(57.1) _a
BghiP	6	0.48 ± 0.0	0.34 ± 0.0(70.8) _b	0.42 ± 0.0(87.5) _a	0.41 ± 0.0(85.4) _a	0.37 ± 0.0(77.1) _b
I123-cdP	6	0.22 ± 0.0	0.10 ± 0.0(45.5) _a	0.13 ± 0.0(59.1) _a	0.11 ± 0.0(50.0) _a	0.11 ± 0.0(50.0) _a
APM totales	4 a 6	1.47 ± 0.1	0.69 ± 0.1(46.9)_c	0.89 ± 0.1(60.5)_a	0.93 ± 0.1(63.3)_a	0.79 ± 0.1(53.7)_b
HAPs totales		13.10 ± 0.5	4.51 ± 0.6(34.4)_c	9.06 ± 0.2(69.2)_b	10.83 ± 0.5(82.7)_a	4.27 ± 0.2(32.6)_c

Números en () son % de degradación definida por la siguiente ecuación: (HAP removido*100/control). Los datos se representan como medias ± SD. Las medias en la misma fila con una letra en común no tienen diferencias significativas entre sí (P < 0.05).

A concentraciones de 47.49 mg de HAPs/kg de suelo, *O. Intermedium* fue la cepa más hábil para degradar HAPs de BPM, en el caso de ACI 20.5 mg/kg, que representó el 81.8% del tóxico presente. *P. pnomenusa* también sobresale como la mejor degradadora de NAF al eliminar 6.51 mg/kg. En lo que respecta a los HAPS de APM ambas cepas fueron las más eficientes en la degradación de estos tóxicos, que incluyen hasta 1.01 mg/kg de BghiP, 0.39 mg/kg de PIR y 0.42 mg/kg de BAP (Cuadro 15).

Cuadro 14. Degradación de cada HAP por las bacterias seleccionadas después de 80 días, cuando la concentración de total de HAPs fue de 24.25 mg /kg.

HAP	Anillos	Control mg/kg	<i>O. intermedium</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp.	SA2/09	<i>P. pnomenusa</i>
			HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg
NAF	2	3.25 ± 0.1	2.24 ± 0.1(68.9) _a	0.13 ± 0.0(4.0) _b	0.09 ± 0.0(2.8) _b	0.48 ± 0.1(14.8) _b
ACI	3	14.22 ± 0.1	10.14 ± 0.1(71.3) _b	7.67 ± 0.1(53.9) _c	3.56 ± 0.1(25.0) _d	11.48 ± 0.3(80.7) _a
ACE	3	1.15 ± 0.1	0.96 ± 0.0(83.5) _a	0.13 ± 0.0(11.3) _b	0.04 ± 0.0(3.5) _b	0.24 ± 0.0(20.9) _b
FEN	3	1.12 ± 0.1	0.69 ± 0.0(61.6) _b	0.96 ± 0.0(85.7) _a	0.58 ± 0.0(51.8) _b	1.12 ± 0.0(100) _a
ANT	3	0.96 ± 0.0	0.60 ± 0.0(62.5) _a	0.25 ± 0.0(26.0) _c	0.42 ± 0.0(43.8) _b	0.63 ± 0.0(65.6) _a
BPM totales	2 y 3	20.70 ± 0.3	14.63 ± 0.1(70.7)_a	9.14 ± 0.0(44.2)_c	1.36 ± 0.1(6.7)_d	13.95 v 0.1(67.4)_b
FLT	4	0.24 ± 0.0	0.24 ± 0.0(100) _a	0.24 ± 0.0(100) _a	0.24 ± 0.0(100) _a	0.24 ± 0.0(100) _a
CRI	4	0.38 ± 0.0	0.18 ± 0.0(47.4) _a	0.00 ± 0.0(0.0) _c	0.14 ± 0.0(36.8) _b	0.09 ± 0.0(23.7) _b
PIR	4	0.29 ± 0.0	0.21 ± 0.0(72.4) _b	0.20 ± 0.0(70.0) _b	0.03 ± 0.0(10.3) _c	0.29 ± 0.0(100) _a
BaA	4	0.68 ± 0.0	0.50 ± 0.0(73.5) _a	0.20 ± 0.0(29.4) _b	0.39 ± 0.0(57.4) _a	0.38 ± 0.0(55.9) _a
BbF	5	0.22 ± 0.0	0.18 ± 0.0(81.8) _b	0.13 ± 0.0(59.1) _c	0.21 ± 0.0(95.5) _a	0.11 ± 0.0(50.0) _d
BkF	5	0.04 ± 0.0	0.01 ± 0.0(25.0) _b	0.00 ± 0.0(0.0) _c	0.01 ± 0.0(25.0) _a	0.00 ± 0.0(0.0) _c
BaP	5	0.23 ± 0.0	0.20 ± 0.0(87.0) _b	0.13 ± 0.0(56.5) _c	0.20 ± 0.0(87.0) _b	0.22 ± 0.0(95.7) _a
BghiP	6	0.74 ± 0.0	0.39 ± 0.0(52.7) _b	0.40 ± 0.0(54.1) _b	0.36 ± 0.0(48.6) _b	0.51 ± 0.0(68.9) _a
I123-cdP	6	0.62 ± 0.0	0.34 ± 0.0(54.8) _a	0.28 ± 0.0(45.2) _b	0.29 ± 0.0(46.8) _b	0.30 ± 0.0(48.4) _b
APM totales	4 a 6	3.44 ± 0.2	2.25 ± 0.1(65.4)_a	1.58 ± 0.2(45.9)_b	1.87 ± 0.1(54.4)_b	2.14 ± 0.1(62.2)_a
HAPs totales		24.15 ± 0.3	16.88 ± 0.3(69.9)_a	10.74 ± 0.5(44.5)_c	6.55 ± 0.5(27.1)_d	16.07 ± 0.2(66.5)_b

Números en () son % de degradación definida por la siguiente ecuación: (HAP removido*100/control). Los datos se representan como medias ± SD. Las medias en la misma fila con una letra en común no son significativamente diferentes entre los tratamientos (P < 0.05).

Cuadro 15. Degradación de cada HAP por las bacterias seleccionadas después de 80 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 47.49 mg/kg.

HAP	Anillos	<i>O. intermedium</i> <i>Ochrobactrum</i> sp. SA2/09 <i>P. pnomenus</i>				
		Control mg/kg	HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg	HAP degradado mg/kg
NAF	2	8.18 ± 0.1	6.43 ± 0.1(78.6) _a	1.47 ± 0.2(18.0) _c	2.97 ± 0.2(36.3) _b	6.51 ± 0.0(79.6) _a
ACI	3	25.07 ± 0.2	20.50 ± 0.1(81.8) _a	5.93 ± 0.2(23.7) _c	13.67 ± 0.2(54.5) _b	12.48 ± 0.2(49.8) _b
ACE	3	3.85 ± 0.1	3.33 ± 0.1(88.5) _a	0.97 ± 0.1(25.2) _b	2.64 ± 0.1(68.6) _a	2.73 ± 0.1(70.9) _a
FEN	3	2.86 ± 0.2	2.67 ± 0.0(93.4) _a	2.82 ± 0.0(98.6) _a	2.63 ± 0.0(92.0) _a	2.49 ± 0.0(87.1) _a
ANT	3	1.60 ± 0.1	0.88 ± 0.0(55.0) _a	0.16 ± 0.0(10.0) _c	0.77 ± 0.1(48.1) _b	0.87 ± 0.0(54.4) _a
BPM totales	2 y 3	41.56 ± 0.4	33.81 ± 0.3(81.4)_a	11.35 ± 0.2(27.3)_d	22.68 ± 0.4(54.6)_c	25.08 ± 0.2(60.3)_b
FLT	4	0.51 ± 0.0	0.51 ± 0.0(100) _a	0.07 ± 0.0(13.7) _c	0.40 ± 0.0(78.4) _b	0.51 ± 0.0(100) _a
CRI	4	0.85 ± 0.1	0.53 ± 0.0(62.4) _a	0.13 ± 0.0(15.3) _c	0.40 ± 0.0(47.1) _b	0.60 ± 0.0(70.6) _a
PIR	4	0.55 ± 0.1	0.39 ± 0.1(70.9) _a	0.02 ± 0.0(3.6) _c	0.39 ± 0.0(70.9) _a	0.22 ± 0.0(40.0) _b
BaA	4	0.71 ± 0.1	0.54 ± 0.0(76.1) _a	0.00 ± 0.0(0.0) _c	0.28 ± 0.0(39.4) _b	0.55 ± 0.0(77.5) _a
BbF	5	0.47 ± 0.1	0.41 ± 0.0(87.2) _a	0.18 ± 0.0(38.3) _b	0.33 ± 0.0(70.2) _a	0.33 ± 0.0(70.2) _a
BkF	5	0.18 ± 0.0	0.11 ± 0.0(61.1) _a	0.02 ± 0.0(11.1) _b	0.01 ± 0.0(5.5) _b	0.13 ± 0.0(72.2) _a
BaP	5	0.48 ± 0.0	0.40 ± 0.0(83.3) _a	0.43 ± 0.0(89.6) _a	0.44 ± 0.0(91.7) _a	0.42 ± 0.0(87.5) _a
BghiP	6	1.30 ± 0.1	1.01 ± 0.0(77.7) _a	0.44 ± 0.0(33.8) _c	0.56 ± 0.0(43.1) _b	1.01 ± 0.0(77.7) _a
I123-cdP	6	0.86 ± 0.1	0.62 ± 0.0(72.1) _a	0.34 ± 0.0(39.5) _b	0.31 ± 0.0(36.0) _b	0.67 ± 0.0(77.9) _a
APM totales	4 a 6	5.91 ± 0.5	4.52 ± 0.2(76.5)_a	1.63 ± 0.1(27.6)_d	3.12 ± 0.2(52.8)_b	4.44 ± 0.2(75.1)_a
HAPs totales		47.49 ± 0.7	38.34 ± 0.3(80.7)_a	13.00 ± 0.8(27.4)_d	25.79 ± 0.5(54.3)_c	29.53 ± 0.2(62.2)_b

Números en () son % de degradación definida por la siguiente ecuación: (HAP removido*100)/control. Los datos se representan como medias ± SD. Las medias en la misma fila con una letra en común no son significativamente diferentes entre los tratamientos (P < 0.05).

6.5 Degradación de HAPs por *P. ostreatus* en medio líquido

Los resultados del ensayo de degradación de diferentes concentraciones HAPs, por *P. ostreatus* se muestra en el cuadro 15. A la concentración de 25.994 mg/l se observó una remoción total de FEN, BaA, BkF y I123-cdP, un gran decremento de la concentración en PIR>BbF>CRI>BaP>FLU>BghiP, con porcentajes de degradación de 99.2, 99.1, 98.1, 97.6, 95.8, 91.6% respectivamente. Respecto a la degradación por peso molecular, se registró mayor degradación en HAPs de APM (97.3%), que de BPM (77.7%) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Degradación y bioacumulación de cada HAP por *P. ostreatus* después de 15 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 25.994 mg/l.

HAPs	Anillos	Control mg/l	Biodegradación mg/l	Acumulación intracelular mg/l	Remoción total mg/l
NAF	2	5.197 ± 0.09	1.483 ± 0.03(28.5)	1.346 ± 0.02(25.9)	2.829 ± 0.05(54.4)
ACE	3	3.190 ± 0.05	2.397 ± 0.05(75.1)	0.000 ± 0.00(0.0)	2.397 ± 0.05(75.1)
FEN	3	1.251 ± 0.06	0.151 ± 0.04(12.1)	1.100 ± 0.04(87.9)	1.251 ± 0.00(100)
FLU	3	5.554 ± 0.14	4.684 ± 0.04(84.3)	0.637 ± 0.02(11.5)	5.321 ± 0.02(95.8)
BPM totales	2 y 3	15.192 ± 0.16	8.715 ± 0.10(57.4)	3.083 ± 0.05(20.3)	11.798 ± 0.09(77.7)
CRI	4	2.244 ± 0.06	2.036 ± 0.00(90.7)	0.165 ± 0.01(7.4)	2.201 ± 0.01(98.1)
PIR	4	0.955 ± 0.03	0.622 ± 0.01(65.1)	0.326 ± 0.01(34.1)	0.948 ± 0.00(99.2)
BaA	4	1.020 ± 0.03	0.801 ± 0.02(78.5)	0.219 ± 0.02(21.5)	1.020 ± 0.00(100)
BbF	4	0.783 ± 0.01	0.703 ± 0.00(89.8)	0.073 ± 0.00(9.3)	0.776 ± 0.01(99.1)
BkF	5	0.237 ± 0.02	0.219 ± 0.00(92.4)	0.018 ± 0.00(7.6)	0.237 ± 0.00(100)
BaP	5	0.648 ± 0.04	0.561 ± 0.02(86.6)	0.071 ± 0.02(11.0)	0.632 ± 0.01(97.6)
BghiP	6	2.580 ± 0.04	1.502 ± 0.04(58.2)	0.861 ± 0.05(33.4)	2.363 ± 0.01(91.6)
I123-cdP	6	2.335 ± 0.05	1.381 ± 0.01(59.1)	0.954 ± 0.01(40.9)	2.335 ± 0.00(100)
APM totales	4 a 6	10.802 ± 0.14	7.825 ± 0.02(72.4)	2.687 ± 0.06(24.9)	10.512 ± 0.00(97.3)
HAPs totales		25.994 ± 0.28	16.540 ± 0.12 (63.6)	5.770 ± 0.08(22.2)	22.310 ± 0.09(85.8)

Números en () son % de degradación definida por la siguiente ecuación: (HAP removido*100)/control. Los datos se representan como medias ± SD.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

En cuanto a la remoción total de HAPs se puede apreciar que *P. ostreatus* fue capaz de remover un 85.8 % de 25.994 mg/l en medio líquido, aunque se acumularon intracelularmente un 22.2% en el micelio del hongo, por lo que un 63.6% fue degradado.

A concentraciones de 49.006 mg/l, se observó una degradación total para el BbF, mientras que una alta degradación para FLU>BaP>BaA>BkF>I123-cdP>PIR>FEN>CRI>BghiP con porcentajes de degradación que van desde 99.4, 99.1, 98.8, 98.6, 98.5, 97.2, 95.5, 95.2 y 93.6% respectivamente. A esta concentración, la remoción de HAPs de BPM fue del 88.5%, mientras que para los HAPs de APM la remoción fue del 97.0% (Cuadro 17).

Cuadro 17. Degradación y bioacumulación de cada HAP por *P. ostreatus* después de 15 días, cuando la concentración total de HAPs fue de 49.006 mg/l.

HAPs	Anillos	Control mg/l	Biodegradación mg/l	Acumulación intracelular mg/l	Remoción total mg/l
NAF	2	9.526 ± 0.10	5.476 ± 0.22(57.5)	1.521 ± 0.03(16.0)	6.997 ± 0.19(73.5)
ACE	3	6.266 ± 0.05	3.662 ± 0.05(58.4)	1.948 ± 0.03(31.1)	5.610 ± 0.05(89.6)
FEN	3	2.548 ± 0.03	1.692 ± 0.03(66.4)	0.742 ± 0.02(29.1)	2.434 ± 0.00(95.5)
FLU	3	11.223 ± 0.25	10.883 ± 0.02(97.0)	0.265 ± 0.02(2.4)	11.148 ± 0.00(99.4)
BPM totales	2 y 3	29.563 ± 0.45	21.713 ± 0.22 (73.4)	4.476 ± 0.07(15.1)	26.189 ± 0.11(88.5)
CRI	4	4.338 ± 0.06	3.779 ± 0.03(87.1)	0.350 ± 0.03(8.1)	4.129 ± 0.01(95.2)
PIR	4	2.081 ± 0.08	2.006 ± 0.01(96.4)	0.016 ± 0.00(0.8)	2.022 ± 0.01(97.2)
BaA	4	2.019 ± 0.06	1.664 ± 0.01(82.4)	0.332 ± 0.01(16.4)	1.996 ± 0.01(98.8)
BbF	4	1.520 ± 0.04	1.520 ± 0.00(100)	0.000 ± 0.00(0.0)	1.520 ± 0.00(100)
BkF	5	0.417 ± 0.01	0.276 ± 0.02(66.2)	0.135 ± 0.01(32.4)	0.411 ± 0.01(98.6)
BaP	5	1.408 ± 0.02	1.069 ± 0.01(75.9)	0.326 ± 0.01(23.2)	1.395 ± 0.01(99.1)
BghiP	6	3.018 ± 0.07	1.545 ± 0.02(51.2)	1.279 ± 0.02(42.4)	2.824 ± 0.00(93.6)
I123-cdP	6	4.642 ± 0.05	3.132 ± 0.01(67.5)	1.439 ± 0.01(31.0)	4.571 ± 0.00(98.5)
APM totales	4 a 6	19.443 ± 0.84	14.991 ± 0.03(77.1)	3.877 ± 0.06(19.9)	18.868 ± 0.01(97.0)
HAPs totales		49.006 ± 0.28	36.704 ± 0.25(74.9)	8.353 ± 0.08(17.0)	45.057 ± 0.10(91.9)

Números en () son % de degradación definida por la siguiente ecuación: (HAP removido*100)/control). Los datos se representan como medias ± SD.

P. ostreatus fue capaz de remover un 91.9% de un total de HAPs de 49.006 mg/l. Sin embargo la acumulación intracelular de HAPs disminuyó ligeramente a 17.0%, mientras que la degradación enzimática fue de 74.9%. A la concentración de 80.051 mg/l de HAPs, el HAP que presentó una total remoción fue NAF, mientras que los HAPs que presentaron altas tasas de degradación fueron FLU>I123-cdP>BaP>BkF>BbF>CRI>BaA>FEN>PIR>BghiP>ACE respectivamente, con porcentajes de degradación de 99.9, 99.8, 99.5, 99.3, 99.2, 98.8, 98.5, 98.3, 98.0, 97.9 y 89.9% respectivamente. Los HAPs de BPM se lograron remover un 97.7%, mientras que los HAPs de APM 98.9% (Cuadro 18).

En este último tratamiento a una concentración de 80.051 mg/l, se puede apreciar un aumento en la remoción de HAPs del 98.2% y una reducción en la acumulación intracelular a 4.2%, obteniendo así un 94% de degradación de HAPs.

Cuadro 18. Degradación y bioacumulación de HAPs a una concentración de 80.051 mg/l.

HAPs	Anillos	Control mg/l	Biodegradación mg/l	Acumulación intracelular mg/l	Remoción total mg/l
NAF	2	15.712 ± 0.07	14.661 ± 0.02(93.3)	1.051 ± 0.00(6.7)	15.712 ± 0.00(100)
ACE	3	9.459 ± 0.09	7.954 ± 0.07(84.1)	0.547 ± 0.01(5.8)	8.501 ± 0.07(89.9)
FEN	3	3.694 ± 0.04	3.594 ± 0.01(97.3)	0.037 ± 0.01(1.0)	3.631 ± 0.00(98.3)
FLU	3	16.680 ± 0.10	16.140 ± 0.01(96.8)	0.527 ± 0.01(3.2)	16.667 ± 0.00(99.9)
BPM totales	2 y 3	45.545 ± 0.15	42.349 ± 0.07 (93.0)	2.162 ± 0.01(4.7)	44.511 ± 0.06(97.7)
CRI	4	6.783 ± 0.05	6.645 ± 0.01(98.0)	0.055 ± 0.00(0.8)	6.700 ± 0.01(98.8)
PIR	4	2.853 ± 0.06	2.795 ± 0.00(98.0)	0.000 ± 0.00(0.0)	2.795 ± 0.00(98.0)
BaA	4	3.060 ± 0.01	2.990 ± 0.01(97.7)	0.025 ± 0.00(0.8)	3.015 ± 0.00(98.5)
BbF	4	2.358 ± 0.01	2.338 ± 0.00(99.2)	0.000 ± 0.00(0.0)	2.338 ± 0.00(99.2)
BkF	5	0.742 ± 0.01	0.737 ± 0.00(99.3)	0.000 ± 0.00(0.0)	0.737 ± 0.00(99.3)
BaP	5	4.269 ± 0.02	4.248 ± 0.00(99.5)	0.000 ± 0.00(0.0)	4.248 ± 0.00(99.5)
BghiP	6	7.400 ± 0.08	6.588 ± 0.02(89.0)	0.660 ± 0.03(8.9)	7.248 ± 0.01(97.9)
I123-cdP	6	7.041 ± 0.04	6.567 ± 0.02(93.3)	0.455 ± 0.02(6.5)	7.022 ± 0.00(99.8)
APM totales	4 a 6	34.506 ± 0.05	32.908 ± 0.04(95.4)	1.195 ± 0.01(3.5)	34.103 ± 0.02(98.9)
HAPs totales		80.051 ± 0.55	75.257 ± 0.02(94.0)	3.357 ± 0.02(4.2)	78.614 ± 0.08(98.2)

Números en () son % de degradación definida por la siguiente ecuación: (HAP removido*100)/control). Los datos se representan como medias ± SD.

6.6 Formación del consorcio bacteria-*P. ostreatus*

La degradación de HAPs por el consorcio bacteria-*P.ostreatus*, así como la capacidad para degradar de *P. ostreatus* y *O. intermedium* fueron evaluadas.

Todos los tratamientos presentaron un aumento en la eficiencia de degradación conforme aumentó el tiempo de incubación. Los resultados obtenidos en la concentración de 138.35 mg/kg de HAPs pasados 110 días muestran que el consorcio es el tratamiento más eficiente al degradar 86.69% de HAPs, mientras que el menos eficiente fue *O. intermedium* con un 72.04% (Cuadro 19). Se puede apreciar que los HAPs de BPM fueron degradados de 68.28 a 74.12%, siendo el consorcio el que obtuvo la mayor degradación, mientras que los APM presentaron una degradación de 68.24 a 84.51%, igualmente el consorcio presentó la mayor capacidad para degradarlos.

Cuadro 19. Degradación de cada HAP por *O. intermedium*, *P. ostreatus* y el consorcio de ambos después de 110 días, a una concentración de HAPs de 138.35 mg/kg.

HAPs	Anillos	Concentración mg/kg	Degradación de cada HAP (%)				
			C-1	C-2	O.I	P.O	C.O
FLU	2	27.83 ± 0.1	1.70 ± 0.8 _d	5.68 ± 1.7 _c	41.59 ± 1.3 _b	69.77 ± 0.6 _a	69.77 ± 0.9 _a
NAF	2	74.16 ± 2.3	1.53 ± 0.8 _d	3.06 ± 0.8 _d	76.24 ± 0.5 _c	84.52 ± 0.8 _b	88.77 ± 0.1 _a
FEN	3	4.06 ± 0.5	1.31 ± 0.9 _d	0.28 ± 0.1 _d	69.74 ± 0.6 _c	76.27 ± 1.6 _b	85.23 ± 1.7 _a
ANT	3	7.43 ± 0.1	1.89 ± 0.3 _d	4.02 ± 1.0 _c	93.50 ± 0.4 _b	92.50 ± 1.4 _b	96.27 ± 0.6 _a
BPM totales	2 y 3	113.48 ± 1.8	1.60 ± 1.1_d	3.71 ± 0.9_d	68.64 ± 0.5_c	81.13 ± 1.3_b	84.47 ± 0.6_a
FLT	4	6.75 ± 0.1	5.04 ± 0.5 _c	5.03 ± 0.3 _c	88.72 ± 0.5 _b	100 ± 0.0 _a	100 ± 0.0 _a
PIR	4	4.77 ± 0.4	2.47 ± 0.8 _c	6.69 ± 0.9 _d	68.03 ± 0.8 _c	78.57 ± 0.8 _b	86.51 ± 1.7 _a
CRI	4	6.19 ± 0.6	2.83 ± 0.8 _d	1.87 ± 0.5 _d	94.63 ± 0.6 _b	91.60 ± 1.4 _c	98.23 ± 0.9 _a
BaA	4	3.37 ± 0.2	5.14 ± 0.7 _b	8.59 v 0.8 _b	98.08 ± 0.8 _a	95.67 ± 1.3 _a	98.18 ± 0.5 _a
BghiP	5	2.35 ± 0.1	4.69 ± 0.5 _c	11.99 ± 0.5 _b	97.59 ± 1.5 _a	100 ± 0.0 _a	100 ± 0.0 _a
I123-cdP	5	1.44 ± 0.1	5.86 ± 0.8 _d	13.04 ± 0.9 _c	75.74 ± 2.8 _b	100 ± 0.0 _a	100 ± 0.0 _a
APM totales	4 a 5	24.87 ± 0.4	4.80 ± 0.9_c	7.04 ± 0.7_c	87.31 ± 1.8_b	93.21 ± 0.8_a	96.73 ± 0.4_a
HAPs totales		138.35 ± 5.42	1.33 ± 0.9_d	4.30 ± 0.53_d	72.04 ± 0.5_c	83.30 ± 0.51_b	86.69 ± 0.21_a

Los datos se representan como medias ± SD. Las medias en la misma fila con una letra en común no son significativamente diferentes entre los tratamientos (P < 0.05). C-1: Suelo sin inoculo C-2: Suelo y cosustrato sin inoculo O.I: *O. intermedium* P.O: *P. ostreatus* C.O: *O. intermedium-P. ostreatus*

A 268. 23 mg/kg después de 110 días, el consorcio fue el mejor tratamiento al obtener una eficiencia de 75.47%, mientras que *O intermedium* y *P. ostreatus* presentaron la menor capacidad de degradación sin diferencia significativa entre ellos al tener una eficiencia de 69. 91 y 68.29%, respectivamente (Cuadro 20). Los HAPs de BPM fueron degradados de un 68.29 a un 74.12%, el consorcio el mayor porcentaje de degradación, los APM mostraron una degradación de 68.24 a 84.51%.

Cuadro 20. Concentración de HAPs en el suelo contaminado y degradación de los mismos bajo diferentes tratamientos después de 110 días de incubación.

HAPs	Anillos	Concentración mg/kg	Degradación de cada HAP (%)				
			C-1	C-2	O.I	P.O	C.O
FLU	2	56.43 ± 0.7	1.44 ± 0.5 _d	9.48 ± 0.2 _c	70.60 ± 0.5 _a	60.04 ± 0.7 _b	72.70 ± 0.4 _a
NAF	2	153.65 ± 1.4	3.76 ± 0.8 _d	7.50 ± 0.7 _c	67.51 ± 0.4 _b	70.43 ± 0.6 _a	72.64 ± 0.4 _a
FEN	3	8.08 ± 0.8	2.63 ± 0.6 _e	6.44 ± 1.0 _d	78.97 ± 0.9 _b	62.32 ± 0.7 _c	95.78 ± 0.1 _a
ANT	3	15.40 ± 0.2	2.93 ± 0.6 _d	8.40 ± 1.2 _c	72.52 ± 0.3 _b	80.38 ± 0.4 _a	82.87 ± 0.8 _a
BPM totales	2 y 3	233.56 ± 0.9	3.09 ± 0.4_c	7.99 ± 0.9_c	68.98 ± 0.5_b	68.29 ± 0.7_b	74.12 ± 0.3_a
PIR	4	8.39 ± 0.2	0.77 ± 0.6 _e	12.08 ± 1.2 _d	76.15 ± 1.1 _b	68.05 ± 0.9 _c	85.95 ± 0.3 _a
CRI	4	13.99 ± 0.5	5.50 ± 1.0 _d	11.94 ± 0.9 _c	68.55 ± 0.7 _b	68.92 ± 0.5 _b	77.35 ± 0.7 _a
BaA	4	6.98 ± 0.2	4.61 ± 0.7 _e	15.80 ± 2.3 _d	84.22 ± 0.1 _b	66.06 ± 1.2 _c	89.95 ± 0.5 _a
BghiP	5	5.31 ± 0.1	1.90 ± 0.7 _e	8.82 ± 0.8 _d	85.72 ± 0.9 _b	69.61 ± 1.6 _c	93.96 ± 0.8 _a
APM totales	4 a 6	34.67 ± 0.3	3.62 ± 0.8_c	12.28 ± 0.9_d	76.17 ± 0.9_b	68.24 ± 1.0_c	84.51 ± 0.6_a
HAPs totales		268.23 ± 2.6	3.25 ± 0.53_d	8.53 ± 0.45_c	69.91 ± 0.3_b	68.29 ± 0.2_b	75.47 ± 0.38_a

Los datos se representan como medias ± SD. Las medias en la misma fila con una letra en común no son significativamente diferentes entre los tratamientos (P < 0.05). C-1: Suelo sin inoculo C-2: Suelo y cosustrato sin inoculo O.I: *O. intermedium* P.O: *P. ostreatus* C.O: *O. intermedium-P. ostreatus*

En la Fig. 11, se observan las eficiencias de degradación de HAPs de cada tratamiento a 50, 80 y 110 días de incubación a una concentración de 138.35 mg/kg. Asimismo, en la Fig. 12, se muestran las velocidades de degradación de HAPs a una concentración de 268 mg/kg durante los tiempos establecidos.

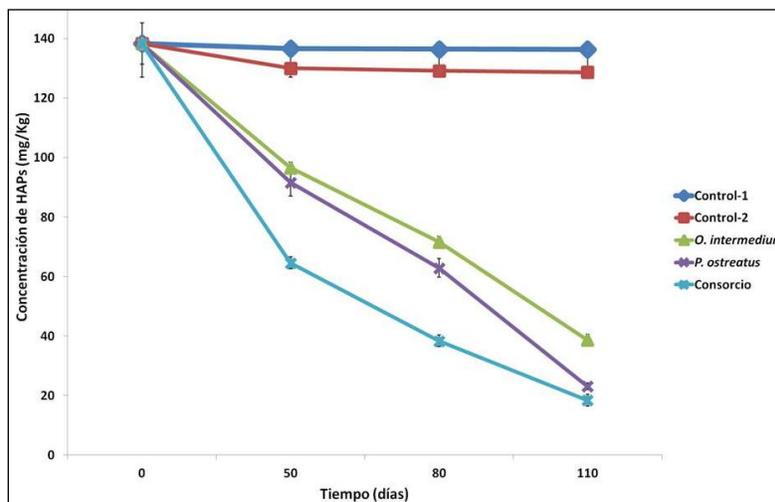


Figura 11. Cinética de degradación de HAPs en suelo bajo diferentes tratamientos después de 110 días del proceso de biorremediación. Cada punto representa el valor medio de muestras por triplicado.

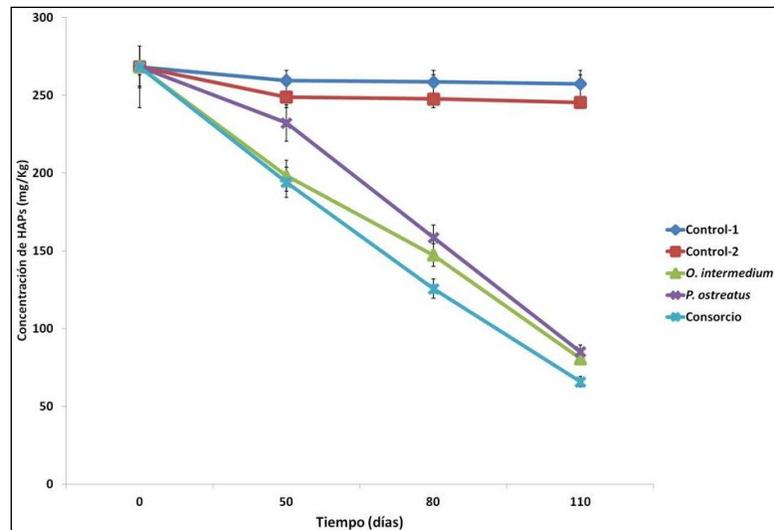


Figura 12. Cinética de degradación de HAPs en suelo bajo diferentes tratamientos después de 110 días de incubación. Cada punto representa el valor medio de muestras por triplicado.

El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (anexos A, B y C), además fue significativa la interacción entre el tipo de inóculo, el tiempo de incubación y la concentración del tóxico. El CONS (consorcio) presentó la mayor degradación de HAPs, mientras que CONT1 (suelo sin inóculo) presentó menor eficiencia. La incubación de 110 días fue la mejor para degradar HAPs, observándose la menor degradación a los 50 días, Además la mayor degradación se registró a la concentración más baja (138.35 mg/kg de HAPs).

El mejor tratamiento fue el consorcio *O. intermedium-P. ostreatus* a los 110 días de incubación y con la concentración de 138.35 mg/kg de HAPs.

VII DISCUSIÓN

7.1 Degradación bacteriana de HAPs en microcosmos

El petróleo contiene un total de 0.2% de HAPs, en la caracterización del perfil de HAPs se identificaron 14 compuestos, la concentración de HAPs en este crudo de petróleo coincide con lo reportado para más de 40 crudos de todo el mundo que han sido analizados (Pampanin & Sydnes, 2013). Esto también es consistente con la proporción mayoritaria de HAPS de BPM respecto a los de APM.

Las cepas bacterianas seleccionadas tuvieron tasas de degradación de HAPs mayores (32.6 a 82.7% en 13.1 mg/kg) a lo encontrado por Mao et al. (2012), quienes reportan una degradación del 20.2 a 35,8% a 9.36 mg/kg de HAPs pero con tan sólo de 56 días de incubación. La capacidad de *O. intermedium* para degradar HAPs a la mayor concentración evaluada se explica por el hecho de que el género *Ochrobactrum* produce surfactantes que mejoran la biodisponibilidad de los hidrocarburos y facilita así su degradación (Bezza et al., 2015; Ferhat et al., 2011). Se ha reportado que *O. intermedium* degrada HAPs de BPM y APM de aceites de motor en aguas residuales en condiciones salinas (Arulazhagan & Vasudevan). El género *Ochrobactrum* tiene potencial para remediar suelos contaminados con HAPs según reportes de Asia y África (Bezza et al., 2015; An et al., 2011).

Las cepas aisladas del suelo contaminado con petróleo crudo tienen la capacidad de degradar diferentes concentraciones HAPs tanto de APM como de BPM bajo condiciones de microcosmos. No obstante que la capacidad degradativa de HAPs de algunas bacterias ya se ha reportado en otros estudios (Waigi et al., 2015); la mayoría de las investigaciones al respecto se hacen en cultivo líquido y con estándares, lo que facilita la degradación del tóxico (Sun et al., 2014) y la identificación de los microorganismos degradadores, pero no se aproxima a las condiciones naturales del suelo, que afectan la eficiencia de la degradación. Los microorganismos que muestran eficiencia de degradación en cultivo líquido no presentan el mismo comportamiento en el suelo (Dastgheib et al., 2012; Hamdi et al., 2012). Es bien sabido, que las características fisicoquímicas del suelo afectan la capacidad de degradación de los microorganismos y deben ser consideradas en cualquier estudio de biodegradación (Andreolli et al., 2015; Biache et al., 2008; Allan et al., 2007).

A pesar de que *P. pnomenusa* degrada bifenilos policlorados y diclorometano en cultivo líquido (Yu et al., 2014; Pham et al., 2012), este es el primer reporte de esta bacteria como degradadora de HAPs en suelo. Sólo se han reportado estudios con *Pandoraea* sp. en la degradación de tiosulfato, oxalato, lignina y p-xileno (Wang et al., 2015; Shi et al., 2013; Sahin et al., 2011; Anandham et al., 2010). Lo antes mencionado sugiere que *P. pnomenusa* tiene un gran potencial como degradadora de HAPs, además se debe estudiar la producción de biosurfactantes y elucidar el mecanismo de degradación de los contaminantes.

En cuanto a la degradación de cada HAP, las cuatro cepas bacterianas degradan HAPs de 4 a 6 anillos, lo que no es de sorprender debido a la baja concentración de estos compuestos en el crudo de petróleo; además, la producción de biosurfactantes mejora la biodisponibilidad de éstos contaminantes, y por lo general la biodegradación es más eficiente para BPM (Li et al., 2009), aunque se ha encontrado que en algunos casos la degradación de APM es mayor que la de BPM (Dastgheid et al., 2012).

Con respecto al NAF su biodegradación fue proporcional a su concentración, Silva et al. (2009) reportan una degradación de hasta el 85% de 140 mg/kg, con un consorcio microbiano después de 84 días de incubación. Para el ACI, la tasa de degradación obtenida en este estudio es menor a la que reportan Wu et al. (2013), en donde lograron una total eliminación del HAP a una concentración de 7.91 mg/kg de ACI a una concentración total de HAPS de 1,360 mg/kg aunque con un tiempo de incubación de 30 días, con un consorcio bacteriano formado por cinco cepas de *Stenotrophomonas* sp. Y para el ACI, la degradación del 70,7 a 88,7% fue menor a lo obtenido por Chagas-Spinelli et al. (2012), quienes con bioestimulación después de 129 días logran una degradación total a una concentración de 6 mg/kg.

El FEN fue totalmente degradado, esto concuerda con lo registrado por Niepceron et al. (2013), donde bacterias del phylum Gammaproteobacteria logran degradar una mezcla de seis HAPs (250 mg/kg) en 90 días de incubación en microcosmos del suelo a una temperatura de 20°C. Mientras que Silva et al. (2009), reportan el 99% de degradación de FEN a una concentración de 140 mg/kg con un tiempo de incubación de 120 días al utilizar un consorcio microbiano aislado de un suelo contaminado con hidrocarburos. Finalmente, el ANT fue el HAP más recalcitrante cuyo incremento de concentración provocó una disminución de su biodegradación, similar a lo observado por Bisht et al.

(2014) con *Bacillus* sp. SBER3 en donde a una concentración de 15 mg/kg alcanzó un 40% de degradación y a 25 mg/kg alcanzó un 23% de degradación.

7.2 Degradación de HAPs por *P. ostreatus* en medio líquido

La diversidad microbiana ofrece un inmenso campo de opciones favorables para el medio ambiente en lo referente a la mineralización de los contaminantes o su transformación en compuestos menos dañinos no peligrosos. Hay gran interés en el estudio de la diversidad de microorganismos autóctonos capaces de degradar diferentes contaminantes (Watanabe et al., 2002). Los hongos son una fuente fascinante y casi interminable de diversidad biológica con gran potencial de explotación (Manoharachary et al., 2005). Aunque muchas especies de hongos occidentales están bien documentados (Steffen, 2003), hay muy poca investigación en relación a su uso para remediación (Manoharachary et al., 2005).

Estudios previos han demostrado que diversos hongos son capaces de mineralizar HAPs y las tasas de remoción de HAPs con *P. ostreatus* a diferentes concentraciones se pueden comparar con otras ya reportadas, donde se encuentran degradaciones de 150 hasta 1,500 mg/kg de HAPs (Run and Eyini, 2011; Covino et al., 2010). Además se ha demostrado que las enzimas secretadas por los hongos de la pudrición blanca para degradar la lignina (peroxidasa, MnP y lacasa), son responsables de la degradación de HAPs (Chang et al., 2001; Wariishi et al., 1992). En el caso de *P. ostreatus*, la adición de tween 80 (surfactante), facilita la degradación de FEN, PIR y BaP en un bioreactor rotatorio, el tween 80 aumenta la solubilidad de los HAPs, haciéndolos disponibles para el sistema enzimático ligninolítico del hongo (Zheng y Obrad, 2002).

La alta remoción de BaP a diferentes concentraciones es debida a que éste es más propenso al ataque oxidativo por los hongos de la pudrición blanca (Novotny et al., 1999); esto ha sido observado en preparaciones purificadas de enzimas degradadoras de lignina (Johannes y Majcherczyk, 2000), también la biodisponibilidad del compuesto incrementa por efecto del surfactante utilizado para emulsificar el medio. La alta remoción del FLU es comparable a la de otros hongos, tales como *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Ganoderma carnosum* y *P. ostreatus*, mientras que *T. versicolor*, *T. trogii* y *G. carnosum* degradaron el FLU un 30% y *P. ostreatus* metabolizó 85% aprox. de una concentración de 30 mg/l de FLU en seis semanas (Akdogan and Pazarlioglu, 2011).

La degradación de CRI fue más eficiente en cuanto a otros estudios realizados con hongos tales como *Nematoloma frowardii*, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* y *Lentinus tigrinus* donde se degrada hasta un 35% de 10 mg/l en cuatro semanas (Valentín et al., 2006; Sack et al., 2006; Leonardi et al., 2008). Las enzimas liberadas por *P. ostreatus* oxidaron mejor este compuesto gracias a la biodisponibilidad que produjo el Tween 80, observándose una mayor degradación que acumulación intracelular.

En los cultivos de *P. ostreatus*, el FEN, PIR y BaA sus porcentajes de degradación fueron similares aunque las concentraciones de cada HAP son diferentes. Es importante resaltar que la ubicación intracelular de las enzimas ligninolíticas, aunque también son extracelulares, hace dependiente en gran medida la tasa de transferencia de masa de estos contaminantes para la captación celular, lo que limita la velocidad de degradación. Además del sistema de degradación intracelular, basado principalmente en el complejo de epóxido hidrolasa por citocromo P450, los basidiomicetos son capaces de actuar a través de mecanismos de degradación a base de radicales no específicos que se producen en el entorno extracelular (Chung et al., 2000). *P. ostreatus* puede producir un agente emulsificante como *Pseudomonas* capaz de solubilizar HAPs (Díaz De Rienzo et al., 2016). Así, *P. ostreatus* puede degradar HAPs a diferentes concentraciones más allá de cantidad biodisponible.

7.3 Degradación de HAPs por el consorcio, en microcosmos

En lo que se refiere al estudio de la degradación de HAPs por microorganismos, el problema más importante es la fuente de HAPs. Por ejemplo se han utilizado HAPs puros (Jacques et al., 2007; Boonchan et al., 2000) o creosota (Vinas et al., 2005; Mueller et al., 1989), las fuentes más comunes de HAPs, mientras que en este estudio, el suelo fue contaminado con petróleo. La eliminación de HAPs está correlacionada con el número de anillos aromáticos (cuadro 18 y 19) y es superior a resultados anteriores (Hansen et al., 2004; Eriksson et al., 2000). Este efecto se puede deber tanto a la formación del consorcio, así como el uso de rastrojo de maíz y pulpa de café como cosustrato que mejoraron la producción enzimática de *P. ostreatus*, y el aporte de nutrientes para *O. intermedium*.

La degradación de HAPs de BPM fue similar a la reportada por Winqvist et al. (2014), que fue de 85%, sin embargo, los de APM presentaron mayor porcentaje de degradación que en ese estudio, con *Phanerochaete velutina* como biorremediador y la concentración de

HAPs reportada es 1,400 mg/kg. Sin embargo, García-Delgado et al. (2015), al usar *Agaricus bisporus* como micorremediador, obtienen resultados inferiores cerca de 25% de degradación a concentraciones de 111 mg/kg de HAPs en un tiempo de remediación de 63 días.

En los tres tratamientos las concentraciones de ANT, BaA y BghiP se redujeron en > 83% (cuadro 19); este resultado proporciona una visión sobre el mecanismo subyacente de la degradación de HAPs porque estos tres HAPs son susceptibles a la oxidación por lacasa fúngica (Majcherczyk et al., 1998; Collins et al., 1996). La degradación es similar con extractos de crudo de petróleo por cultivo de hongos (Li et al., 2010) u hongos ligninolítico (Steffen et al., 2007), y la lacasa fúngica puede eliminar la mayor parte de ANT y BaA en el suelo rápidamente (Wu et al., 2008).

Aún cuando *P. ostreatus* en presencia del cosustrato, fue capaz de degradar todos los HAPs a eficiencias altas, estas eficiencias están por debajo del 96%, reportado con *P. velutina* en tres meses de incubación (Winqvist et al., 2014). Pero Covino et al. (2010) observaron que con *P. ostreatus* se degradó el 80% de HAPs totales en el suelo contaminado con creosota no estéril. Mientras que D'Annibale et al. (2005) evaluaron la eficiencia de *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus pulmonaris* en la mineralización de mezclas de aromáticos en un suelo contaminado no estéril, *P. chrysosporium* y *P. pulmonaris* degradaron naftaleno, tetraclorobenceno e isómeros de dicloroanilina en un periodo de 30 días.

La remoción abiótica de HAPs fue del 3 al 8%, esto se debe a que la materia orgánica puede absorber HAPs, además de la volatilización que suele ocurrir (Beckles et al., 2007). Por lo tanto, la biodegradación de los HAPs es atribuible a la secreción de enzimas ligninolíticas en el caso de *P. ostreatus*. En la fase de crecimiento de los hongos y en ausencia de enzimas extracelulares necesarias y/o cosustratos, la degradación de los HAPs tendría lugar preferentemente mediante la absorción del compuesto aromático y posterior degradación a través del citocromo intracelular P-450 (Covino et al., 2010). Es probable que la actividad del citocromo intracelular P-450 y la actividad de las enzimas ligninolíticas actúen sinérgicamente durante la colonización por el hongo del suelo contaminado.

Por lo tanto *P. ostreatus* es capaz de degradar HAPs más eficientemente que algunas comunidades microbianas del suelo. La mayor eficiencia de la eliminación de HAPs de

APM en los diferentes tratamientos donde intervino *P. ostreatus*, es explicable debido a que este hongo es considerado como uno de los mejores degradadores fúngicos de compuestos aromáticos complejos, por ejemplo, lignina o HAPs (Šnajdr y Baldrian, 2006); mientras que *O. intermedium* es apenas estudiada para la degradación de HAPs por lo que se tendrían que hacer otras investigaciones para elucidar el mecanismo de degradación de HAPs por esta bacteria.

Cabe destacar que los hongos degradan los HAPs a través de un cometabolismo, y a este tipo de compuestos no les reporta una ganancia energética. Por ello requieren de residuos agroindustriales como fuentes de carbono, descomponiendo la materia orgánica del cosustrato añadido al suelo con la ayuda de enzimas hidrolíticas extracelulares. Así los nutrientes liberados fuera de la célula quedan disponibles tanto para sus productores como para otros microorganismos del suelo, en este caso la bacteria (Šnajdr et al., 2011). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los consorcios de hongos y bacterias pueden ser más eficientes en la degradación de xenobióticos como los HAPs que los consorcios bacterianos (Mao et al., 2012). Además los hongos aumentan la biodisponibilidad de los HAPs inmóviles y distribuidos de manera desigual para la degradación bacteriana, tanto con el aumento de la movilidad bacteriana como mediante el transporte de compuestos de HAPs dentro de sus micelios. Las bacterias pueden utilizar películas de líquido alrededor de las hifas fúngicas para puentear los poros y penetrar los agregados del suelo (Kohlmeier et al., 2005). Los hongos también pueden tomar y trasladar de forma activa los HAPs a través de sus hifas por la corriente citoplasmática (Furuno et al., 2012).

En otro orden de ideas, la fuerte capacidad competitiva de una especie fúngica particular es considerado como una premisa de su exitosa colonización del suelo (Baldrian, 2008). Aunque *P. ostreatus* demostró convivir con *O. intermedium*, en estudios anteriores se describieron ligeras disminuciones de biomasa bacteriana con *P. aeruginosa* en suelos contaminados con HAPs inoculados con *P. ostreatus* (Tornberg et al., 2003), en contraste Federici et al. (2007) descubren un aumento en los recuentos bacterianos en los suelos contaminados con HAPs inoculados por la misma especie de hongo. *P. ostreatus* afecta positivamente el crecimiento de actinobacterias como *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, en la biodegradación de HAPs (DeBruyn et al., 2007). Todos estos efectos podrían haber contribuido a una mejor cooperación entre *P. ostreatus* y bacterias, lo que resulta en una mayor biodegradación de HAPs.

Aunado a lo anterior los hongos normalmente sintetizan enzimas, en cierta medida, que degradan HAPs complejos (Aranda et al., 2010; Sack et al., 1997). Las bacterias con actividad lacasa también pueden contribuir a la degradación de HAPs (Zeng et al., 2011). Cabe señalar que las interacciones entre hongos y bacterias pueden afectar tanto de manera positiva como negativa a la degradación de HAPs en el suelo (Borras et al., 2010); tales mecanismos de biodegradación por este consorcio merecen ser analizados con más detalle.

Los consorcios microbianos se han utilizado en varios estudios para remediar los suelos contaminados por HAPs. Ruberto et al. (2006) encuentran que una combinación de bioaumentación con un consorcio y la bioestimulación con nutrientes orgánicos causó una eliminación del 46,6% de 1,744 mg/kg en suelo de fenantreno después de 56 días de incubación en suelo antártico. Vinas et al. (2005) encontraron que los HAPs son degradados significativamente (83 a 87% de 160 mg/kg de HAPs) en suelos contaminados con creosota después de 200 días. En comparación con estudios previos, en nuestro estudio se logró la eliminación del 75 al 86% de total de HAPs (268.23 mg/kg) después de 110 días de tratamiento con el consorcio formado, naturalmente la biodegradación es el resultado tanto del metabolismo bacteriano, como del cometabolismo fúngico (Mueller et al., 1989).

La eliminación tanto de HAPs totales como de cada HAP son mayores con el consorcio que lo que reportan Byss et al (2008) con tratamientos fúngicos, la diferencia más notable se observa en los HAPs de APM (200 mg/kg) con una incubación de 120 días. En general se acepta que la biodegradación de HAPs de BPM es mucho más rápida y extensa que la de los de APM (Nam et al., 2001). En este estudio se registró una alta degradación de HAPs de APM con el consorcio, también Li et al. (2009), observan que la biodegradación de HAPs de 5 y 6 anillos fue significativamente mayor que la de 2 a 4 anillos. En el presente estudio la degradación de 2 a 3 anillos fue menor que la de 4 a 6 anillos, gracias al consorcio *O. intermedium-P. ostreatus*.

Algunos ejemplos exitosos han demostrado una mejora significativa en la degradación de HAPs de APM (Boonchan et al., 2000; Kotterman et al., 1998), de una manera similar a nuestro estudio. Lo que significa el potencial de este consorcio en aplicaciones en campo para la biorremediación de suelos contaminados con HAPs.

VIII CONCLUSIONES

- Las cepas bacterianas aisladas degradan HAPs de un suelo contaminado con petróleo.
- *O. intermedium* y *P. pnomenusa* aumentan su capacidad de degradación al aumentar la concentración de HAPs.
- *O. intermedium* degrada en relación 1:8 los HAPs de APM y BPM.
- *P. ostreatus* remueve altos porcentajes de HAPs de BPM y APM en cultivo líquido.
- *P. ostreatus* aumenta la degradación extracelular de HAPs al aumentar las concentraciones de estos xenobióticos, bajo condiciones de cultivo líquido.
- *P. ostreatus* crece en un suelo contaminado con petróleo, además tiene alta eficiencia de degradación de HAPs.
- *O. intermedium* y *P. ostreatus* coexisten en un suelo contaminado con crudo, y son capaces de biodegradar sinérgicamente HAPs.
- El consorcio *O. intermedium*-*P. ostreatus* es una alternativa de remediación para la restauración de suelos afectados con HAPs y es ambientalmente seguro y económicamente viable.

XIX RECOMENDACIONES

De acuerdo a la degradación de HAPs alcanzada por el consorcio *O. intermedium-Pleurotus ostreatus* en suelo contaminado con petróleo, se propone realizar otros estudios para degradar otros agentes xenobióticos con este consorcio, además desarrollar tecnologías *in situ* para la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos y otros contaminantes. Así como también, evaluar otras especies de hongos de la pudrición blanca y preparar nuevos consorcios que permitan remediar áreas afectadas por estos y otros xenobióticos con mayor eficacia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo marcan algunas pautas para nuevas investigaciones:

- Realizar investigaciones con nuevos hongos de la pudrición blanca para el tratamiento de suelos.
- Realizar estudios sobre la disminución de toxicidad en suelos tratados con el consorcio.
- Realizar un tren de tratamiento con las cepas bacterianas estudiadas, para poder aprovechar al máximo las capacidades de degradación que presentaron a diferentes concentraciones.
- Estudiar en conjunto las cuatro cepas bacterianas y evaluar si se puede conformar un consorcio o presentan antagonismo.
- Realizar pruebas en campo con el consorcio.

Bibliografía

- Acharya, P., Ives, P. (1993). Incineration at Bayou Bounfouca remediation project. *Waste Manage.* 14(1), 13-26.
- Adamczyk, J., Hesselsoe, M., Iversen, N., Horm, M., Lehner, A., Nielsen, P.H. (2003). The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl. Environ. microbiol.* 69, 6875-87.
- Agudo, A. (2010). Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Madrid. UGT Comisión Ejecutiva Confederal 1 th ed. 235-243.
- Aguilera, H.N., Domínguez, V.I. (1980). Metodología de análisis fisicoquímicos de suelos. Facultad de Ciencias: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ahn, C., Kim, Y., Woo, S., Park, J. (2008). Soil washing using various nonionic surfactants and their recovery by selective adsorption with activated carbon. *J. Hazard. mater.* 154, 153-160.
- Aitken, M.D., Stringfellow, W.T., Nagel, R.D., Kazunga, C., Chen, S.H. (1991). Characteristics of phenanthrene degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.* 34, 671-676.
- Akdogan, H.A., Pazarlioglu, N.K. (2011). Fluoreno biodegradación by *P. ostreatus* Part II: Biodegradation by immobilized cells in a recycled packed bed reactor. *Process Biochemistry.* 46, 840-846.
- Akgerman, A. (1993). Supercritical fluid extraction of contaminants from environmental matrices. *Waste Manage.* 13, 403-415.
- Alcantara, M., Gómez, J., Pazos, M., Sanroman, M. (2008). Combined treatment of PAHs contaminated soils using the sequence extraction with surfactantelectrochemical degradation. *Chemosphere.* 70, 1438-44.
- Allan, I., Semple, K., Hare, R., Reid, B. (2007). Cyclodextrin enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols in contaminated soil slurries. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5498-5504.

- Anandham, R., Indiragandhi, P., Kwon, S.W., Sa, T.M., Jeon, C.o., Kim, Y.K., Jee, H.J.R. (2010). *Pandoraea thiooxydans* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic, thiosulfateoxidizing bacterium isolated from rhizosphere soils of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Inter. J. of System. and Evolut. Microbiol.* 60, 21-26.
- Anderson, B., Henryson, T. (1996). Accumulation and degradation of dead end metabolites during treatment of soil with polycyclic aromatic with five strains of white rot fungi. *Appl. microbiol. Biotechnol.* 46, 647-652.
- Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P., Vallini, G. (2015). Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: A comparative study. *J. of Environ. Manag.* 153, 121-131.
- Anitescu, G., Tavlarides, L. (2006). Supercritical extraction of contaminants from soils and sediments. *J. Supercrit. Fluids.* 38, 167-180.
- An, T., Zu, L., Li, G., Wan, S., Mai, B., Wong, P.K. (2011). One-step process for debromination and aerobic mineralization of tetrabromobisphenol-A by a novel *Ochrobactrum* sp. T isolated from an e-waste recycling site. *Bioresource Technology*, 102, 9148-9154.
- Aranda, E., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2010). Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. *Biodegradation.* 21, 267-281.
- Arce, O., Rodríguez, V., Rojas, A. (2004). Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste polluted soil. *J. Environ. Sci. & Health Part.* 39(6), 1535-45.
- Arulazhagan, P., Vasudevan, N. (2011). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. *Mar. Pollut. Bull.* 62(2), 388-394.
- Bacosa, H., Inoue, C. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *J. of Hazard. Mater.* 283, 689-697.
- Bae, J., Park, Y. (2006). Homogeneous versus heterogeneous probes for microbial ecological microarrays. *TRENDS Biotechnol.* 24, 318-323.

- Bai, Y., Yang, D., Wang, J., Xu, S., Wang, X., An, L.Y. (2006). Phylogenetic diversity of culturable bacteria from alpine permafrost in the Tianshan Mountains, northwestern China. *Res. Microbiol.* 157, 741-751.
- Baker, R., Moore, A. (2000). Optimizing the Effectiveness of In Situ Bioventing. *Pollut. Eng.* 32(7), 44-47.
- Baldrian, P. (2008). Wood inhabiting lignolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecol.* 1, 4-12.
- Baldwin, B., Nakatsu, C., Nies, L. (2003). Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3350-58.
- Bardgett, R. (2005). The biology of soil: a community and ecosystem approach. Oxford University Press on Demand: s.n.
- Bartlett, D. (1999). Microbial adaptations to the psychrosphere/piezosphere. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 93-100.
- Beckles, D.M., Chen, W., Hughes, J.B. (2007). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons sequestered in sediment: microbial study and model prediction. *Environ. Toxicol. and Chem.* 26, 878-883.
- Bellah, O., Mmualefe, L., Torto, N. (2014). Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil with Agilent SampliQ QuEChERS AOAC Kit and HPLC-FLD. South Africa: Department of Chemistry Rhodes University.
- Beller, H., Kane, S., Legler, T., Alvarez, P. (2002). A real time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3977-84.
- Benavides, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova Publ. Cient.* 4(5), 82-90.
- Bento, F., Camargo, F., Okeke, B., Frankenberger, W. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96(9), 1049-55.
- Bezza, F., Beukes, M., Nkhalambayausi-Chirwa, E. (2015). Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process Biochemistry.* 50, 1911-1922.

- Biache, C., Mansuy-Huault, L., Faure, P., Munier-Lamy, C., Leyval, C.C. (2008). Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: Impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environ. Pollut.* 156, 671-677.
- Bisht, S., Pandey, P., Kaur, G., Aggarwal, H., Sood, A., Sharma, S., Kumar, V., Bisht, N.S.S. (2014). Utilization of endophytic strain *Bacillus* sp. SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system. *European J. of Soil Biol.* 60, 67-76.
- Bogan, B., Trbovic, V. (2003). Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin, and soil porosity. *J. Hazard. Mater.* B100, 285-300.
- Bogan, B., Trbovic, V., Paterek, J. (2003). Inclusion of vegetable oils in Fenton's chemistry for remediation of PAH-contaminated soils. *Chemosphere.* 50, 15-21.
- Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungalbacterial cocultures. *Appl. and Environm. Microbiol.* 66, 1007-19.
- Borras, E., Caminal, G., Sarra, M., Novotny, C. (2010). Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil. *Soil Biol. & Biochem.* 42, 2087-93.
- Boschker, H., Middelburg, J. (2002). Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS microbiol. Ecol.* 40, 85-95.
- Boyle, D., Wiesner, C., Richardson, A. (1998). Factors affecting the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30(7), 873-882.
- Bull, I.D., Parekh, N.R., Hall, G.H., Ineson, P., Evershed, R.P. (2000). Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature.* 405, 175-178.
- Bumpus, J. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. microbiol.* 61, 2631-35.
- Byss, M., Elhottova, D., Triska, J., Baldrian, P. (2008). Fungal bioremediation of the creosote contaminated soil: influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory scale study. *Chemosphere.* 73, 1518-23.

- Cajthaml, T., Moder, M., Kacer, P., Sasek, V., Popp, P.T. (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *J. Chromatogr.* 974, 213-222.
- Cajthaml, T., Pacakova, V., Sasek, V. (2001). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Listy.* 95, 404-410.
- Castellane, T., Persona, M., Campanharo, J., Lemos, E. (2015). Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. *Inter. J. of Biol. Macromo.* 74, 515-522.
- Cañas, A.I., Alcalde, M., Plou, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Camareno, S. (2007). Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2964–71.
- Cerniglia, C. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin Biotechnol.* 4, 331-338.
- Cerniglia, C. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3, 351-268.
- Cerqueira, V., Hollebach, E., maboni, F., Vainstein, M., Camargo, F., Peralba, M., Bento, F.V. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *bioresource technology.* 102, 11003-010.
- Chagas-Spinelli, A., Kato, M., de Lima, E., Gavazza, S. (2012). Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *J. of Environm. Manag.* 113, 510-516.
- Chaineau, C.H., Yepremian, C., Vidalie, J.F., Ducreux, J., Ballerini, D. (2003). Bioremediation of a crude oil-polluted soil: Biodegradation, leaching and toxicity assessment. *Water Air Soil Pollut.* 114, 419-440.
- Chandler, D.P., Jarrell, A.E., Roden, E.R., Golova, J., Chernov, B., Schipma, M.J. (2006). Suspension array analysis of 16S rRNA from Fe⁻ and SO₄²⁻ reducing bacteria in uranium contaminated sediments undergoing bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4672-87.
- Chang, B.V., Shiung, L., Yuan, S. (2002). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere.* 48, 717-724.

- Chang, B.V., Chang, J.S., Yuan, S.Y. (2001). Anaerobic degradation of phenanthrene in river sediment under nitrate reducing conditions. *Bulletin of Environm. Contamin. and Toxicol.* 67, 898–905.
- Chang, Y.J., Stephen, J.R., Richter, A.P., Venosa, A.D. Bruggemann, J., Macnaughton, S.J.Y. (2000). Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *J. Microbiol. Methods.* 40, 19-31.
- Chen, B., Wang, Y., Hu, D. (2010). Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white rot fungi. *J. Hazard. Mater.* 179(1-3), 845-851.
- Cho, J., Tiedje, J. (2002). Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Appl. Environ. microbiol.* 68, 1425-30.
- Chung, N.H., Lee, I.S., Song, H.S., Bang, W.G. (2000). Mechanisms used by white rot fungus to degrade lignin and toxic chemicals. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 737–752.
- Clemente, A., Anazawa, T., Durrant, L. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Braz. J. Microbiol.* 32, 255-261.
- Collins, P., Kotterman, M., Field, J., Dobson, A. (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environm. Microbiol.* 62, 4563-67.
- Colombo, M., Cavalca, L., Bernasconi, S., Andreoni, V. (2011). Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenicum* strain C3R: A feasibility study in solid and slurry-phase microcosms. *Inter Biodeter & Biodeg.* 65(1), 191-197.
- Corona-Ramírez, L., Iturbide-Argüelles, R. (2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ing. Inv. y Tec.* 1(2), 119-126.
- Covino, S., Svobodová, K., Cvančarova, M., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Kresinová, Z., Galli, E., Cajthaml, T. (2010). Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere.* 79, 855-864.

- Crestini, C., D'Annibale, A., Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Aqueous plant extracts as stimulators of laccase production in liquid cultures of *Lentinus edodes*. *Biotechnol. Tech.* 10, 243–248.
- Cui, Z., Xu, G., Gao, W., Li, Qian, A., Yang, B., Yang, G., Zheng, L.Z. (2014). Isolation and characterization of *Cycloclasticus* strains from Yellow Sea sediments and biodegradation of pyrene and fluoranthene by their syntrophic association with *Marinobacter* strains. *Inter. Biodeterior. & Biodeg.* 91, 45-51.
- Cummings, D.E., Snoeyenbos-West, O.L., Newby, D.T., Niggemyer, A.M., Lovley, D.R., Achenbach, L.A.D. (2003). Diversity of *Geobacteraceae* species inhabiting metal polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses. *Microb. Ecol.* 46, 257-269.
- Cutright, T. (1995). Cutright, Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and kinetics using *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*. *Int. Biodet. Biodeg.* 35(4), 397-408.
- da Silva, M., Cerniglia, C.E., Pothuluri, J.V., Canhos, V.P., Esposio, E. (2003). Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 399-405.
- Daane, L.L., Harjono, I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleroni, N.J., Haggblom, M.M.L. (2002). PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 131-139.
- Daanae, L., Harjono, I., Zylstra, G., Häggblom, M. (2001). Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6), 2683-91.
- D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., Petruccioli, M.A. (2006). Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Biorremediation of soil Historically contaminated with Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1), 28.36.
- Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D., Niazi, A. (2011). Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids Surfaces Biointerfaces.* 84(2), 292-300.

- Dastgheib, S., Amoozegar, M., Khajeh, K., Shavandi, M., Ventosa, A.S. (2012). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 789-798.
- DeBruyn, J.M., Chewning, C.S., Sayler, G.S. (2007). Comparative quantitative prevalence of Mycobacteria and functionally abundant *nidA*, *nahAc*, and *nagAc* dioxygenase genes in coal tar contaminated sediments. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5426-32.
- Dean-Ross, D., Moody, J., Cerniglia, C. (2002). Utilisation of mixtures of Polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS microbiol. Ecol.* 41, 1-7.
- Denaro, R., Auria, G., Di Marco, G., Genovese, M., Troussellier, M., Yakimov, M.M.R. (2005). Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbonpolluted marine environments. *Environ. Microbiol.* 7, 78-87.
- Denef, V.J., Park, J., Rodríguez, J.L., Tsoi, T.V., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M.V. (2003). Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environ. microbiol.* 5, 933-943.
- DeRisi, J., Iyer, V., Brown, P. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* 278, 680-686.
- Derudi, M., Venturini, G., Lombardi, G., Nano, G., , Rota, R.M. (2007). Biodegradation combined with ozone for the remediation of contaminated soils. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 297-303.
- Desai, C., Parikh, R.H., Vaishnav, T., Shouche, Y.S., Mada, war, D.C. (2009). Tracking the influence of long term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes. *Res. Microbiol.* 160, 1-9.
- Devers, M., Soulas, G., Martin-Laurent, F. (2004). Real time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *J. Microbiol. Methods.* 56, 3-15.
- Díaz De Rienzo, M.A., Kamalanathan, I.D., Martin, P.J. (2016). Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry.* 51, 820-827.
- Drysdale, G., Kasan, H., Bux, F. (1999). Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *WaterSA.* 25(3), 357-362.

- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 143-152.
- Dumont, M.G., Radajewski, S.M., Miguez, C.B., McDonald, I.R., Murrell, J.C.M. (2006). Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis. *Environ. Microbiol.* 8, 1240-50.
- Dunbar, J., Ticknor, L., Kuske, C. (2000). Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2943-50.
- Eggen, T., Majcherzyk, A. (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int. Biodet. Biodeg.* 41, 111-117.
- ElFantroussi, S., Urakawa, H., Bernhard, A.E., Kelly, J.J., Noble, P.A., Smidt, H.S. (2003). Direct profiling of environmental microbial populations by thermal dissociation analysis of native rRNAs hybridized to oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2377-82.
- El-Latif-Hesham, A., Khan, S., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Z., Yang, M.A. (2006). Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast.* 23, 879-887.
- Eriksson, M., Sodersten, E., Yu, Z., Dalhammar, G., Mohn, W.W.M. (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 275-284.
- Eriksson, M., Dalhammar, G., Borg-Karlson, A.K. (2000). Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Appl. Microbiol. Biot.* 53, 619-626.
- Fahy, A., Lethbridge, G., Earle, R., Ball, A.S., Timmis, K.N., McGenity, T.J.A. (2005). Effects of long term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environ. Microbiol.* 7, 1192-99.
- Federici, E., Leonardi, V., Giubilei, M.A., Quarantino, D., Spaccapelo, R., D'Annibale, A., Petruccioli, M. (2007). Addition of allochthonous fungi to a historically contaminated soil affects both remediation efficiency and bacterial diversity. *Appl. Microbiol. Biot.* 77, 203-211.

- Fedi, S., Tremalori, V., Scala, D., Perez-Jimenez, J.R., Fava, F., Young, L.S. (2005). T-RFLP analysis of bacterial communities in cyclodextrin-amended bioreactors developed for biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Res. Microbiol.* 156, 201-210.
- Ferhat, S., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaoui, R., Boucherit, A., Mhiri, N., Moulai-Mostefa, N., Sayadi, S.S. (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon contaminated soils. *Inter. Biodeter. & Biodeg.* 65, 1182-88.
- Fernández-Linares, L.C., RojasAvelizapa, N.G., Roldán-Carrillo, T.G., Ramírez-Islas, M.E., Zerraga-Martínez, H.G., Uribe-Hernández, R., Reyes-Ávila, R.J., Flores-Hernández, D., Arce-Ortega, J.M.L. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. México, D.F. Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Ferrarese, E., Andreottola, G., Oprea, I. (2008). Remediation of PAH contaminated sediments by chemical oxidation. *J.Hazard. Mater.* 152, 128-139.
- Festa, S., Coppotelli, B., Morelli, I. (2013). Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated soil. *Inter. Biodeterior. and Biodegrad.* 85, 42-51.
- Filler, D.M., Lindstrom, J.E., Braddock, J.F., Johnson, R.A., Nickalaski, R.D. (2001). Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic. *Cold Reg. Sci. Technol.* 32(2-3), 143-156.
- Flotron, V., Delteil, C., Padellec, Y., Camel, V. (2005). Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process. *Chemosphere.* 59, 1427-37.
- Forney, L., Zhou, X., Brown, C. (2004). Molecular microbial ecology: land of the oneeyed king. *Curr. Opin Microbiol.* 7, 210-220.
- Fries, M.R., Hopkins, G.D., McCarty, P.L., Fomey, L.J., Tiedje, J.M.M. (1997). Microbial succession during a field evaluation of phenol and toluene as the primary substrates for trichloroethene cometabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1515-22.
- Frostegard, A., Tunlid, A., Baath, E. (1993). Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. microbiol.* 59, 3605-17.

- Frutos, F.J.G., Escolano, O., García, S., Babín, M., Fernández, M.D.F. (2010). Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 183(3), 806-813.
- 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, 5463-70.
- Gan, S., Lau, E., Nig, H. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. of Hazard. Mater.* 172(1), 532-549.
- García-Delgado, C., Alfaro-Barta, I., Eymar, E. (2015). Combination of biochar amendment and mycoremediation for polycyclic aromatic hydrocarbons immobilization and biodegradation in creosotecontaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 285, 259-266.
- Gauthier, E., Déziel, E., Villemur, R., Juteau, P., Lépine, F., Beaudet, R.E. (2003). Initial characterization of new bacteria degrading high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2 year enrichment in a two liquid phase culture system. *J. Appl. Microbiol.* 94, 301-311.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., Van der Lelie, D.J. (2006). DsrB gene based DGGE for community and diversity surveys of sulfatereducing bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 66, 194-205.
- Genside, A., Agbo, E., Agbo, M., Dike, E. (2008). Biorremediation of some Nigerian And Arabian Crude Oils by Fungal Isolates. *Int. J. Pure Appl.* 3(2), 37-44.
- Gentry, T.J., Wickham, G.S., Schadt, C.W., He, Z., Zhou, J.T. (2006). Microarray applications in microbial ecology research. *Microb. Ecol.* 52, 159-175.
- Gilbride, K., Lee, D., Beaudette, L. (2006). Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real time process control. *J. Microbiol. methods.* 66, 1-20.
- Gómez, F., Sartaj, M. (2014). Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *Int. Biodeterio. Biodegrad.* 89, 103-109.
- Gómez, W., Gaviria, J., Cardona, S. (2009). Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel. *Dyna.* 76(160), 83-93.

- Gong, Z., Wilke, B.M., Alef, K., Li, P., Zhou, Q. (2006). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from manufactured gas plant contaminated soils using sunflower oil: laboratory column experiments. *Chemosphere*. 62, 780-787.
- Gong, Z., Wilke, B., Alef, K., Li, P. (2005). Influence of soil moisture on sunflower oil extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from a manufactured gas plant soil. *Sci. Total Environ*. 343, 51-59.
- González-Paredes, Y., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J.J., Martínez-Romero, E., Cruz-Sánchez, J.S., Mendoza-López, M.R., Ormeño-Orrillo, E.Y. (2013). Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Appl. Soil Ecol*. 63, 105-111.
- Grace-Liu, P.W., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T., Cheng, S.S.P. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *Int. Biodeterior. and Biodegrad*. 65(8), 1119-27.
- Greene, E.A., Kay, J.G., Jaber, K., Stehmeier, L.G., Voordouw, G.E. (2000). Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol*. 66, 5282-89.
- Greene, E., Voordouw, G. (2003). Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *J. Microbiol. Methods*. 52, 211-219.
- Haack, S.K., Fogarty, L.R., West, T.G., Alm, E.W., Mcguire, J.T., Long, D.T.S. (2004). Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environ. Microbiol*. 6, 438-448.
- Haapea, P., Tuhkanen, T. (2006). Integrated treatment of PAH contaminated soil by soil washing, ozonation and biological treatment. *J. Hazard. Mater*. B136, 244-250.
- Habe, H., Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 67, 225-243.
- Hamady, M., Walker, J., Harris, K.J., Gold, N.J., Knight, R.M. (2008). Error correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat. Methods*. 5, 235-237.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Aoyama, I., Jedidi, N. (2012). Rehabilitation of degraded soils containing aged PAHs based on phytoremediation with alfalfa. *Int. Biodeterior. Biodegr*. 67, 40-47.

- Hamzah, A., Phan, C., Abu-Bakar, N., Wong, K. (2013). Biodegradation of Crude Oil by Constructed Bacterial Consortia and the Constituent Single Bacteria Isolated From Malaysia. *Bioremediat. J.* 17(1), 1-10.
- Hansen, L.D., Nestler, C., Ringelberg, D., Bajpai, R. (2004). Extended bioremediation of PAH/PCP contaminated soils from the POPILE wood treatment facility. *Chemosphere.* 54, 1481–93.
- Haritash, A., Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): a review. *J. of Hazard. Mater.* 169, 1-15.
- Haritash, A., Kaushik, C. (2011). Seasonal and spatial occurrence and distribution of respirable particulate-bound atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Hisar City (India) and Their Potential Health-risks. *J. Water Environ. Pollut.* 8(1), 73-80.
- Harmon, T., Burks, G., Aycaguer, A., Jackson, K. (2001). Thermally enhanced vapor extraction for removing PAHs from lampblack contaminated soil. *J. Environ. Eng.* 127(11), 986-993.
- Hawthorne, S., Poppendieck, D., Grabanski, C., Loehr, R. (2002). Comparing PAH availability from manufactured gas plant soils and sediments with chemical and biological tests. 1. PAH release during water desorption and supercritical carbon dioxide extraction. *Environ. Sci. Technol.* 36(22), 4795-4803.
- Head, I., Jones, D., Röling, J. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Reviews Microbiol.* 4(3), 173-182.
- Heinaru, E., Merimaa, M., Viggor, S., Lehist, M., Leito, I., Truu, J., Heinaru, A.E. (2005). Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol and oil polluted area. *FEMS microbiol. Ecol.* 51(3), 363-373.
- Heitkamp, M., Franklin, W., Cerniglia, C. (1988). Microbial metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: isolation and characterization of a Pyrene degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2549-55.
- Hendrickx, B., Dejonghe, W., Faber, F., Boenne, W., Bastiaens, L., Verstraete, W.B. (2006). PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono oxygenase genes at contaminated sites. *FEMS Microbiol.* 55, 262-273.
- He, Z., Gentry, T.J., Schadt, C.W., Wu, L., Liebich, J., Chong, S.C., Huang, Z., Wu, W., Gu, B., Jardine, P., Criddle, C., Zhou, J.Z. (2007). GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *ISME J.* 1, 67-77.

- Hofrichter, M., Schneibner, K., Schneegab, I., Fritzsche, W. (1998). Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 399-404.
- Howe-Grant, M. (1996). Petroleum. En: Encyclopedia of chemical technology. 4th ed. New York: Wiley Interscience Publication, 342-480.
- Howsan, M., Jones, K. 1998. Sources of PAHs in the environment. *Handbook of environm.* 1, 137-174.
- Hubert, C., Shen, Y., Voordouw, G. (2005). Changes in soilmicrobial community composition induced by cometabolism of toluene and trichloroethylene. *Biodegradation.* 16, 11-22.
- HuiJie, L., CaiYun, Y., Yun, T., GuangHui, L., TianLing, Z.L. (2011). Using population dynamics analysis by DGGE to design the bacterial consortium isolated from mangrove sediments for biodegradation of PAHs. *Int. Biodeterior. and Biodegrad.* 65(2), 269-275.
- Hunter, W. (2014). A *Rhizobium selenitireducens* Protein Showing Selenite Reductase Activity. *Curr. Microbiol.* 68, 311-316.
- IARC (1983). International Agency for Research on Cancer (IARC) Benzo[a]pyrene, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic.* 32, 211-224.
- Ibn-Abubakar, B.S.U., Abdullah, N., Idris, A., Zakaria, M.P., Abdul-Shokur, M.Y.B. (2012). Optimisation of Pyrene Removal by a Mixed Culture in a Soil Slurry Bioreactor using Response Surface Methodology (RSM). *Procedia Engineering.* 50, 786-799.
- Isaac, P., Martínez, F.L., Bourguignon, N., Sánchez, L.A., Ferrero, M.A.P. (2015). Improved PAHs removal performance by a defined bacterial consortium of indigenous *Pseudomonas* and *actinobacteria* from Patagonia, Argentina. *Inter. Biodeterior. Biodeg.* 101, 23-31.
- Jacobo, J., Belliardo, J., Wagstaffe, P. (1986). Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance. *fresenius Anual Chem.* 323, 1-10.
- Jacques, J.S., Okeke, C., Bento, M., Peralba, C.R., Camargo, A.O. (2007). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Bioremediation J.* 11, 1-11.
- Jacques, R.J., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C., Camargo, F.A.R. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour Technol.* 99(7), 2637-43.

- Jacques, R.J.S., Santos, E.C., Bento, F.M., Peralba, M.C.R., Selbach, P.A., Sá, E.L.S., Camargo, F.A.O.R. (2005). Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int. Biodeter. Biodegr.* 56(3), 143-150.
- Jain, P.K., Gupta, V.K., Gaur, R.K., Lowry, M., Jaroli, D.P., Chauhan, U.K.P. (2011). Bioremediation of Petroleum oil Contaminated Soil and Water. *Research J. of Environ. Toxicol.* 5, 1-26.
- Janbandhu, A., Fulekar, M. (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *J. Hazard and mater.* 187, 333-340.
- Jezequel, K., Lebeau, T. (2008). Soil bioaugmentation by free and immobilized bacteria to reduce potentially phytoavailable cadmium. *Bioresour. Technol.* 99(4), 690-698.
- Johannes, C., Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 524-528.
- Jonsson, S., Persson, Y., Frankki, S., Lundstedt, S., Van-Bavel, B., Haglund, P., Tysklind, M.S. (2006). Comparison of Fenton's reagent and ozone oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aged contaminated soils. *J. Soils Sediments.* 6(4), 208-214.
- Jonsson, S., Persson, Y., Frankki, S., Van-Bavel, B., Lundstedt, S., Haglund, P., Tysklind, M.S. (2007). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by Fenton's reagent: a multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties. *J. Hazard. Mater.* 149, 86-96.
- Kamaludeen, S.P., Megharaj, M., Naidu, R., Singleton, I., Juhasz, A.L., Hawke, B.G.S. (2003). Microbial activity and phospholipid fatty acid pattern in long term tannery waste contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 302-310.
- Kanaly, R., Harayama, S. (2000). Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059-67.
- Kao, C.M., Chen, C.Y., Chen, S.C., Chien, H.Y., Chen, Y.L.C. (2008). Application of in situ biosparging to remediate a petroleum hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. *Chemosphere.* 70(8), 1492-99.
- Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M., Watanabe, K. (2006). RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene degrading bacteria from gasoline contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 586-592.

- Kaushik, C., Haritash, A. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health. *Our Earth*. 3(3), 1-7.
- Kawahara, F.K., Davila, B., Al-Abed, S.R., Vesper, S.J., Ireland, J.C., Rock, S.F. (2005). Polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) release from soil during treatment with Fenton's reagent. *Chemosphere*. 31(9), 4131-42.
- Kennes, C., Lema, J. (1994). degradation of major compounds of creosotes (PAH and Phenols) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Lett.* 16, 759-764.
- Khan, F., Husain, T., Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71(2), 95-122.
- Khodadoust, A.P., Bagchi, R., Suidan, M.T., Brenner, R.C., Sellers, N.G.A. (2000). Removal of PAHs from highly contaminated soils found at prior manufactured gas operations. *J. Hazard. Mater.* 80, 159-174.
- Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y., Park, J.M.Y. (2009). Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *J. Biotechnol.* 144(4), 293-298.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H.J. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods*. 58, 169-188.
- Kita-Tsukamoto, K., Wada, M., Yao, K., Kamiya, A., Yoshizawa, S., Uchiyama, N.K. (2006). Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 298-303.
- Kleikemper, J., Schroth, M.H., Sigler, W.V., Schmucki, M., Bernasconi, S.M., Zeyer, J.J. (2002). Activity and diversity of sulfate reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1516-23.
- Kohlmeier, S., Smits, T.H.M., Ford, R.M., Keel, C., Harms, H., Wick, L. (2005). Taking the fungal highway: mobilization of pollutant degrading bacteria by fungi. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4640-46.
- Kotterman, M.J., Vis, E.H., Field, J.A. (1998). Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64, 2853-58.

- Kozdroj, J., Van-Elsas, J. (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Methods.* 43, 197-212.
- Krizova, J., Spanova, A., Rittich, B. (2006). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 36-44.
- Kronholm, J., Kalpala, J., Hartonen, K., Riekkola, M. (2002). Pressurized hot water extraction coupled with supercritical water oxidation in remediation of sand and soil containing PAHs. *J. Supercrit. Fluids.* 23, 123-134.
- Kronholm, J., Kuosmanen, T., Hartonen, K., Riekkola, M. (2003). Destruction of PAHs from soil by using pressurized hot water extraction coupled with supercritical water oxidation. *Waste Manage.* 23, 253-260.
- Kúsmierz, M., Oleszczuk, P., Kraska, P., Palys, E., Andruszczak, S.M. (2016). Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biochar amended soil. *Chemosphere.* 146, 272-279.
- Kubátová, A., Jansen, B., Vaudoisot, J., Hawthorne, S. (2002). Thermodynamic and kinetic models for the extraction of essential oil from savory and polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with hot (subcritical) water and supercritical CO₂. *J. Chromatogr.* 973, 175-188.
- Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., Tunkanen, T. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *J. Environ. Manage.* 78, 382-391.
- Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Ritchkova, M.I., Philp, J.C., Cunningham, C.J., Christofi, N.M. (2003). Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil Using Slurry Phase Biological Treatment and Land Farming Techniques. *Soil Sediment Contam. An Int. J.* 12(1), 85-99.
- Lagadec, A., Miller, D., Lilke, A., Hawthorne, S. (2000). Pilot scale subcritical water remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon and pesticide contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1542-48.
- Langworthy, D., stapleton, R., Sayler, G., Findlay, R. (1998). Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Environ. microbiol.* 64, 3422-28.

- Lee, P., Ong, S., Golchin, J., Nelson, G. (2001). Use of solvents to enhance PAH biodegradation of coal tar contaminated soils. *Water Res.* 35(16), 3941-49.
- Leonardi, V., Giubilei, M.A., Federici, E., Spaccapelo, R., Sasek, V., Novotny, C., Petruccioli, M., D'Annibale, A. (2008). Mobilizing agents enhance fungal degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and affect diversity of indigenous bacteria in soil. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 273-285.
- Lerat, S., England, L.S., Vincent, M.L., Pauls, K.P., Swanton, C.J., Klironomos, J.N.S. (2005). Real time polymerase chain reaction quantification of the transgenes for roundup ready corn and roundup ready soybean in soil samples. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1337-42.
- Librando, V., Hutzinger, O., Tringali, G., Aresta, M. (2004). Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments and soil samples. *Chemosphere.* 54, 1189-97.
- Li, J., Chen, B. (2002). Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by non ionic surfactants. *Chem. Eng. Sci.* 57, 2825-35.
- Li, X.J., Lin, X., Li, P.J., Liu, W., Wang, L., Ma, F., Chukwuka, K.S. (2009). Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *J. of Hazard. Mater.* 172, 601-605.
- Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., Gong, Z.X. (2008). Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J. of Hazard. Mater.* 150, 21-26.
- Li, X., Lin, X., Zhang, J., Wu, Y., Yin, R., Feng, Y., Wang, Y. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by crude extracts from spent mushroom substrate and its possible mechanisms. *Current Microbiol.* 60, 336-342.
- Lin, M., Ning, X., An, T., Zhang, J., Chen, C., Ke, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Sun, J., Liu, J.M. (2016). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in textile dyeing sludge with ultrasound and Fenton processes: Effect of system parameters and synergistic effect study. *J. Hazard. Mater.* 307, 7-16.
- Lisiecki, P., Chrzanowski, L., Szulc, A., Ławniczak, L., Białas, W., Dziadas, M., Heipieper, H.J. (2014). Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. *Fuel.* 116(1), 321-327.

- Liu, W., Marsh, T., Cheng, H., Forney, L. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-22.
- Liu, W., Zhu, L. (2005). Environmental microbiology on a chip and its future impacts. *Trends Biotechnol.* 23, 174-179.
- Lors, C., Damidot, D., Ponge, J., Périé, F. (2012). Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environ, Pollut.* 165, 11-17.
- Loy, A., Schulz, C., Lucker, S., Schopfer-Wendels, A., Stoecker, K., Baranyi, C., Lehner, A., Wagner, M.A. (2005). 16S rRNA gene based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales". *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1373-86.
- Magalhães, S., Ferreira, R., Castro, P. (2009). Investigations into the application of a combination of bioventing and biotrickling filter technologies for soil decontamination processes a transition regime between bioventing and soil vapour extraction. *J. Hazard. Mater.* 170(2), 711-715.
- Mahmood, S., Paton, G., Prosser, J. (2005). Cultivation independent in situ molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil. *Environ. Microbiol.* 7, 1349-60.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes Versicolor*. *Enzyme and Microbial Technol.* 22, 335-341.
- Malina, G., Grotenhuis, J.T.C., Rulkens, W.H., Mous, S.L.J., Wit, J.C.M.G. (1998). Soil Vapour Extraction Versus Bioventing of Toluene and Decane in Bench Scale Soil Columns. *Environ. Technol.* 19(10), 977-991.
- Mancera-López, L., Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castañeda, G., Barrera-Cortés, J.M. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon contaminated soil by a combined system of biostimulation bioaugmentation with filamentous fung. *Int. biodeterior. Biodegr.* 61(2), 151-160.

- Manefield, M., Whiteley, A., Griffiths, R., Bailey, M. (2002). RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5367-73.
- Manli, W., Liming, C., Yongqiang, T., Yi, D., Warren, A.W. (2013). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environ. Pollut.* 178(01), 152-158.
- Manoharachary, C., Sridhar, K., Reena, S., Adholeya, A., Suryanarayanan, T.S., Seema-Rawat, J.B.N. (2005). Fungal biodiversity: distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Curr. Sci.* 89, 58-71.
- Mao, J., Luo, Y., Teng, Y., Li, Z. (2012). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *Inter. Biodeter. & Biodeg.* 70(01), 141-147.
- Mapelli, V., Olsson, Nielsen, Jens. (2009). Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. *Trends Biotechnol.* 26, 490-497.
- Marin, J., Hernández, T., García, C. (2005). Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environ. Res.* 98(2), 185-195.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 6, 47-51.
- Marsh, T. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin Microbiol.* 3(2), 23-27.
- Maturi, K., Reddy, K. (2006). Simultaneous removal of organic compounds and heavy metals from soils by electrokinetic remediation with a modified cyclodextrin. *Chemosphere.* 63, 1022-31.
- Melnyk, A., Dettlaff, A., Kuklinska, K., Namiesnik, J., Wolska, L.A. (2015). Concentration and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in surface soil near a municipal solid waste (MSW) landfill. *Sci. of Total Environ.* 530-531, 18-27.
- Menendez-Vega, D., Gallego, J.L.R., Pelaez, A.I., Fernández de Cordoba, G., Moreno, J., Muñoz, D., Sanchez, J.D. (2007). Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *Eur. J. Soil Biol.* 43(5), 310-321.

- Miège, C., Dugay, J., Hennion, M. (2003). Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 995, 87-97.
- Miller, J., Olejnik, D. (2004). Ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water solution. *Ozone Sci. Eng.* 26(5), 453-464.
- Moody, J., Freeman, J., Doerge, D., Cernigla, C. (2001). Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 4(67), 1476-83.
- Morrison, R.T., Boyd, R.N. (Ed.) (1998). Química Orgánica. Clasificación de los hidrocarburos. Boston, Massachusetts, E.U.A. Pearson, 39-49.
- Moscoso, F., Tejjiz, I., Deive, F., Sanromán, M. (2012). Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Biores. Technol.* 119, 270-276.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* 165(5), 363-375.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Pritchard, P.H. (1989). Action of a fluoranthene utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. and Environ. Microbiol.* 55, 3085-90.
- Mulligan, C., Yong, R., Gibbs, B. (2001). Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng. Geol.* 60, 371-380.
- muños-Iniestra, D. J. (2012). Manual de métodos de análisis de suelo. primera edición ed. Mexico, D.F.: Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Murrell, J., Radajewski, S. (2000). Cultivation independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res. Microbiol.* 151, 807-814.
- Nam, K., Rodríguez, W., Kukor, J. (2001). Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction. *Chemosphere.* 45(1), 11-20.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G.P. (2003). Microbial diversity and soil function. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655-670.

- Nasseri, S., Kalantary, R.R., Nourieh, N., Naddafi, K., Mahvi, A.H., Baradaran, N.S. (2010). Influence of bioaugmentation in biodegradation of PAHs contaminated soil in bioslurry phase reactor. *Environ. Health Sci. Eng.* 7(3), 199-208.
- Neufeld, J., Dumont, M., Vohra, J., Murrell, J. (2007). Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb. Ecol.* 53, 435-442.
- Niepceron, M., Martin-Lauren, F., Crampon, M., Portet-Koltalo, F., Akpa-Vinceslas, M., Legras, M., Bru, D., Bureau, F., Bodilis, J.M. (2013). GammaProteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. *Environ. Pollut.* 180, 199-205.
- Novotný, C., Erbanová, P., Sasek, V., Kubátová, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J., Zadrazil, F. (1999). Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white-rot fungi. *Biodegradation.* 10, 159-168.
- Nyssonen, M., Piskonen, M., Itavaara, M. (2006). A targeted real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment. *Microbiol. Ecol.* 53, 533-543.
- Okoro, C., Agrawal, A., Callbeck, C. (2012). Isolation and characterization of thermotolerant and halotolerant aerobic bacterial that produce biosurfactants and degrade petroleum hydrocarbons from produced water discharge point. *Nature and Science.* 10(8), 53-62.
- Oleszczuk, P., Jóska, I., Kúsmierz, M., Futa, B., Wielgosz, E., Igeza, S., Pranagal, J.P. (2014). Microbiological biochemical and ecotoxicological evaluation of soils in the area of biochar production in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon content. *Geoderma.* 213, 502-511.
- O'Mahony, M., Dobson, A., Barnes, J., Singleton, I. (2006). The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. *Chemosphere.* 63, 307-314.
- Ortiz, I., Sanz, J., Dorado, M., Villar, S. (2007). Metales pesados. La contaminación de los suelos. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Alcalá: Universidad de Alcalá.
- Ortiz, S. (2007). Identificación de fuentes contaminantes de hidrocarburos en el suelo. Distrito Federal: México.
- Osborn, A., Moore, E., Timmis, K. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2, 39-50.

- Osborne, C., Rees, G., Bernstein, Y., Janssen, P. (2006). New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. microbiol.* 72, 1270-78.
- Osterreicher-Cunha, P., Vargas, E.D.A., Guimaraes, J.R.D., de Campos, T.M.P., Núñez, C.M.F., Costa, A., Antunes, F.D.S., da Silva, M.I.P., Mano, D.M.P. (2004). Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. *J. Hazard. Mater.* 110(3), 63-76.
- Ozaki, S., Kishimoto, N., Fujita, T. (2007). Change in the Predominant Bacteria in a Microbial Consortium Cultured on Media Containing Aromatic and Saturated Hydrocarbons as the Sole Carbon Source. *Microbes Environm.* 22(2), 128-135.
- Pampanin, D.M., Sydnés, M.O. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment. INTECH. Cap. 5, 83-118.
- Pannu, J., Singh, A., Ward, O. (2004). Vegetable oil as a contaminated soil remediation amendment: application of peanut oil for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Process Biochem.* 39, 1211-16.
- Patel, J., Madamwar, D. (2013). Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Mar. Pollut. Bull.* 74(1), 199-207.
- Patel, V., Jain, S., Madamwar, D. (2012). Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresour. Technol.* 107, 122-130.
- Patnaik, P. (1999). A Comprehensive Guide to the Properties of Hazardous Chemical Substances. 2 nd ed. s.l. John Wiley & Sons Publishers.
- Paudyn, K., Rutter, A., Kerry-Rowe, R., Poland, J. (2008). Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. *Cold Reg. Sci. Technol.* 53(1), 102-114.
- Pérez-Sánchez, bn- R., Juárez-Juárez, M., Rodríguez-Pascual, L. (2011). Manual de laboratorio de técnicas microbiológicas. México, DF. Instituto Politécnico Nacional.
- Pham, T., Tu, Y., Sylvestre, M. (2012). Remarkable ability of *Pandoraea pnomenusa* Remarkable ability of *Pandoraea pnomenusa* B356 biphenyl dioxygenase to metabolize simple flavonoids. *Appl. Environ Microbiol.* 78, 3560-70.

- Powell, S., Ferguson, S., Bowman, J., Snape, I. (2006). Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation. *Microb. Ecol.* 52, 523-532.
- Prasanna, D., Venkata, S., Purushotham, B., Sarma, P. (2008). Bioremediation of anthracene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode. *J. Hazard. Mater.* 153(1), 244-251.
- Priyanka, P., Arun, A., Ashwini, P., Rekha, P. (2015). Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18P. *Carbohydrate Polymers.* 126, 215-221.
- Providenti, M., Lee, H., Trevors, J. (1993). Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J. Ind. Microbiol.* 12, 379-395.
- Rababah, A., Matsuzawa, S. (2002). Treatment system for solid matrix contaminated with fluoranthene. II—Recirculating photodegradation technique. *Chemosphere.* 46, 49-57.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N., Murrell, J. (2000). Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature.* 403, 646-649.
- Ralebitso, T.K., Roling, W.F., Braster, M., Senior, E., van Verseveld, H.W.T. (2000). 6S rDNA based characterization of BTX catabolizing microbial associations isolated from a South African sandy soil. *Biodegradation.* 11, 351-357.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.C., Mougel, C., Thioulouse, J., Nazaret, S.L. (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4479-87.
- Reddy, K., Ala, P., Sharma, S., Kumar, S. (2006). Enhanced electrokinetic remediation of contaminated manufactured gas plant site. *Eng. Geol.* 85, 132-146.
- Rehmann, K., Noll, H., Steiberg, C., Ketttrup, A. (1998). Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2. *Chemosphere.* 36(14) 256-261.
- Renoldi, F., Lietti, L., Saponaro, S., Bonomo, L., Forzatti, P.F. (2003). Thermal desorption of a PAH-contaminated soil: a case study, in: C.A. Brebbia. En: *Ecosystems and Sustainable Development.* Ukraina. 1123-32.

- Rhee, S.K., Liu, X., Wu, L., Chong, S.C., Wan, X., Zhou, J.S. (2004). Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *App. Environ. Microbiol.* 70, 4303-17.
- Richardson, R.E., Bhupathiraju, V.K., Song, D.L., Goulet, T.A., Alvarez-Cohen, L.R. (2002). Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2652-62.
- Rivera-Cruz, M.C., Ferrera-Cerrato, R., Haller, V.V., Rodríguez, R., Fernández, L.M. (2002). Adaptation and Selection of Autochthonous Microorganisms in Culture Media Enriched with Crude Petroleum. *Terra.* 20, 423-434.
- Rodríguez-Rodríguez, C.E., Barón, E., Gago-Ferrero, P., Jelíc, A., Llorca, M., Farré, M., Díaz-Cruz, M.S., Eljarrat, E., Petrovic, M., Caminal, G., Barceló, D., Vicent, T.C. (2012). Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor. *J. Hazard. Mater.* 233-234, 235-243.
- Rogers, S., Mooreman, T., Onge, S. (2007). Fluorescent in situ hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 620-631.
- Rojano, E., Ruiz, O. (2012). Un método de gestión ambiental para el tratamiento y la disposición final adecuada de un residuo peligroso. caso: tierra fuller contaminada con aceite dielectrico. *Gestión y Amb.* 15(2), 101-115.
- Romero, M., Cazau, M., Giorgieri, S., Arambarri, A. (1998). Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environ. Pollut.* 101, 355-359.
- Ruberto, A.M., Vazquez, S.C., Curtosi, A. (2006). Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. *Bioremediation J.* 10, 191-201.
- Ruiz.Fernández, A.C., Betancourt-Portela, J.M., Sericano, J.L., Sanchez.Cabeza, J.A., Espinosa, L.F., Cardoso-Mohedano, J.G., Pérez-Bernal, L.H., Garay-Tinoco, J.A.A. (2016). Coexisting sea based and land based sources of contamination by PAHs in the continental shelf sediments of Coatzacoalcos River discharge area (Gulf of Mexico). *Chemosphere.* 144, 591-598.
- Run, A., Eyini, M. (2011). Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. *Bio. Technol.* 102, 8063-70.

- Run, S., Jinghua, J., Guangdong, S., Ying, L., Zhipei, L.S. (2010). Screening and degrading characteristics and community structure of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial consortium from contaminated soil. *J. of Environ. Sci.* 22(10), 1576-85.
- Sack, U., Hofrichter, M., Fritsche, W. (1997). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *Fems Microbiology Letters.* 152, 227-234.
- Sahin, N., Tani, A., Kotan, R., Sedláček, I., Kimbara, K., Tamer, A.U.N. (2011). *Pandoraea oxalativorans* sp. nov., *Pandoraea faecigallinarum* sp. nov. and *Pandoraea vervacti* sp. nov., isolated from oxalate-enriched culture. *Inter. J. of Systematic and Evolut. Microbiol.* 78, 2247-53.
- Saichek, R., Reddy, K. (1993). Effect of pH control at the anode for the electrokinetic removal of phenanthrene from kaolin soil. *Chemosphere.* 14(1), 13-26.
- Said, O.B., Goñi-Urriza, M., Bour, M.E., Aissa, P., Duran, R.O. (2010). Bacterial community structure of sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a southern mediterranean coastal Anthropized Lagoon. *Microb. Ecol.* 59(3), 445-456.
- Sack, U., Hofrichter, M., Fritsche, W. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 227-234.
- Saleh-Lakha, S., Miller, M., Campbell, R.G., Schneider, K., Elahimanesh, P., Hart, M.M.S. (2005). Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *J. Microbiol. Methods* 63, 1-19.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sánchez-Trujillo, M., Morillo, E., Villaverde, J., Lacorte, S. (2013). Comparative effects of several cyclodextrins on the extraction of PAHs from an aged contaminated soil. *Environ. Pollut.* 178, 52-58.
- Sanz, J., Kochling, T. (2007). Molecular biology techniques used in waster treatment: an overview. *Process Biochem.* 42, 119-133.
- Schryver, J.C., Brandt, C.C., Pfiffner, S.M., Palumbo, A.V., Peacock, A.D., White, D.C.J. (2006). Application of nonlinear analysis methods for identifying relationships between microbial community structure and groundwater geochemistry. *Microbiol. Ecol.* 51, 177-188.

- Shi, Y., Chai, L., Tang, C., Yang, Z., Zheng, Y., Chen, Y., Jing, Q.Y. (2013). Biochemical investigation of kraft lignin degradation by *Pandoraea* sp. B-6 isolated from bamboo slips. *Bioprocess and Biosystems Engin.* 36, 1957-65.
- Shi, Z., Tian, L., Zhang, Y. (2010). Molecular biology approaches for understanding microbial polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation. *Acta Ecologica Sinic.*, 30(1), 292-295.
- Siemers, A., Mänz, J., Wolf-Ulrich, P., Wolfgang, K. (2015). Development and application of a simultaneous SPE method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylated PAHs, heterocyclic PAHs (NSO-HET) and phenols in aqueous samples from German Rivers and the North Sea. *Chemosphere.* 122(01), 105-114.
- Silva, A., Delerue-Matos, C., Fiuza, A. (2005). Use of solvent extraction to remediate soils contaminated with hydrocarbons. *J.Hazard. Mater.* 124, 224-229.
- Silva-Castro, G.A., Rodríguez-Calvo, A., González-López, J., Calvo, C.G. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land farming treatments. *Environ. Res.* 137, 49-58.
- Silva, I., Grossman, M., Durrant, L. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *Int. Biodet. Biodeg.* 63(2), 224-229.
- Silva, I.S., Santos, E.C., Menezes, C.R., Faria, A.F., Franciscon, E., Grossman, M., Durrant, L.R.I. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Biores. Technol.* 100, 4669-75.
- Singh, A., Ward, O. (2004). *Biodegradation and Bioremediation: Series: Soil Biology.* 2th ed. New York: Springer-Verlag.
- Singleton, D.R., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L.M., Aitken, M.D.D. (2006). Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *Environ. microbiol.* 10(8), 1736-45.
- Šnajdr, J., Baldrian, P. (2006). Production of lignocellulose degrading enzymes and changes in soil bacterial communities during the growth of *Pleurotus ostreatus* in soil with different carbon content. *Folia Microbiol.* 51, 579-590.

- Snajdr, J., Dobiášová, P., Vetrovský, T., Valášková, V., Alawi, A., Boddy, L., Baldrian, P. (2011). Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 80-90
- Song, B., Palleroni, N., Häggblom, M. (2000). Isolation and characterization of diverse halobenzoate degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8), 3446-53.
- Song, Y., Jing, X., Fleischmann, S., Wilke, B. (2002). Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere.* 48, 993-1001.
- Spack, L., Alvarez, C., Martins, J., Tarradellas, J. (1998). Comparison of supercritical fluid extraction (SFE), soxhlet and shaking methods for pendimethalin extraction from soils: effect of soil properties and water content. *J. contam. Hydrol.* 33, 171-185.
- Spiegelman, D., Whissell, G., Greer, C. (2005). A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can J. Microbiol.* 51, 355-386.
- Steffen, K.T., Schubert, S., Tuomela, M., Hatakka, A., Hofrichter, M. (2007). Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter decomposing fungi. *Biodegradation.* 18, 359-369.
- Steffen, K.T. (2003). Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter decomposing basidiomycetous fungi. Academic Dissertation in Microbiology. Finland, University of Helsinki.
- Sui, H., Li, X. (2011). Modeling for volatilization and bioremediation of toluene contaminated soil by bioventing. *Chinese J. Chem. Eng.* 19(2), 340-348.
- Sun, G.D., Jin, J.H., Xu, Y., Zhong, Z.P., Liu, Y., Liu, Z.P.G. (2014). Isolation of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degrading strain and its enhancing the removal of APM-PAHs from heavily contaminated soil. *Inter. Biodeter. & Biodeg.* 90, 23-28.
- Sun, R., Jin, J., Sun, G., Liu, Y., Liu, Z.R. (2010). Screening and degrading characteristics and community structure of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial consortium from contaminated soil. *J. Environm. Sci.* 22(10), 1576-85.
- Sun, Y., Polishchuk, E., Radoja, U., Cullen, W. (2004). Identification and quantification of arsC genes in environmental samples by using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 58, 335-349.

- Sutherland, J. (2004). Degradation of hydrocarbons by yeasts and filamentous fungi. In Fungal Biotechnology in Agricultural. En: D. Aurora, ed. *Food and Environm. Applic.*. New York: Marcel Dekker. 443-455.
- Szczepaniak, Z., Cyplik, P., Juzwa, W., Czarny, J., Staninska, J., Piotrowska-Cyplik, A.Z. (2015). Antibacterial effect of the *Trichoderma viride* fungi on soil microbiome during PAH's biodegradation. *Inter. biodeterior. & Biodeg.* 104, 170-177.
- Tam, N.F.Y., Guo, C.L., Yau, C., Ke, L., Wong, Y.S.N. (2003). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia enriched from mangrove sediments. *Water Sci. Technol.* 48, 177-183.
- Tam, N., Guo, C., Yau, W., Wong, Y. (2002). Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong-Kong. *Mar. Poll. Bull.* 42, 316-324.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.K. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biol. and Evol.* 30, 2725-29.
- Tang, J., Feng, T., Cui, C., Feng, Y. (2013). Simultaneous biodegradation of phenanthrene and oxidation of arsenite by a dual functional bacterial consortium. *Int. Biodeterior. and Biodegrad.* 82, 173-179.
- Tang, J., Tam, N.F.Y., Guo, C.L., Yau, C., Ke, L., Wong, Y.S.X. (2010). Construction of an artificial microalgal bacterial consortium that efficiently degrades crude oil. *J. Hazard. Mater.* 181(3), 1158-62.
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formanek, P., Martínez-Chois, C., D'Innocenzo, M., Muanda, F., Dicko, A., Rejšek, K., Falla, J.D. (2011). Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Sci. of the Total Environ.* 409, 4489-95.
- Teixeira, V., Casal, S., Oliveira, M. (2007). PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chem.* 104, 106-112.
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., Christie, P.Y. (2010). Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Biores. Technol.* 101, 3437-43.

- Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., Li, Z., Christie, P.Y. (2011). Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *J. of Hazard. Mater.* 186, 1271-76.
- Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R. (2012). 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(6), 825-835.
- Thion, C., Cébron, A., Beguiristain, T., Leyval, C. (2012). PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *Inter. Biodeter. & Biodeg.* 68(1), 28-35.
- Tian, Y., Liu, H.J., Zheng, T.L., Kwon, K.K., Kim, S.J., Yan, C.L.Y. (2008). PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin.* 01(57), 707-715.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J.J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* 13, 109-122.
- Ting, W., Yuan, S., Wu, S., Chang, B. (2011). Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *Inter. Biodeter. & Biodeg.* 65, 238-242.
- Tiquia, S.M., Wu, L., Chong, S.C., Passovets, S., Xu, D., Xu, Y.S. (2004). Evaluation of 50 mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *Biotechniques.* 36, 664-670.
- Tornberg, K., Bååth, E., Olsson, S. (2003). Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacterial community of polluted and unpolluted soils. *Biol. Fert. Soils.* 37, 190-197.
- Torres-Delgado, K., Zuluaga-Montoya, T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Medellín: Tesis de licenciatura.
- Tsao, C., Song, H., Bartha, R. (1998). Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12), 4924-29.
- Valentín, L., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M. (2006). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* 58, 15-21.
- Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Christie-Oleza, J., Ferrero, M., Bosch, R., MacCormack, W.P.S. (2013). Characterization of bacterial consortia from diesel-

contaminated Antarctic soils: Towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *Int. biodeterior. and Biodegrad.* 77, 22-30.

Verrhiest, G.J., Clement, B., Volat, B., Montuelle, B., Perrodin, Y.G. (2002). Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and microbial communities in a natural freshwater sediment. *Chemosphere.* 46, 187-196.

Viglianti, C., Hanna, K., Brauer, C., Germain, P. (2006). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged contaminated soil using cyclodextrins: experimental study. *Environ. Pollut.* 140, 427-435.

Vila, J., María-Nieto, J., Mertens, J., Sprinrael, D., Grifoll, M.J. (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *Fems Microbiol. Ecol.* 73(2), 349-362.

Vinas, M., Sabate, J., Guasp, C., Lalucat, J., Solanas, A.M. (2005). Culture dependent and independent approaches establish the complexity of a PAH degrading microbial consortium. *Canadian J. of Microbiol.* 51, 897-909.

Volkering, F., Breure, A., Rulkens, W. (1998). Microbiological Aspects of surfactant use for Biological Soil Remediation. *Biodegradation.* 8, 401-417.

Voordouw, G., Voordouw, J.K., Jack, T.R., Foght, J., Fedorak, P.M., Westlake, D.K.G. (1992). Identification of distinct communities of sulfate reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3542-52.

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

Waigi, M.G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., Gao, Y.M. (2015). Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *Inter. Biodeter. & Biodeg.* 104, 333-349.

Wakase, S., Sasaki, H., Itoh, K., Otawa, K., Kitazume, O., Nonaka, J., Satoh, M., Sasaki, T., Nakai, Y.S. (2007). Investigation of the microbial community in a microbiological additive used in a manure composting process. *Biores. Technol.* 99, 2687-93.

Wang, C., Wang, F., Wang, T., Bian, Y., Yang, X., Jiang, X.C. (2010). PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). *J. Hazard. Mater.* 176(1-3), 41-47.

- Wang, X., Wang, Q., Li, S., Li, W. (2015). Degradation pathway and kinetic analysis for p-xylene removal by a novel *Pandoraea* sp. strain WL1 and its application in a biotrickling filter. *J. of Hazard. Mater.* 288, 17-24.
- Wang, Y., Tam, N. (2011). Microbial community dynamics and biodegradation of polycyclic aromatic HCs in polluted marine sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin.* 63, 424-430.
- Ward, O., Singh, A., Van-Hamme, J. (2003). Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *J. Ind. Microbiol.* 30, 260-270.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. of Biological Chem.* 267(2), 2388–95.
- Watanabe, K., Futamata, H., Harayama, S. (2002). Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Anton. Van Leeuwen.* 81, 655-663.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 237-241.
- Watts, J.E., Wu, Q., Schreier, S.B., May, H.D., Sowers, K.R.J. (2001). Comparative analysis of polychlorinated biphenyl dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. *Environ. Microbiol.* 3, 710-719.
- Watts, R., Haller, D., Jones, A., Tell, A. (2000). A foundation for the risk-based treatment of gasoline contaminated soils using modified Fenton's reactions. *J. Hazard. Mater.* B76, 73-89.
- Wei, G., Yu, J., Zhu, Y., Chen, W., Wang, L.G. (2008). Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. *J. of Hazard. Mater.* 151, 111-117.
- West, K.A., Johnson, D.R., H.U., Santis, T.Z., Brodie, E.L., Lee, P.K.H., Feil, H., Andersen, G.L., Zinder, S.H., Alvarez-Cohen, L.K. (2008). Comparative genomics of “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195 and an enrichment culture containing unsequenced “*Dehalococcoides*” strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3533-40.

- Whelan, M.J., Coulon, F., Hince, G., Rayner, J., McWatters, R., Spedding, T., Snape, I.M. (2015). Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions. *Chemosphere*. 131, 232-240.
- Widada, J., Nojiro, H., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T.J. (2002). Enhanced degradation of carbazole and 2, 3-dichlorodibenzo-p-dioxin in soils by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Chemosphere*. 49, 485-491.
- Widmer, F., Fliessbach, A., Laczko, E., Schulze-Aurich, J., Zeyer, J.F. (2001). Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog analyses. *Soil Biol. Biochem*. 33, 1029-36.
- Wild, S., Jones, K. (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut*. 88(1), 91-108.
- Wilson, M., Bakermans, C., Madsen, E. (1999). In situ, real time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl. Environ. Microbiol*. 65, 80-87.
- Winquist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K.T., Jorgensen, K.S., Tuomela, M. (2014). Bioremediation of PAH contaminated soil with fungi e From laboratory to field scale. *Int. Biodeterior. and Biodegrad*. 86, 238-247.
- Wintzingerode, F., Gobel, U., Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev*. 21, 213-229.
- Wolicka, D., Agnieszka, S., Borkowski, A., Bielecka, A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Biores. Technol*. 100(1), 3221-27.
- Wu, L., Liu, X., Schadt, C., Zhou, J. (2006). Microarray based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole community genome amplification. *Appl. Environ. Microbiol*. 72, 4931-41.
- Wu, L., Thompson, D.K., Li, G., Hurt, R.A., Tiedje, J.M., Zhou, J.L. (2001). Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. microbiol*. 67, 780-790.

- Wu, L., Thompson, D.K., Liu, X., Fields, M.W., Bagwell, C.E., Tiedje, J.M.L. (2004). Development and evaluation of microarray based whole genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6775-82.
- Wu, Y., Teng, Y., Li, Z., Liao, X., Luo, Y. (2008). Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biol. & Biochem.* 40, 789-796.
- Wu, M., Chen, L., Tian, Y., Ding, Y., Dick, W.A.M. (2013). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environ. Pollut.* 178, 152-158.
- Xu, N., Bao, M., Sun, P., Li, Y. (2013). Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. *Biores. Technol.* 149, 22-30.
- Ye, B., Siddiqi, M.A., Maccubbin, A.E., Kumar, S., Sikka, H.C.B. (1996). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30, 136-142.
- Yuan, S., Chang, J., Yen, J., Chang, B. (2001). Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere.* 43, 273-278.
- Yuan, S., Shiung, L., Chang, B. (2002). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by inoculated microorganisms in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 66-73.
- Yu, J., Cai, W., Cheng, Z., Cheng, J. (2014). Degradation of dichloromethane by an isolated strain *Pandoraea pnomenusa* and its performance in a biotrickling filter. *J. Environ. Sci.* 26, 1108-17.
- Yu, S., Ke, L., Wong, Y., Tam, N. (2005). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ. Int.* 31(2), 149-154.
- Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil Soils.* 5, 111-129.
- Zelles, L., Bai, Q. (1993). Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.* 25, 495-507.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., Li, X. (2010). Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil. *J. of Hazard. Mater.* 183, 718-723.

- Zeng, J., Lin, X.G., Zhang, J., Li, X.Z., Wong, M.H. (2011). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from *E. coli*. *Appl. Microbiol. and Biotech.* 89, 1841-49.
- Zhang, J., Zhang, X., Liu, J., Li, R., Shen, B.J. (2012). Isolation of a thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. SH-1, capable of degrading aliphatic hydrocarbons and naphthalene simultaneously, and identification of its naphthalene degrading pathway. *Biores. Technol.* 124, 83-89.
- Zhang, Z., Gai, L., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Wang, Z., Xu, P. (2010). Characterization and biotechnological potential of petroleum degrading bacteria isolated from oil contaminated soils. *Biores. Technol.* 101(1), 8452-56.
- Zhang, L., Li, P., Gong, Z., Li, X. (2008). Photocatalytic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil surfaces using TiO₂ under UV light. *J. Hazard. Mater.* 158, 478-484.
- Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., Tam, N.F.Y.Y. (2011). Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp.. *Biores. Technol.* 102, 2965-72.
- Zhou, J. (2003). Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin Microbiol.* 203, 288-294.
- Zhou, J., Thompson, D. (2002). Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Curr. Opin Biotechnol.* 13, 204-207.
- Zhou, W., Zhu, L. (2007). Efficiency of surfactant-enhanced desorption for contaminated soils depending on the component characteristics of soil surfactant PAHs system. *Environ. Pollut.* 147, 66-73.

ANEXOS**ANEXO A**

Análisis de varianza factorial en los factores y sus interacciones (variable % degradación).

ANOVA				
	df	MS	P	Significancia
Principales efectos				
Inoculo (A)	4	52700.8716	.0001	***
Tiempo (B)	2	11072.5076	.0001	***
Concentración (C)	1	1013.3778	.0001	***
Interacción				
A*B	8	7620.5024	.0001	***
A*C	4	1849.4200	.0001	***
B*C	2	99.43822	.0001	***
A*B*C	8	108.8473	.0001	***
Error	60	14.7000		

***: altamente significativo

ANEXO BCuadro 21. Prueba de Tukey $P > 0.05$.

Factor A			
Tratamiento	Media	N	Diferencia significativa
CONS	61.417	18	A
PLEU	49.028	18	B
BACT	48.600	18	B
CONT2	6.728	18	C
CONT1	2.472	18	D
Factor B			
Tratamiento	Media	N	Diferencia significativa
110	47.433	30	A
80	33.240	30	B
50	20.273	30	C
Factor C			
Tratamiento	Media	N	Diferencia significativa
138.35	37.004	45	A
268.23	30.293	45	B

ANEXO C

Cuadro 22. Prueba de Tukey $P > 0.05$ entre tratamientos.

Tratamiento	Media	N	Diferencia significativa	Tratamiento	Media	N	Diferencia significativa
T17	86.7000	3	A	T14	27.6333	3	M
T5	83.3000	3	B	T8	26.1333	3	M
T18	75.4667	3	C	T2	13.4000	3	N
T15	72.2667	3	D	T30	8.5333	3	O
T11	72.0333	3	D	T28	7.7000	3	OP
T12	69.9000	3	E	T26	7.2333	3	OPQ
T6	68.3000	3	F	T27	6.6000	3	Q
T3	54.5333	3	G	T25	6.0000	3	QR
T13	53.3000	3	G	T24	4.5000	3	RS
T16	53.1333	3	G	T29	4.3000	3	ST
T9	48.2333	3	H	T20	3.6333	3	ST
T10	45.1000	3	I	T22	2.8667	3	TU
T4	40.8667	3	J	T19	1.4333	3	UV
T1	33.7667	3	K	T23	1.3000	3	UV
T7	30.2000	3	L	T21	1.1000	3	V

Para **T** ver tabla 5.4