

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

SELECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE
HONGOS POTENCIALMENTE UTILIZABLES EN
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y AGUAS
CONTAMINADAS CON HIDROCARBUROS, A NIVEL DE
LABORATORIO, A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO
DE LA PARROQUIA SAN CARLOS, PERTENECIENTE AL
CANTÓN JOYA DE LOS SACHAS, PROVINCIA DE
ORELLANA.

PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO
DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ROSA MARCELA VEGA VILLACÍS

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE DE 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Rosa Marcela Vega Villacís

DIRECTOR DE LA CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Mario Lozada

Lugar y fecha: _____

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ROSA MARCELA VEGA VILLACÍS como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Fecha

Lic. Biol. Alma Koch, M. Sc.
DIRECTORA

Ing. Luis Cumbal, Ph. D.
CODIRECTOR

DEDICATORIA

A la razón primera de mi existencia,
Piedra Angular de mi vida,
Capital de fe y amor en esta empresa,
Partícipe en cada etapa, por siempre y para siempre;
A ti Mamita, que ahora me cuidas desde los cielos,
A ti, que presurosa acudiste al llamado del Eterno,
Y yo, entonces, no pude entregarte este mérito;
Aquí estoy, diciéndote GRACIAS,
Por ayudarme a finalizar esta etapa.

Rosa Marcela Vega Villacís.

AGRADECIMIENTO

A Papá Dios, creador y renovador; a mi Mamita en el cielo, llama y motivo de mis esperanzas; a mi Papá, a Santiago y a Geovanny, esencia y puntales de mi vida, fuentes constantes de fuerza y amor; a mis hermanos y hermanas del alma, a mis queridos tíos y primos cercanos o distantes, por su incondicional apoyo en todo momento y de una u otra manera.

A la Escuela Politécnica del Ejército, al Cuerpo Docente y Administrativo del Departamento de Ingeniería en Biotecnología, a mis distinguidos y queridos tutores: Máster Almita Koch y Doctor Luis Cumbal, por la ayuda brindada. Almita, de todo corazón GRACIAS: por ser incondicional en todo momento, palabra de aliento y corrección en el caminar.

A todo mis compañeros, profesores, colaboradores, en general: AMIGOS, sin distinción, por ser bálsamo en los momentos difíciles, sonrisa franca en las alegrías, ojos transmisores y oídos receptivos de cariño, mente vivaz en la incertidumbre, manos generosas en la necesidad y, sobretodo, corazón dispuesto, cual sable blandido en batalla, para arremeter a los, a veces intrincados y otros tantos sosegados, devenires del camino.

Sencillamente, a todos, desde lo más profundo de mi corazón, GRACIAS.

Rosa Marcela Vega Villacís.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE CUADROS	x
LISTADO DE TABLAS	xi
LISTADO DE FIGURAS	xv
LISTADO DE ANEXOS	xvi
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix
1. CAPÍTULO PRIMERO: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema:.....	1
1.2. Justificación del problema:	3
1.3. Objetivos de la Investigación:.....	6
1.3.1. Objetivo General:.....	6
1.3.2. Objetivos Específicos:.....	7
1.4. Marco Teórico	7
1.4.1. Hidrocarburos de petróleo.....	7
1.4.2. Tecnologías de Tratamiento en Remediación Ambiental.....	8

1.4.3. La biodegradación como posible tecnología de remediación ambiental.....	11
1.4.4. Condiciones que influyen en la biodegradación.....	15
1.4.4.1. Contenido de humedad.....	16
1.4.4.2. Nutrientes.	16
1.4.4.3. Oxígeno	16
1.4.5. Hongos.....	17
1.4.5.1. Citología de la División <i>Deuteromycota</i>	17
1.4.6. Surfactantes y su actividad emulsificante.	18
1.4.7. Ensayos con Microcosmos	19
1.4.8. El suelo como entorno para la degradación de hidrocarburos	19
1.5. Sistema de hipótesis:	20
2. CAPÍTULO SEGUNDO: MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. Participantes.....	21
2.2. Zona de Estudio	21
2.2.1. Campo	21
2.2.2. Laboratorio.....	23
2.2.3. Período de Investigación.....	23
2.3. Diseño Experimental	23
2.4. Procedimientos.....	26
2.4.1. Muestreo de suelo para aislamiento de cepas fúngicas.....	26
2.4.2. Selección de hongos.....	26
2.4.3. Identificación de las colonias fúngicas.	27
2.4.4. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).	27
2.4.5. Evaluación del antagonismo entre colonias fúngicas seleccionadas. .	28
2.4.6. Cultivo para obtención de biomasa.....	29

2.4.7.	Índice de Actividad Emulsificante (E24).....	30
2.4.8.	Muestreo de suelo para el establecimiento de microcosmos en sustrato sólido.....	30
2.4.9.	Muestreo de agua para el establecimiento de microcosmos en sustrato líquido.....	30
2.4.10.	Establecimiento de Microcosmos en Agua.....	31
2.4.11.	Establecimiento de Microcosmos en Suelo.....	31
2.4.12.	Determinación del CO ₂ libre en microcosmos de suelo, por el método de titulación.....	33
2.4.13.	Evaluación de la posible actividad reductora de TPHs de los hongos en microcosmos.....	34
2.4.13.1.	Extracción de TPHs en agua.....	34
2.4.13.2.	Extracción de TPHs en suelo.....	34
2.4.14.	Determinación de la concentración de TPHs por CG-FID.....	34
3.	CAPÍTULO TERCERO: RESULTADOS.....	35
3.1.	Selección e identificación de hongos con posible capacidad hidrocarburoclítica.....	35
3.2.	Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	38
3.3.	Resultados y Análisis Estadístico del Índice de Actividad Emulsificante (E24).....	40
3.4.	Resultados y Análisis Estadísticos de los microcosmos en agua.....	43
3.5.	Evaluación del antagonismo entre colonias fúngicas seleccionadas.....	47
3.6.	Resultados y Análisis Estadístico para microcosmos en suelo.....	49
3.7.	Determinación del CO ₂ libre en microcosmos de suelo, por el método de titulación.....	54
4.	CAPÍTULO CUARTO: DISCUSIÓN.....	59
4.1.	Selección de colonias fúngicas.....	59
4.2.	Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	60

4.3. Índice de Actividad Emulsificante (E24).....	60
4.4. Reducción de TPHs en microcosmos líquidos y de suelos.....	62
5. CAPÍTULO QUINTO: CONCLUSIONES	69
6. CAPÍTULO SEXTO: RECOMENDACIONES.....	70
7. CAPÍTULO SÉPTIMO: BIBLIOGRAFÍA.....	71
8. ANEXOS.....	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.4.2-1. Cuadro sintetizado de tratamientos de recuperación (Riser-Roberts, 1998).	9
Cuadro 1.4.3-1 Procesos metabólicos y reacciones de óxido-reducción de los compuestos de hidrocarburos, por microorganismos (Riser-Roberts, 1998). ..	13

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.4.2-1 Tratamiento de los sustratos contaminados, posterior a la acción de agentes surfactantes PECS, subcontratados por la TEXACO para tratamiento de suelos y aguas afectadas en piscinas de separación, tomado del informe de peritaje de Camino (2004).....	11
Tabla 2.2.1-1 Coordenadas geográficas de los pozos utilizados para las tomas de muestras.	22
Tabla 2.3-1 Descripción de las Unidades Experimentales elaboradas para el recuento de UFC de hongos hidrocarburolíticos y hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales.....	23
Tabla 2.3-2 Descripción de las unidades experimentales ensayadas en la Prueba del Índice de Actividad Emulsificante.....	24
Tabla 2.3-3 Descripción de las unidades experimentales ensayadas en el estudio de los microcosmos en agua.	25
Tabla 2.3-4. Descripción de las unidades experimentales ensayadas en el estudio de los microcosmos en suelo.	25
Tabla 2.4.4-1 Composición del Medio Agar Minerales suplementado con petróleo, modificado de Wunder, Kremer, Sterner, & Anke (1994).	28
Tabla 2.4.5-1 Establecimiento de cultivos para evaluar relaciones de antagonismo.....	28
Tabla 2.4.6-1 Composición de los medios empleados para la obtención de biomasa de las cepas fúngicas (Valenzuela, <i>et al.</i> 2006; Potin, <i>et al.</i> 2004a)..	29
Tabla 2.4.11-1 Cantidades de nutrientes suplementadas en el ensayo de microcosmos en suelo.	32
Tabla 3.1-1 Géneros fúngicos obtenidos.	35
Tabla 3.2-1 ADEVA para las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales, en un gramo de suelo seco.	39

Tabla 3.2-2 Subconjuntos Homogéneos obtenidos con Tukey, para los promedios las UFC de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales.....	39
Tabla 3.2-3. ADEVA para las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos hidrocarburolíticos.....	40
Tabla 3.3-1 Porcentajes de Emulsificación (%), obtenido a las 24h de cultivo, por Cepa y Medio de Cultivo.....	40
Tabla 3.3-2 ADEVA del Índice E ₂₄ producidos por los cultivos fúngico en Medio Glucosa – Sucrosa.....	41
Tabla 3.3-3 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey, con los promedios de los resultados del Índice E ₂₄ producidos por los cultivos fúngico en Medio Glucosa – Sucrosa.....	42
Tabla 3.3-4 ADEVA del Índice E ₂₄ producidos por los cultivos fúngico en Medio Salino.....	42
Tabla 3.3-5 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey, en base a los promedios de los resultados del Índice E ₂₄ obtenidos por los cultivos fúngico, en Medio Glucosa – Sucrosa.....	43
Tabla 3.4-1 ADEVA de las concentraciones de TPHs en microcosmos del agua de San Carlos contaminada, con las cepas fúngicas y el control.....	44
Tabla 3.4-2 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey para los promedios de los resultados de las concentraciones en mg.L ⁻¹ de los tratamientos de los microcosmos en agua de San Carlos contaminada, con cepas fúngicas y control.....	44
Tabla 3.4-3 ADEVA de los tratamientos de medio PDB + 1% de petróleo con inóculos fúngicos y control.....	45
Tabla 3.4-4 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey, de las concentraciones promedio de TPHs (mg.L ⁻¹) de los microcosmos del medio PDB + 1% de petróleo.....	46
Tabla 3.6-1 ADEVA de las concentraciones de TPHs, en mg.kg ⁻¹ , de las unidades experimentales.....	49

Tabla 3.6-2 ADEVA de las concentraciones de TPHs en mg.kg ⁻¹ para los microcosmos del suelo con y sin nutrientes.....	50
Tabla 3.6-3 ADEVA de los resultados de las concentraciones de los microcosmos inoculados con <i>Aspergillus sp.</i> y los microcosmos de suelo solo, con y sin nutrientes.	50
Tabla 3.6-4 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey para los promedios de las concentraciones de los microcosmos inoculados con <i>Aspergillus sp.</i> y de los microcosmos de suelo solo. Las concentraciones de TPHs están expresadas en mg.kg ⁻¹	51
Tabla 3.6-5 ADEVA de los resultados de las concentraciones de los microcosmos inoculados con <i>Geotrichum sp.</i> y de los microcosmos de suelo solo, con y sin nutrientes.....	51
Tabla 3.6-6 ADEVA de los resultados de las concentraciones en mg.kg ⁻¹ de los microcosmos inoculados con <i>Penicillium sp.</i> y de de los microcosmos de suelo solo, con y sin nutrientes para ambos casos.....	52
Tabla 3.6-7 ADEVA de los resultados de las concentraciones en mg.kg ⁻¹ de los microcosmos inoculados con <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> y <i>Geotrichum sp.</i> en suelo, con y sin nutrientes.....	52
Tabla 3.6-8 Subconjuntos Homogéneos obtenidos por la Prueba de Tukey para los promedios de las concentraciones en mg.kg ⁻¹ de los microcosmos inoculados con <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> y <i>Geotrichum sp.</i> , en suelo, con y sin nutrientes.....	53
Tabla 3.7-1 ADEVA de los resultados de los valores de CO ₂ , en mg, emitidos por los microcosmos inoculados con <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Geotrichum sp.</i> y suelo solo, con y sin nutrientes.....	54
Tabla 3.7-2 Subconjuntos homogéneos obtenidos con la Prueba de Tukey para el factor <i>Días</i> , en base a los promedios de los valores de CO ₂ emitidos por los tratamientos, durante los 13 días de evaluación.....	55
Tabla 3.7-3. Secuencia cronológica y promedios de concentración de CO ₂ libre en los microcosmos en suelo, a partir de la prueba de Tukey.	56

Tabla 3.7-4 Subconjuntos homogéneos obtenidos con la Prueba de Tukey para el factor *Inóculo*, en base a los promedios de los valores de CO₂ emitidos por los tratamientos, durante los 13 días de evaluación del ensayo. 57

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.4.4-1 Vista de la composición de las zonas de agregados de suelo (Eweis <i>et al.</i> , 1999).	15
Figura 2.2.1-1 Mapa de la Parroquia Rural San Carlos. Los puntos negros representan los pozos de muestreo. La escala de la imagen es 1:100 000 en Km (Soria. 2010).	22
Figura 2.4.5-1 Esquema gráfico para representar el ensayo de evaluación del antagonismo de las cepas fúngicas, según Güédeza <i>et al.</i> (2009).	29
Figura 2.4.11-1 Esquema gráfico de las unidades experimentales que conformaron los microcosmos en suelo. Las flechas indican el flujo de aire. ..	31
Figura 3.1-1. Evaluación visual del crecimiento fúngico en medio sólido, hacia los 11 días de incubación.....	35
Figura 3.1-2 Fotografías Macro y Microscópicas de las colonias de <i>Geotrichum sp.</i>	37
Figura 3.1-3 Fotografías de colonias aisladas de <i>Penicillium sp.</i>	37
Figura 3.1-4. Imágenes Macro y Microscópicas de <i>Aspergillus sp.</i>	38
Figura 3.3-1. Emulsión formada y mantenida a las 24 h. por el cultivo de <i>Penicillium sp.</i> en fase contacto con el keroseno, en un tubo de ensayo de 20 cm de longitud.....	41
Figura 3.4-1. Unidades experimentales de los microcosmos líquidos.....	43
Figura 3.4-2 Promedios de las concentraciones en los microcosmos en agua de San Carlos con contaminación de TPHs.....	45
Figura 3.4-3 Promedios de las concentraciones en los microcosmos en agua de San Carlos con contaminación de TPHs.....	47
Figura 3.5-1. Cultivos masivos inoculados con porciones de las cepas a ser probadas.	48
Figura 3.6-1. Promedio de las concentraciones de TPHs, en mg.Kg ⁻¹ , en microcosmos de suelo para las cepas fúngicas seleccionadas, con y sin aporte de nutrientes, para los días de evaluación.....	53

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1: Informe de Laboratorio GRÜNTEC.... ¡Error! Marcador no definido.

ANEXO 2: Tablas con valores reglamentarios, procedentes del TULAS y RAOHE ¡Error! Marcador no definido.

ANEXO 3: Informe de Laboratorio CESAQ – PUCE¡Error! Marcador no definido.

ANEXO 4: Informe de Laboratorio GRÜNTEC.... ¡Error! Marcador no definido.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADEVA: Análisis de Varianza.

Adsorción: Adhesión de moléculas, iones o átomos de un líquido, gas o sólido disuelto a una superficie interfacial, dando origen a una película del adsorbato (moléculas, iones o átomos acumulados) en la superficie del adsorbente.

Aguas de formación: se refiere a las aguas que, al inicio de la extracción de crudo, concomitantemente afloran a la superficie con el primer crudo de petróleo y gas.

BETX: Benceno, etilbenceno, tolueno y xileno.

Cancerígeno: Que puede provocar cánceres.

CG-FID: Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama.

COT: Carbono Orgánico Total.

HAPs: Aromatics Polycyclics Hydrocarbons – Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Hidrocarbonoclástica o Hidrocarburoclítica: organismo con capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo.

Licuar: Hacer líquida una cosa sólida o gaseosa.

Mutagénico: Puede originar mutaciones en el código genético del individuo.

PDA: medio de cultivo de agar de papa-dextrosa.

PDB: medio de cultivo en caldo de papa-dextrosa.

Surfactantes (Biosurfactantes): Agentes químicos que reducen la tensión superficial de compuestos hidrófobos, facilitando su movilidad en matriz líquida. Los biosurfactantes son aquellos de origen natural, es decir los que han sido producidos por microorganismos. Actúan como agentes emulsificantes, ya que permiten que las fases no miscibles formen una emulsión estable.

Teratógeno: Que es capaz de causar malformaciones a nivel del embrión o feto.

TPHs: Total Petroleum Hydrocarbons – Hidrocarburos Totales de Petróleo.

UFCs: Unidades Formadoras de Colonias.

Unidades experimentales: cada unidad perteneciente a un ensayo, dentro de un Diseño Experimental. Son objetos del análisis estadístico.

RESUMEN

Este estudio forma parte del proyecto desarrollado en conjunto por la Escuela Politécnica del Ejército y el Programa de Reparación Ambiental y Social del Ministerio del Ambiente, denominado “Caracterización y Establecimiento del programa de remediación del agua subterránea en la Parroquia San Carlos Cantón la Joya de los Sachas, Provincia de Orellana”. Tres géneros de hongos filamentosos: *Aspergillus*, *Geotrichum* y *Penicillium*, aislados de muestras de suelo de San Carlos, se evaluaron su capacidad reductora de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs), a nivel de laboratorio, en microcosmos. En microcosmos líquidos se emplearon los géneros fúngicos *Geotrichum* y *Penicillium*, que mostraron ser reductores de TPHs tanto en microcosmos con agua del pozo de muestreo 23, del sector de San Carlos, (*Geotrichum sp.*= 66,14%, *Penicillium sp.*= 28,04%) y en microcosmos líquidos con medio PDB + 1% de petróleo (*Geotrichum sp.*= 67,58%, *Penicillium sp.*= 82,72%). La capacidad productora de biosurfactantes de las tres cepas fúngicas aisladas se evaluó con la prueba Índice de Emulsión (E_{24}), demostrando ser productoras de surfactantes: con carbono biodisponible en el medio (*Penicillium sp.*=33.3%) y con crudo de petróleo como fuente de carbono (*Aspergillus sp.*=12.33%). En microcosmos sólidos, con suelo de la parroquia San Carlos, cercana a la estación de bombeo “Sacha Sur”, se inocularon con las tres cepas aisladas (*Aspergillus*, *Geotrichum* y *Penicillium*), por separado. Se adicionaron los nutrientes Nitrógeno (N) y Fósforo (P), en proporciones 100C:10N:1P, respecto al COT. Se evaluó la concentración de TPHs de los microcosmos sólidos a los días 9, 15 y 25 de incubación. Como indicador de actividad biológica se midieron los niveles de emisión de CO_2 libre, durante los 13 primeros días de incubación, empleando el método volumétrico con NaOH y HCl. Se comprobó incrementos en la concentración de CO_2 al transcurso de los días de evaluación, siendo los microcosmos con *Penicillium sp.*, adicionado con nutrientes, los que presentaron la mayor producción de CO_2 (9,55 mg CO_2 por cada mg de suelo seco). Los porcentajes de reducción alcanzados a los 25 días de incubación fueron: *Aspergillus sp.* con nutrientes: 45,78%, *Geotrichum sp.* con nutrientes: 28,55%, *Penicillium sp.* con nutrientes: 27,46%, Suelo solo con nutrientes: 39,58%, *Aspergillus sp.* sin nutrientes: 13,69%, *Geotrichum sp.* sin nutrientes; 11,22%, *Penicillium sp.* sin nutrientes:11,83%, y Suelo solo sin nutrientes: 7,68%. Los resultados obtenidos indican que las cepas fúngicas aisladas son reductoras de TPHs, a nivel de laboratorio, con el aporte de nutrientes, que a su vez incrementaron la actividad biológica de las cepas y favoreció su producción de biosurfactantes.

ABSTRACT

This study is part of the project carried out jointly by Army Politechnic School and the Program of Environmental and Social Remediation of the Environmental Ministry, named "Characterization and determination of the Remediation Program of ground waters from San Carlos, Joya de los Sachas county, Orellana province". Three genera of filamentous fungus: *Aspergillus*, *Geotrichum* and *Penicillium*, from soil samples, from San Carlos, were proved their reductive capacity of TPHs (Total Petroleum Hydrocarbons) in laboratory microcosms. Liquid microcosms were inoculated with *Geotrichum* and *Penicillium* fungus genera, which showed to be TPHs reducers either in water from well 23, from San Carlos, (*Geotrichum sp.*= 28,04%, *Penicillium sp.*= 66,14%) and in PDB liquid culture media + 1% petroleum (*Geotrichum sp.*=82,72%, *Penicillium sp.*= 67,58%). The emulsifier capacity of the three fungal strains isolated was assayed with the test of Emulsion Index (E24). This isolated strains proved to be surfactants producers under bioavailable carbon source in culture media (*Penicillium sp.*=33.3%) and with petroleum as sole carbon source (*Aspergillus sp.*=12.33%). Solid microcosms, with soil from "Sacha Sur" pumping station, were inoculated with isolated fungal strains (*Aspergillus*, *Geotrichum* and *Penicillium*), separately. Soil microcosms were amended with Nitrogen (N) & Phosphorous (P), in rates of 100C:10N:1P, respect to TOC (Total organic carbon). TPHs amounts were measured at days 9, 15 and 25 in microcosms. Like a biological activity index were evaluated the CO₂ free production, during 13 first days, by titrimetric method with NaOH and HCl. It revealed an increase of CO₂ free level in each day of evaluation. Microcosms inoculated with *Penicillium sp.*, amended with nutrients, showed the major CO₂ production (9,55 mg CO₂ for each mg of dry soil). Reduction percentages of TPHs, at day 25 of incubation, were: *Aspergillus sp.* with nutrients: 45,78%, *Geotrichum sp.* with nutrients: 28,55%, *Penicillium sp.* with nutrients: 27,46%, Sole soil with nutrients: 39,58%, *Aspergillus sp.* without nutrients: 13,69%, *Geotrichum sp.* without nutrients; 11,22%, *Penicillium sp.* without nutrients:11,83%, and sole soil without nutrients: 7,68%. Results

suggest the three fungal isolated strains are TPHs reducers at laboratory scale, in soil microcosms amended with nutrients, as well as biosurfactant producers.

1. CAPÍTULO PRIMERO: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema:

En la actualidad son muchos los productos derivados de hidrocarburos de petróleo que se emplean en la cotidianidad, así lo es la energía de la que nos beneficiamos, que mueve a las máquinas y al mundo actual, de ahí su importancia, su necesidad y su valor (Eweis *et al.*, 1999). Se estima que se producen anualmente dos mil millones de toneladas métricas de petróleo en el mundo, lo cual tiene una amplia representación a nivel económico para territorios en los que subyace el crudo de petróleo, como lo es el nuestro (Fontaine, 2005; Eweis *et al.*, 1999). Inevitablemente, a consecuencia de los distintos procesos de explotación, producción, transporte y almacenamiento de petróleo, sobrevienen derrames accidentales que pueden ser minimizados pero no erradicados por completo, por lo que afecta al medio sobre el que se vierte (Atlas, 1984; Eweis *et al.*, 1999).

La importancia de atender a problemas ambientales causados por los derrames de hidrocarburos de petróleo en zonas ecológicamente sensibles, como ocurre en nuestra Amazonía ecuatoriana, se debe a su particular característica llamada “recalcitrancia molecular” que es un conjunto de factores por los cuales no alcanza su completa degradación. Su estructura química no los hace objetos de acciones enzimáticas, no son viables para la degradación metabólica y son tóxicos en el ambiente (Rittman & McCarty, 2001). Este tipo de compuestos, que persisten en ecosistemas acuáticos y terrestres, representan un peligro para la salud porque se ha demostrado que varios de los componentes del crudo de petróleo son agentes mutágenos, carcinogénicos e inclusive teratógenos (Cerniglia *et al.*, 1985).

Para entender la problemática es necesario establecer la situación actual de la explotación petrolera en el Ecuador: se conoce que el 60% del área de la Amazonía ecuatoriana está ocupada por empresas petroleras y sus

establecimientos (Seitz, 2008). El 80% de los pozos petroleros amazónicos están ubicados en cuatro cantones: Lago Agrio, Shushufindi, Orellana y La Joya de los Sachas (Bustamante & Jarrín, 2004); es en este último en el que se desarrolla este estudio.

En el cantón Joya de los Sachas se asientan 191 pozos y cuatro estaciones: Sacha Norte 1 y 2, Sacha Central y Sacha Sur. La parroquia de San Carlos, cercana a la estación Sacha Sur, presenta una densidad de 20-50 pozos por kilómetro cuadrado, concentrándose el 25% del total de pozos petroleros de la Amazonía en Orellana (Fontaine, 2004).

Uno de los mayores problemas ambientales que quedan tras las operaciones petroleras son las piscinas de separación de crudo; de un total de 320 piscinas abiertas, sólo 96 están bien remediadas, 45 se encuentran en San Carlos, lo que representa un porcentaje del 14.7%, y son piscinas no remediadas o mal remediadas (Varea, *et al.*, 1995; Fontaine, 2004).

Por medio del proyecto realizado por la ESPE en convenio con el Ministerio del Ambiente y, su dependencia, Plan de Reparación Ambiental y Social (PRAS), denominado “Caracterización y Establecimiento del programa de remediación del agua subterránea en la Parroquia San Carlos Cantón la Joya de los Sachas, Provincia de Orellana”, se encontró contaminación en la cuenca del estero denominado “sapito”, en su porción más cercana a la Estación de Bombeo Sacha Sur. Aquí se ubica el pozo de muestreo No. 23, que registra una concentración de 26 039 mg.kg⁻¹ de suelo seco, hacia los 0.50 m de profundidad, correspondiente a la más alta concentración de hidrocarburos en el área, de acuerdo al informe presentado por la empresa Grüntec (Anexo 1), realizado en Agosto de 2010.

La Estación de Bombeo Sacha Sur constituye una fuente de contaminación a este estero y del río Huamayacu, el mismo que atraviesa la parroquia. Se tiene referencia de que en épocas pasadas se vertía sobre éstos las aguas de formación, resultantes de las operaciones de extracción de crudo; a su vez los mecheros de la estación dejan cenizas en el ambiente que afectan a los cultivos e impregnan el aire con olor a gas. Adicionalmente en el sector se identificaron 39 pozos que se ubican en aproximadamente 25 fincas; cabe indicar que anteriormente al año 2009, las vías construidas en el centro urbano-rural eran lastradas y cubiertas superficialmente con desecho de crudo de petróleo, lo que originaba la emanación de vapores tóxicos provenientes de los compuestos orgánicos volátiles del petróleo, y en los días más cálidos resultaban intransitables para personas y animales del sector (Varea *et al.*, 1995).

De las especies de hongos reportadas en procesos de biorremediación, están los hongos llamados “de pudrición blanca”, pertenecientes a la División *Basidiomycota*. Son de los hongos más evolucionado del Reino *Fungi*; denominados así ya que la descomposición generada en la materia orgánica, especialmente de tipo ligninolíticos, produce masas en general blancas o amarillas (Cerniglia, 1997). También están reportados, en forma no tan extensa, los hongos filamentosos del suelo, de la División *Deuteromycota*, cuyas estructuras internas son distinguibles microscópicamente. Son denominados “hongos imperfectos”, pues su reproducción es vegetativa y salen de la clasificación convencional (Rittmann & McCarty, 2001; Carrillo, 2003).

1.2. Justificación del problema:

Los inicios de las operaciones petroleras en el país datan desde la década de los veinte, cuando las empresas petroleras transnacionales extranjeras se asentaron inicialmente en la península de Santa Elena, a las cuales se concesionaron millones de hectáreas, de lo que no se tienen reportados daños de la explotación. A partir de la década de los setenta,

Ecuador se constituyó en uno de los mayores exportadores de hidrocarburos de petróleo, tercero a nivel latinoamericano, debido a la explotación del pozo Lago Agrio No. 1. Esta era abrió un sitial en mercados internacionales al crudo nacional extraído, lo que permitió generar divisas que han representado ingresos de entre el 47% y 53% del Presupuesto General del Estado (Varea *et al.*, 1995).

Durante el tiempo de funcionamiento de las compañías petroleras, dentro del Territorio Nacional, se han producido innumerables accidentes ambientales, alterando el equilibrio natural de los ecosistemas (Moniño & Galdos, 2008). Las consecuencias de los trabajos realizados por Chevron- Texaco en 1972, fueron derrames de 16,8 millones de galones de petróleo, desastre ecológico que frente a los 10,8 millones de galones derramados por Exxon Valdez en Alaska es superado en 6 millones de galones, aquella que hasta entonces fue una de los mayores catástrofes ambientales de la historia (Varea *et al.*, 1995).

La afección que recibe el sector se debe en principio a la contaminación por el petróleo crudo, a los gases, las aguas y lodos de formación, el ruido, los desechos sólidos, los químicos, los polvos de carretera, las aguas grises, la chatarra, las vibraciones, las descargas de carros, derrames y goteos del SOTE, además de los daños a la fauna y flora del sector, ya que para la instalación de las estaciones petroleras son taladas extensas áreas de bosque que atenta a la biodiversidad (Maldonado & Narváez, 2003; Seitz, 2008).

Los pozos construidos por la empresa Texaco, hacia la década de los 70, establecidos en la parroquia de San Carlos, provincia de Orellana, y que aún son productivas, son administradas por la estatal PETROECUADOR. Es el caso de la Estación de Bombeo Sacha Sur, que se encuentra en la cabecera de la parroquia, de la cual se tienen reportes anteriores de afecciones sobre la

salud de la población del sector. La mayoría de la gente migró al lugar por la bonanza que económicamente representaba el auge petrolero, pero su salud se deterioró por los efectos tóxicos del petróleo y sus componentes por exposición directa o indirecta (Hurting & San Sebastián, 2002).

En el transcurso del tiempo en el que han surgido estos problemas ambientales, se han implementado varios métodos estandarizados para la descontaminación de suelo y aguas subterráneas. Algunos de ellos fueron descartados debido a su escasa efectividad o a los elevados costos que representaban *versus* los beneficios obtenidos, e inclusive por los problemas asociados con los procesos de descontaminación (Riser-Roberts, 1998).

La degradación biológica o biodegradación es en la actualidad una de las técnicas más utilizadas a las que se ha recurrido para la remoción de hidrocarburos; este método emplea microorganismos con amplia capacidad enzimática para efectuar el metabolismo de los contaminantes de petróleo (Eweis *et al.*, 1999).

En los ambientes contaminados con hidrocarburos, se ha demostrado que las poblaciones de microorganismos tienden a modificarse. Disminuye la diversidad ya que sobreviven aquellas que presentan capacidad de adaptación a las nuevas condiciones nutricionales. La contaminación en sí funciona como un factor de selección de las cepas que han desarrollado mecanismos de adaptación enzimáticos y fisiológicos especializados que les permite sobrevivir a partir del contaminante (Rivera *et al.*, 2002).

Una tecnología de mayor auge en la actualidad, en el campo de la biotecnología ambiental, es la *biorremediación*, que consiste en la detoxificación de residuos de petróleo y en la descontaminación de sitios afectados por medio del empleo de comunidades de microorganismos aisladas

del sector, adaptadas al estrés metabólico y capaces de degradar tales compuestos, sin efectos adversos al sitio de exposición y a bajos costos (Rittmann & McCarty, 2001; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

La estimulación del crecimiento de las comunidades microbianas autóctonas del sector, o la introducción de microorganismos inocuos, con el fin de promover la degradación del contaminante, ha demostrado ser más eficiente y menos costosa (Weische *et al.*, 2003).

Se han encontrado algunas especies de bacterias, hongos, levaduras, cianobacterias, diatomeas y otras algas eucarióticas, que tienen la capacidad enzimática de oxidar compuestos de hidrocarburos de petróleo (TPHs), tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), de mayor interés por su alta toxicidad, son susceptibles a la degradación microbiana (Cerniglia *et al.*, 1985).

El presente trabajo consiste en el aislamiento y selección de cepas fúngicas filamentosas, con posible capacidad de reducir concentraciones de petróleo, obtenidas a partir de muestras de suelo, pertenecientes a la parroquia San Carlos, del cantón Joya de los Sachas, provincia de Orellana, a fin de que puedan ser empleadas en programas de remediación de las áreas impactadas.

1.3. Objetivos de la Investigación:

1.3.1. Objetivo General:

Seleccionar, caracterizar y evaluar hongos que potencialmente serían utilizados en biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos en la parroquia San Carlos, Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Aislar cepas fúngicas en el laboratorio a partir de muestras de suelo provenientes de la parroquia San Carlos, cantón Joya de los Sachas, provincia de Orellana, empleando medios de crecimiento selectivos para hongos tolerantes a concentraciones de petróleo.
- Seleccionar hongos, con posible capacidad hidrocarburofítica, e identificarlos de acuerdo a claves taxonómicas.
- Determinar la capacidad emulsificante de las cepas de hongos seleccionadas en el laboratorio, a través de la prueba del Índice de Emulsificación (E24).
- Determinar la posible capacidad reductiva de hidrocarburos de los hongos seleccionados en microcosmos establecido a nivel de laboratorio.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Hidrocarburos de petróleo

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos constituidos en su forma más básica por carbono e hidrógeno, en los que puede sustituirse algunos de sus átomos de hidrógeno por iones u otras estructuras químicas, dando origen a moléculas más complejas (Rittman & McCarty, 2001). Mezclas que contienen varios de este tipo de compuestos, conforman el crudo de petróleo. Se las clasifica en las siguientes clases, de acuerdo a su solubilidad en solventes orgánicos: hidrocarburos saturados, hidrocarburos saturados no aromáticos, hidrocarburos aromáticos, asfaltos y resinas (Riser-Roberts, 1998; Eweis *et al.*, 1999). Dentro de los hidrocarburos saturados constan los alcanos alifáticos, no

alifáticos, ramificados y los cicloalcanos; los hidrocarburos aromáticos se clasifican de acuerdo al tipo y cantidad de estructuras cíclicas del que se componen, partiendo de las más básica como benceno a las más poliaromáticas como el pireno; en cambio, los asfaltos y resinas son compuestos de alto peso molecular, con heteroátomos polares como nitrógeno, sulfuro y oxígeno (Riser-Roberts, 1998; Eweis *et al.*, 1999).

Debido a las características físico – químicas de cada una de las fracciones del petróleo crudo, pueden esparcirse en la superficie de suelos o de aguas, ya sean de ríos en estado natural o de desecho, formando una capa superficial; otras fracciones se depositan en el fondo de los cuerpos de agua, como sedimentos; algunas fracciones de composición más simple son degradadas por los microorganismos del sector o por la radiación solar natural; otras permanecen adheridas a sustratos de la biosfera de la que hayan sido extraídos. El problema de la permanencia de estos compuestos es su toxicidad para los ecosistemas y a la salud, propiamente, ya que se han reportado varios efectos que pueden ser leves como dolores de cabeza, mareos, hasta la inducción a cánceres o teratogénesis, como lo reporta el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) entre los que constan bencenos, benzopirenos, e inclusive la gasolina de uso automovilístico (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ATSDR, 1999).

1.4.2. Tecnologías de Tratamiento en Remediación Ambiental.

Las tecnologías empleadas en el tratamiento de los residuos de hidrocarburos de petróleo están enfocadas a su reducción a concentraciones por debajo de 1000 mg.Kg^{-1} , e inclusive hasta 100 mg.Kg^{-1} (Riser-Roberts, 1998).

Los criterios usados para determinar la calidad de un suelo y agua están basados en la normativa publicada en los Textos Unificados de Legislación Ambiental Secundaria (TULAS, 2002) y la RAOHE 1215 (2001), los mismos que se observan en el Anexo 2, en el que constan los valores máximos permisibles para parámetros orgánicos en aguas y suelo en recuperación.

Existen diferentes tecnologías para la remediación de suelos, lodos y aguas contaminados; sin embargo, el éxito del empleo de una u otra radica en una eficaz recuperación de los ambientes, y esto a su vez depende del diseño y ajuste de los sistemas de operación basados en las propiedades del contaminante. Por eso que la integración de tecnologías químicas y físicas, en simultáneo han brindado grandes resultados, para una idea general se describen algunas técnicas en el Cuadro 1.4.2-1 (Riser-Roberts, 1998).

Cuadro 1.4.2-1. Cuadro sintetizado de tratamientos de recuperación (Riser-Roberts, 1998).

Tecnología	Aplicabilidad	Características del área a tratar	Variaciones
SUELO			
Recuperación Hidrocarburos en fase líquida.	Petroquímicos más ligeros que el agua, excepto viscosos y lubricantes oleosos.	Suelos permeables.	Posible uso de equipos para obtener muestras de agua.
Extracción de vapores de suelo.	En la zona vadosa. Hidrocarburos en fase líquida en profundidades menores a 20 cm, petroquímicos ligeros.	Suelos permeables.	Ventilación termo asistida, ventilación horizontal, bombeo de aguas subterráneas para bordear carbonos orgánicos volátiles en capilares.
Percolación <i>in situ</i> (Biorremediación)	Cualquier químico aeróbicamente biodegradable, en la zona vadosa	Suelos permeables, con profundidad mayor al un m de profundidad al agua.	Administración de oxígeno y nutrientes requerida.
Excavación	Toda clase de contaminante.	Todo tipo de suelo.	Se puede emplear deshidratación para exponer el suelo en franja capilar.

BTEX: Benceno, Tolueno, Etano, Xileno.; PCE: percloroetilenos. TCE: Tricloroetanos.; TCA: Tricloro anisoles. Continúa...

... Viene

Tecnología	Aplicabilidad	Características del área a tratar	Variaciones
Burbujeo	En la zona saturada. Para contaminantes como: BTEX, gasolinas, PCE, TCE, TCA.	Suelos con conductividad hidráulica mayor a 10^{-5} cm.s ⁻¹ o de al menos 1.5 m de espesor de saturación.	Aire caliente, vapor, burbujeo cíclico, bombeo de aguas subterráneas concurrentes.
Biorremediación <i>in situ</i> .	Cualquier químico biodegradable, localizado en la zona saturada; inhibido de pH extremos, químicos pesados y químicos tóxicos.	Los nutrientes son mejor transportados en suelos permeables.	Suministro de oxígeno por burbujeo o en adición de peróxido; adición de nutrientes con reinyección de aguas subterráneas
AGUA			
Tratamiento de recuperación de aguas subterráneas.	Para recuperación Hidrocarburos en fase líquida, para controlar la pluma contaminante, bombeo y tecnologías de tratamiento.	La transmisividad, profundidad hacia el espejo de agua y hacia la zona saturada determina la estrategia óptima.	Pozos de muestreo o trincheras de intercepción.
Recuperación de aguas subterráneas en fase líquida de carbono.	Remoción de compuestos con baja solubilidad y alta absorción.	La transmisividad, profundidad hacia el espejo de agua y hacia la zona saturada determina la estrategia óptima.	Alta presión (75 a 150 psi) y baja presión (12 a 15 psi).
Oxidación Catalítica	Unidades convencionales pueden tratar todo compuesto que contenga carbono, hidrógeno y oxígeno.	No aplica	Algunas unidades pueden tratar compuestos clorinados, depuración de gases de escape pueden ser requeridos.
Oxidación termal	Compuesto que contenga carbono, hidrógeno y oxígeno.	No aplica	Depuración de gases de escape pueden ser requeridos.

BTEX: Benceno, Tolueno, Etano, Xileno.; PCE: percloroetilenos. TCE: Tricloroetanos.; K_H : constante de conductividad hidráulica; PCBs: policlorobifenilos.

Los trabajos realizados en nuestro territorio por parte de las empresas operadoras, como en el caso de la TEXACO, para la remediación de suelos y aguas afectados por derrames de hidrocarburos de petróleo crudo, como lo reporta el informe de peritaje realizado por Camino (2004), consistían en esparcir un químico llamado "PECS" sobre las piscinas de separación, dos semanas previo al trabajo de tratamiento de los desechos; este compuesto de

acción surfactante era empleado para el máximo desprendimiento posible de los contaminantes y para posteriormente ser licuados. En el Tabla 1.4.2-1 se indican los tratamientos posteriores conducidos en cada uno de los sustratos contaminados.

Tabla 1.4.2-1 Tratamiento de los sustratos contaminados, posterior a la acción de agentes surfactantes PECS, subcontratados por la TEXACO para tratamiento de suelos y aguas afectadas en piscinas de separación, tomado del informe de peritaje de Camino (2004).

Fracciones Tratadas	Tratamiento
Suelo, lodos	Mezcla con PECS en agua, en agitación con aire a presión, hasta obtener el suelo libre y los hidrocarburos libres en la superficie del agua. Algunos lodos fueron tratados con ECOSOIL o encapsulados en cemento.
Agua	Coagulación / floculación y sedimentación con sulfato de aluminio como floculante.
Residuos	Incineración
Hidrocarburos Degradados	Disolución y trasvase a tanques cisternas para ser trasladados a celdas de depósito.

Estos trabajos de remediación ambiental fueron realizados en 1996 y para los reportes de laboratorio con muestras de los sectores en discusión (Piscinas 1 y 2 del Pozo Sacha-53), se demostró contaminación persistente a la fecha del informe de peritaje (2004), superior a lo que indica la norma ambiental (TULAS y RAHOE), tanto de compuestos perjudiciales como fenoles, cuanto de metales pesados entre los que se indican tóxicos como Cadmio, Níquel y Plomo.

1.4.3. La biodegradación como posible tecnología de remediación ambiental.

Debido a la variabilidad de composición del petróleo crudo, son las características físico – químicas las que determinan su degradación, persistencia y toxicidad. Estos compuestos presentan una degradación natural muy lenta, por lo cual se han estudiado tecnologías que permitan su remoción en menor tiempo y con menor impacto al ambiente (Alonso – Martínez & Gaju, 2005).

La biodegradación aerobia permite transformar compuestos en sus formas más simples, es decir que su último producto sea CO₂ y agua, con el consecutivo incremento de biomasa; en su defecto, la biodegradación parcial de hidrocarburos da como resultado productos correspondientes a ácidos grasos y sustancias fenólicas apuntando a eliminar la toxicidad de los compuestos químicos (Atlas, 1984; Rittman & McCarty, 2001).

Dentro de la remediación ambiental se han empleado cierto tipo de microorganismos, tales como bacterias entre las que destacan las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhodococcus sp.*, y otras más; así también se ha reportado el uso de hongos superiores ligninolíticos del tipo llamado “podredumbre blanca”, como el caso de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, entre otros (Pointing, 2001; Husain, 2008; Byss, Elhottová, Tríska, & Baldrian, 2008).

En lo referente al empleo de hongos filamentosos es escasa la información, sin embargo algunos estudios reconocen ventajas en el uso de este tipo de microorganismos, tales como una pronta adaptación a ambientes contaminados, metabolismo de metales pesados e hidrocarburos que otras especies no lo consiguen, lo que garantiza la sobrevivencia del inóculo y efectiviza su acción descontaminante (Cerniglia *et al.*, 1985).

Asimismo, la facilidad de extensión de sus hifas fúngicas, favorece su acceso a los xenobióticos y cuentan con una batería enzimática mejor provista que bacterias que, inclusive, favorece el ambiente de crecimiento de otros microorganismos (Potin, Rafin, & Veignie, 2004; Valenzuela *et al.*, 2006).

El petróleo ejerce dos acciones sobre las poblaciones microbianas endémicas de los ecosistemas: actúa como factor de selección de los microorganismos más tolerantes al contaminante que lo toman como fuente de carbono y es un agente tóxico para las comunidades enzimáticamente no adaptadas (Atlas, 1984).

La acción metabólica de los microorganismos sobre el petróleo está mediada por diferentes enzimas, que dan lugar a reacciones bioquímicas tales como: acilaciones, alquilaciones, dealquilaciones, dehalogenaciones, hidrólisis de amidas o ésteres, oxidación, reducción, hidroxilación de anillo aromáticos, clivaje de anillo y formación de conjugados o condensados. En la Cuadro 1.4.3-1 se enlistan las diferentes reacciones efectuadas por los microorganismos en el metabolismo de los contaminantes (Riser-Roberts, 1998).

Cuadro 1.4.3-1 Procesos metabólicos y reacciones de óxido-reducción de los compuestos de hidrocarburos, por microorganismos (Riser-Roberts, 1998).

Proceso	Reacción química	Tipo	Potencial Redox (mV)
Respiración	$C_nH_aO_bN_c^{(1)} + O_2 \rightarrow CO_2$	Aerobia	700 – 500
Desnitrificación	$C_nH_aO_bN_c^{(1)} + NO_3^- \rightarrow N_2 + CO_2$	Facultativa Anaerobia	300
Fermentación	$C_nH_aO_bN_c^{(1)} \rightarrow \text{ácido orgánico}$	Facultativos o anaerobios estrictos	
Desasimilación por reducción de sulfatos	$C_nH_aO_bN_c^{(1)} \text{ (o } H_2) + SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + CO_2$	Anaerobios estrictos	-200
Metanogénesis	$CO_2 + H_2 \rightarrow CH_4$	Anaerobios	<-200
	Acetato $\rightarrow CO_2 + CH_4$	estrictos	<-200

(1) Fórmula química genérica para representar a la biomasa.

Para los hidrocarburos cuya biodegradación se realiza en presencia de oxígeno (aeróbica), la eficiencia de su consumo depende de la complejidad molecular. Por ejemplo, aquellos que contienen anillos aromáticos son más recalcitrantes, esto se debe a su escasa solubilidad y la inaccesibilidad estructural para la acción de enzimas (Rittman & McCarty, 2001).

La degradación aeróbica de hidrocarburos requiere de la acción de la enzima oxigenasa, así como energía en forma de la molécula NADPH. Ocurre que mediante la adición de dos grupos –OH, se proporciona los dos electrones para la oxidación de las moléculas de hidrocarburos (Eweis *et al.*, 1999; Rittman & McCarty, 2001).

En los últimos tiempos se ha estudiado que algunos hidrocarburos son degradados en condiciones anaeróbicas, en los que se han identificado algunos géneros microorganismos heterótrofos aeróbicos, así como las rutas bioquímicas que son llevadas a cabo; sin embargo, este tipo de reacciones son más lentas en comparación a las de tipo aerobias (Rittman & McCarty, 2001).

Para algunos hidrocarburos de petróleo se conocen sus respectivas rutas metabólicas. Para los alcanos, la degradación está mediada por la enzima monooxigenasa que ataca grupos metílicos, obteniéndose alcoholes que posteriormente se oxidarán hasta transformarse en aldehídos, cetonas y sus respectivos ácidos grasos que terminará por degradarse de la cadena alifática por β -oxidación. Estos productos son menos volátiles que sus respectivos compuestos iniciales (Eweis *et al.*, 1999)

Los alcanos son los hidrocarburos más biodegradables por su disposición molecular, sin embargo a medida que incrementan su complejidad son más recalcitrantes o menos degradables, como el caso de alcanos con carbonos de C₅ a C₁₀, a altas concentraciones, son solventes y rompen las membranas lipídicas; por otro lado, alcanos con carbonos entre C₂₀ – C₄₀ son sólidos e hidrófobos (Eweis *et al.*, 1999).

1.4.4. Condiciones que influyen en la biodegradación

El suelo es la porción más compleja de la biósfera, caracterizado por la íntima relación de las fases sólida, líquida y gaseosa, como se observa en la Figura 1.4.4-1; presenta un variado rango de tamaño de partícula y de complejidad en la composición química, determinado por la diferencia en el tipo de suelo (Atlas, 1984); a su vez esta variabilidad afecta en la composición de la población microbológica tanto cuantitativamente como cualitativamente (Riser-Roberts, 1998).

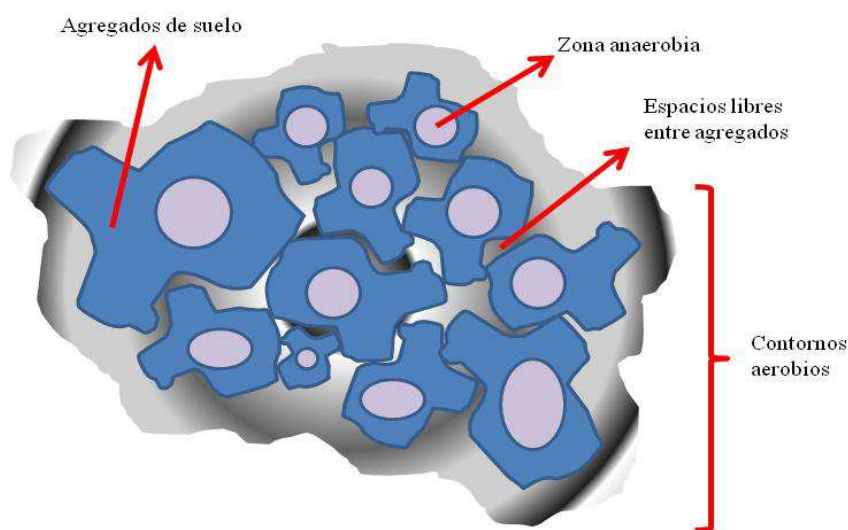


Figura 1.4.4-1 Vista de la composición de las zonas de agregados de suelo (Eweis *et al.*, 1999).

La capacidad del suelo de absorber nutrientes y mantener humedad depende de las propiedades físicas y químicas de la textura, la infiltración y la permeabilidad, la densidad de masa, el contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio iónico, el contenido de macronutrientes, la salinidad y el contenido de micronutrientes (Riser-Roberts, 1998).

La biodegradación exige condiciones esenciales para su adecuado desempeño; parámetros como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno son determinantes y están estrechamente relacionados con el ambiente en el que se desarrolla este proceso (Atlas, 1984).

1.4.4.1. Contenido de humedad.

El contenido de humedad es fundamental para la biodegradación de los contaminantes, ya que influye en el crecimiento microbiano y en la difusión de nutrientes durante su proceso de consumo, por tal motivo su presencia en la matriz de suelo en las cantidades apropiadas es fundamental (Riser-Roberts, 1998). El agua se distribuye entre los espacios dejados por las partículas de suelo, desplazando la fase gaseosa y ocupando los espacios libres.

1.4.4.2. Nutrientes.

Específicamente Nitrógeno (N) y Fósforo (P) son importantes en la matriz sólida, pues permiten que los procesos biológicos se lleven a cabo eficientemente. Su disponibilidad para el crecimiento microbiano está gobernado por tres factores: 1) la cantidad necesaria en el suelo y su tasa de mineralización, 2) la cantidad de carbono orgánico biodegradable y el N y P del contaminante que sea accesible, 3) la tasa en la que el carbono orgánico del contaminante es asimilado en el suelo. En el caso de la biodegradación se debe asegurar porcentajes adecuados de C:N:P para que ésta pueda ser llevada a cabo (Riser-Roberts, 1998). Así Viñas (2005), sugiere una proporción molar de 100C:10N:1P, respecto al carbono orgánico total (COT).

1.4.4.3. Oxígeno

Este factor ambiental es importante en la degradación aeróbica, pues favorece la bio-oxidación de los compuestos orgánicos, inclusive ayuda a prevenir la migración de los metales pesados; en el caso de microcosmos de suelo, el aporte de un sistema de oxigenación favorece la distribución de los nutrientes, la homogeneidad de la humedad y, por ende, la distribución de estos componentes y las células de los microorganismos en una forma adecuada (Riser-Roberts, 1998).

1.4.5. Hongos

Los hongos, conjuntamente con las bacterias, conforman el grupo de descomponedores primarios de la materia orgánica, pues son responsables de su oxidación, con lo que consiguen que los elementos inorgánicos sean devueltos al ambiente para ser utilizados en su propio metabolismo y de otras formas de vida (Rittman & McCarty, 2001).

Entre los hidrocarburos degradados por hongos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos que resultan de la fusión de cuatro o más bencenos (Saraswathy y Hallberg, 2002).

Entre los hongos descritos con capacidades hidrocarburofíticas se encuentran los hongos de “podredumbre blanca” o ligninolíticos, y los hongos filamentosos. Como se indicó previamente, los hongos correspondientes a la División *Deuteromycota*, son aquellos llamados “hongos filamentosos” u “hongos de suelo”, los mismos que son objetos de aislamiento y selección en este trabajo.

1.4.5.1. Citología de la División *Deuteromycota*

La División *Deuteromycota* presenta hongos cuyas estructuras reproductivas sexuales no han sido identificadas. Su propagación está mediada por un conjunto de finos tubos, llamados *hifas*, multi-ramificados, conjunto conocido como *micelio*. Los *conidios* o *conidiosporas* que son células asexuadas externas y brotan de las hifas; o en otros casos que no presentan conidias. Su reproducción la realizan por la división o fracción de sus hifas, como ocurre con el género *Geotrichum*; sus hifas pueden ser septadas, es decir, divididas las células por paredes de quitina, a lo que se denomina hifas tabiculares. Hay que destacar que los mohos son las formas de micromicetos filamentosos, lo que permite su diferenciación de otras formas como las levaduras, que son estructuras ovaladas unicelulares. Otras estructuras de

reconocimiento en los hongos de esta división son sus fiálides, que es la célula que da origen a los conidios y que en el caso de *Aspergillus sp.* se extiende desde el vértice para formar los conidios. Para el caso de *Penicillium sp.* cada conidióforo está ramificado, recibiendo estas ramificaciones el nombre de *métula*, ramificaciones que dan origen en su ápice a las esporas (Gilman, 1959; Carrillo, 2003).

1.4.6. Surfactantes y su actividad emulsificante.

Los surfactante son sustancias que mejoran la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos al disminuir la tensión superficial frente a un solvente, como el agua. Como consecuencia, se modifica la energía interfacial del sistema, ya que las moléculas de dicho surfactante producen adsorción del compuesto a la superficie del agua (Rivas y Gutiérrez. 1999).

El caso particular de estas sustancias *tensioactivas* de carácter anfotérico; es decir, que frente a pH ácido son catiónicas y frente a pH básico son aniónicas, brindan dos tipos de acciones: *adsorción*, que gracias a sus dos grupos funcionales, un grupo funcional polar, que contiene heteroátomos (O, S, N, P); y el grupo apolar, que es un hidrocarburo parafínico; mejoran la acción emulsificante sobre moléculas de baja movilidad en fases oleosas-acuosas. Desde el punto de vista energético, reducen la energía libre de Gibbs (ΔG) de las moléculas en la interfase. En el caso del petróleo, este hecho facilita su movilidad. En tanto que con la *asociación*, el aumento de surfactante resulta en una mayor adsorción hacia las interfases disponibles, la concentración de la molécula menos móvil aumenta hasta formar las primeras miscelas. Los electrolitos pueden reducir el campo eléctrico molecular, favoreciendo la micelización (Salager & Fernández, 2004).

Algunos microorganismos como bacterias y levaduras, principalmente, son capaces de producir biosurfactantes, que pueden mejorar el uso de

sustratos hidrofóbicos por los microorganismos y consecuentemente la detoxificación de este tipo de compuestos. Los hongos filamentosos pueden representar una excelente alternativa para inducir la producción de biosurfactantes, ya que se puede aprovechar su capacidad de desarrollarse y tolerar altas concentraciones de TPHs como lo han mostrado las cepas aisladas de suelos contaminados (Luna *et al.*, 2005).

1.4.7. Ensayos con Microcosmos

El diseño de microcosmos permite simular, en lo más próximo posible, las condiciones reales del lugar de estudio pero en condiciones óptimas para la degradación, introduciendo sustancias nutritivas (bioestimulación), e introduciendo las cepas de hongos aisladas (bioaumentación) para conocer *a priori* la capacidad degradadora de hidrocarburo de los microorganismos (Viñas, 2005).

1.4.8. El suelo como entorno para la degradación de hidrocarburos

El suelo es la matriz más compleja de la biósfera formada por el entretrejido de fases sólida, líquida y gaseosa; es además compleja su composición química lo que determina diferencias en su estructura (Atlas, 1984).

En esta matriz se presentan varios fenómenos antagónicos que pueden o no favorecer la biorremediación del contaminante, ya que por una parte se pueden presentar efectos de cooperativismo o competencia entre los organismos *in situ*, dando como resultado la modificación de la microbiota del lugar. También la mezcla de contaminantes puede afectar su degradación, haciéndolo más recalcitrantes o tóxicos (Riser-Roberts, 1998).

Se conoce como bioaumentación a la adición de cultivos microbianos previamente obtenidos para aumentar la concentración microbiana que permita reducir el contaminante en un menor tiempo posible. Por otro lado, la bioestimulación consiste en la adición de elementos al suelo o agua subterránea para estimular un crecimiento en la población microbiana autóctona; este método presume que los microbios adecuados están presentes. Ambas técnicas son las más empleadas en la biorremediación (Innovative Technology Group, 2003).

1.5. Sistema de hipótesis:

Las cepas fúngicas aisladas reducen la concentración de TPHs, a nivel de laboratorio.

Las cepas fúngica seleccionadas son productoras de biosurfactantes, característica que se evalúa con el ensayo de Índice de Actividad Emulsificante (E_{24}).

2. CAPÍTULO SEGUNDO: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.Participantes

La Escuela Politécnica del Ejército, por intermedio del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI). El Ministerio del Ambiente, por intermedio de la Unidad del Equipo Gestor del Proyecto de Reparación Ambiental y Social (UEG – PRAS).

2.2. Zona de Estudio

2.2.1.Campo

El área de estudio está ubicada en la parroquia rural de San Carlos, cantón Joya de los Sachas, provincia de Orellana, situada en el km 6 de la vía Napo, ramal de la vía La Parker. Es un sector húmedo-tropical con presencia de lluvias frecuentes; el nivel freático es localizable, en los sectores más bajos, a aproximadamente tres de profundidad. El suelo es bastante húmedo, arcilloso hasta los seis metros, aproximadamente, y en adelante la contextura cambia a arena. El sector está rodeado de abundante vegetación (H. Concejo Provincial de Orellana. 2009). A la entrada de la parroquia está localizada la Estación de Bombeo Sacha Sur, actualmente operada por la compañía petrolera estatal PETROECUADOR, próxima al estero Sapito que atraviesa longitudinalmente una considerable zona de la parroquia y que se ve afectado por la contaminación con hidrocarburos. Las características climáticas del sector favorecen el crecimiento de microorganismos.

Para el estudio de la distribución del contaminante, así como del aislamiento y selección microbiológica, se perforaron un total de 20 pozos someros y 18 pozos profundos, de los cuales se seleccionaron los siete pozos someros 1, 2, 4, 5, 8, 9 y 10. El pozo 23 fue escogido para conformar los microcosmos. En la Figura 2.2.1 – 1 se presenta el mapa del área de estudio y los puntos de muestreo.

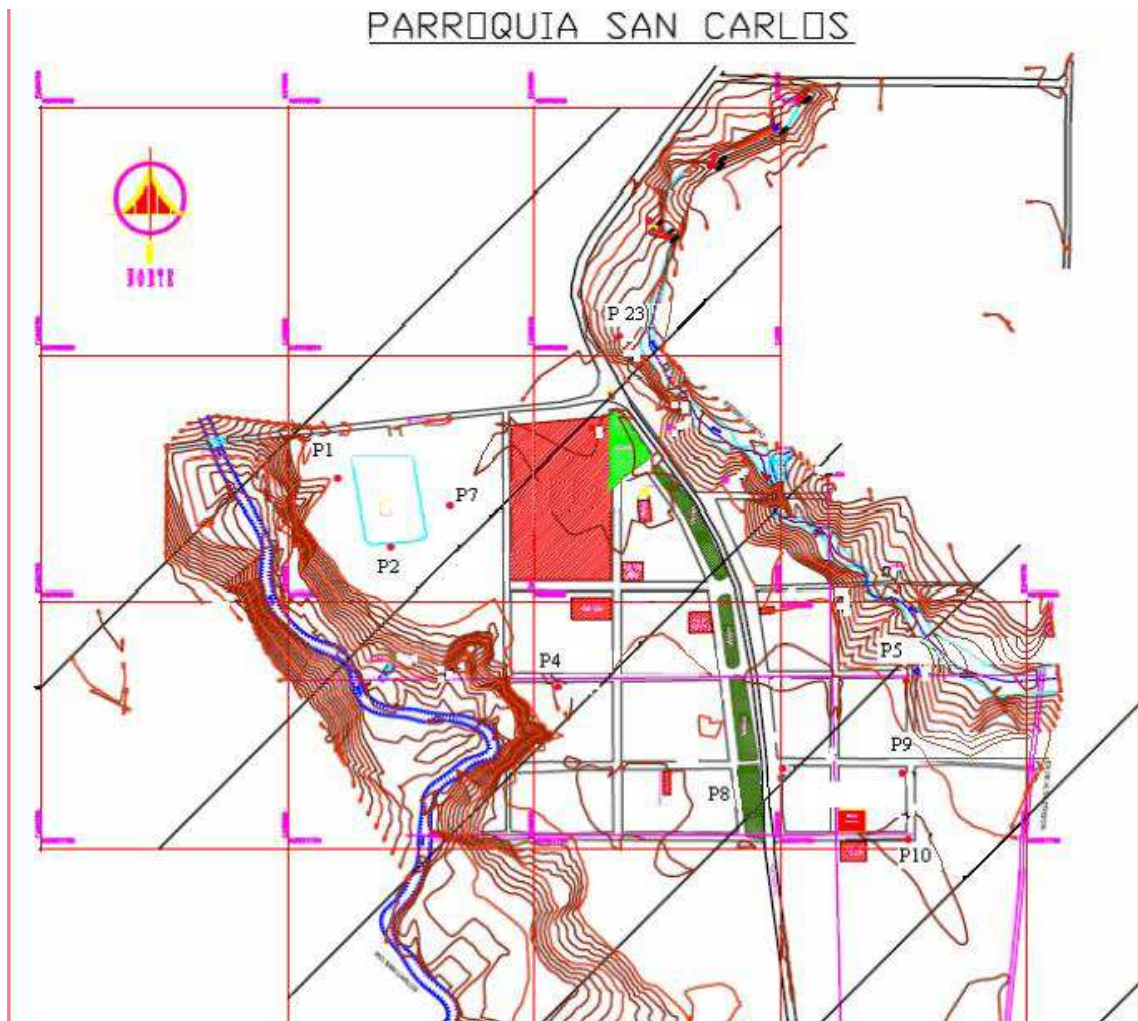


Figura 2.2.1-1 Mapa de la Parroquia Rural San Carlos. Los puntos rojos representan los pozos de muestreo. La escala de la imagen es 1:100 000 en Km (Cumbal et al, 2010).

A continuación, en el Tabla 2.2.1- 1 se enlistan los puntos con sus correspondientes coordenadas, tomadas con un sistema de posicionamiento global *Magellan eXplorist 600*.

Tabla 2.2.1-1 Coordenadas geográficas de los pozos utilizados para las tomas de muestras.

Nombre del Pozo	Coordenadas
Pozo 1	290055N;9958107E
Pozo 2	290006N;9958106E
Pozo 4	290244N;9957913E
Pozo 5	290619N;9957914E
Pozo 8	290504N;9957828E
Pozo 9	290615N;9957828E
Pozo 10	290575N;9957709E

2.2.2. Laboratorio

Laboratorios de Biotecnología Ambiental y Microbiología, pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Vida, ubicados en el CEINCI.

2.2.3. Período de Investigación

El tiempo de desarrollo de la Investigación fue de un año y once meses, comprendido entre Febrero de 2009 a Enero de 2011.

2.3. Diseño Experimental

- Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC):

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA), tanto para el conteo de UFC de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales, como para el conteo de hongos hidrocarburolíticos. Los tratamientos consistieron en los órdenes de dilución: 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , y 1×10^{-7} , por triplicado; con esto se obtuvieron un total de 15 unidades experimentales por cada conjunto metabólico fúngico y 30 un total de 30 unidades experimentales. El detalle de este ensayo figura en la Tabla 2.3-1.

Tabla 2.3-1 Descripción de las Unidades Experimentales elaboradas para el recuento de UFC de hongos hidrocarburolíticos y hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales.

No.	Medio Salino + 1% petróleo	Medio PDA
1	1×10^{-3} , repetición 1	1×10^{-3} , repetición 1
2	1×10^{-3} , repetición 2	1×10^{-3} , repetición 2
3	1×10^{-3} , repetición 3	1×10^{-3} , repetición 3
4	1×10^{-4} , repetición 1	1×10^{-4} , repetición 1
5	1×10^{-4} , repetición 2	1×10^{-4} , repetición 2
6	1×10^{-4} , repetición 3	1×10^{-4} , repetición 3
7	1×10^{-5} , repetición 1	1×10^{-5} , repetición 1
8	1×10^{-5} , repetición 2	1×10^{-5} , repetición 2
9	1×10^{-5} , repetición 3	1×10^{-5} , repetición 3
10	1×10^{-6} , repetición 1	1×10^{-6} , repetición 1
11	1×10^{-6} , repetición 2	1×10^{-6} , repetición 2
12	1×10^{-6} , repetición 3	1×10^{-6} , repetición 3
13	1×10^{-7} , repetición 1	1×10^{-7} , repetición 1
14	1×10^{-7} , repetición 2	1×10^{-7} , repetición 2
15	1×10^{-7} , repetición 3	1×10^{-7} , repetición 3

- Prueba del Índice de Actividad Emulsificante (E24)

Este ensayo se desarrolló siguiendo un Diseño Completamente al Azar (DCA). Los tratamientos fueron dos medios: el primero, Medio Salino; el segundo, Medio Glucosa-Sucrosa, cada uno inoculado, por triplicado, con las tres cepas fúngicas seleccionadas. La descripción del ensayo consta en la Tabla 2.3-2.

Tabla 2.3-2 Descripción de las unidades experimentales ensayadas en la Prueba del Índice de Actividad Emulsificante.

No.	Unidades Experimentales
1	<i>Aspergillus sp.</i> en medio Salino, repetición 1.
2	<i>Aspergillus sp.</i> en medio Salino, repetición 2.
3	<i>Aspergillus sp.</i> en medio Salino, repetición 3.
4	<i>Aspergillus sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 1.
5	<i>Aspergillus sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 2.
6	<i>Aspergillus sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 3.
7	<i>Geotrichum sp.</i> en medio Salino, repetición 1.
8	<i>Geotrichum sp.</i> en medio Salino, repetición 2.
9	<i>Geotrichum sp.</i> en medio Salino, repetición 3.
10	<i>Geotrichum sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 1.
11	<i>Geotrichum sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 2.
12	<i>Geotrichum sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 3.
13	<i>Penicillium sp.</i> en medio Salino, repetición 1.
14	<i>Penicillium sp.</i> en medio Salino, repetición 2.
15	<i>Penicillium sp.</i> en medio Salino, repetición 3.
16	<i>Penicillium sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 1.
17	<i>Penicillium sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 2.
18	<i>Penicillium sp.</i> en medio Sucrosa – Glucosa, repetición 3.

- Microcosmos:

Fueron desarrollados en base a un Diseño Completamente al Azar (DCA). Los microcosmos en agua se inocularon con cepas de *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.* Los tratamientos fueron: el agua de San Carlos, del pozo 23, que registró contaminación y el medio PDB, adicionado petróleo al 1%, inoculados con las cepas fúngicas y los controles sin inóculos. Las unidades experimentales están descritas en la Tabla 2.3-3.

Tabla 2.3-3 Descripción de las unidades experimentales ensayadas en el estudio de los microcosmos en agua.

No.	Unidades Experimentales
1	<i>Geotrichum sp.</i> , en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 1
2	<i>Geotrichum sp.</i> , en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 2
3	<i>Geotrichum sp.</i> , en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 3
4	<i>Penicillium sp.</i> , en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 1
5	<i>Penicillium sp.</i> , en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 2
6	<i>Penicillium sp.</i> , en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 3
7	Control, en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 1
8	Control, en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 2
9	Control, en agua del pozo 23 contaminado con TPHs, 3
10	<i>Geotrichum sp.</i> , en Medio PDB + 1% de petróleo, 1
11	<i>Geotrichum sp.</i> , en Medio PDB + 1% de petróleo, 2
12	<i>Geotrichum sp.</i> , en Medio PDB + 1% de petróleo, 3
13	<i>Penicillium sp.</i> , en Medio PDB + 1% de petróleo, 1
14	<i>Penicillium sp.</i> , en Medio PDB + 1% de petróleo, 2
15	<i>Penicillium sp.</i> , en Medio PDB + 1% de petróleo, 3
16	Control en Medio PDB + 1% de petróleo, 1
17	Control en Medio PDB + 1% de petróleo, 2
18	Control en Medio PDB + 1% de petróleo, 3

Para microcosmos en suelo, adicionalmente a las cepas mencionadas, se trabajó con *Aspergillus sp.* Los tratamientos comprendieron los inóculos fúngicos en el suelo de San Carlos, del pozo 23 que registró contaminación, con y sin la adición de nutrientes, así como los controles sin inóculos fúngicos. El detalle del ensayo está descrito en la tabla 2.3-4.

Tabla 2.3-4. Descripción de las unidades experimentales ensayadas en el estudio de los microcosmos en suelo.

No.	Unidades Experimentales	No.	Unidades Experimentales
1	<i>Aspergillus</i> con nutrientes 1	13	<i>Aspergillus</i> sin nutrientes 1
2	<i>Aspergillus</i> con nutrientes 2	14	<i>Aspergillus</i> sin nutrientes 2
3	<i>Aspergillus</i> con nutrientes 3	15	<i>Aspergillus</i> sin nutrientes 3
4	<i>Geotrichum</i> con nutrientes 1	16	<i>Geotrichum</i> sin nutrientes 1
5	<i>Geotrichum</i> con nutrientes 2	17	<i>Geotrichum</i> sin nutrientes 2
6	<i>Geotrichum</i> con nutrientes 3	18	<i>Geotrichum</i> sin nutrientes 3
7	<i>Penicillium</i> con nutrientes 1	19	<i>Penicillium</i> sin nutrientes 1
8	<i>Penicillium</i> con nutrientes 2	20	<i>Penicillium</i> sin nutrientes 2
9	<i>Penicillium</i> con nutrientes 3	21	<i>Penicillium</i> sin nutrientes 3
10	Suelo con nutrientes 1	22	Suelo sin nutrientes 1
11	Suelo con nutrientes 2	23	Suelo sin nutrientes 2
12	Suelo con nutrientes 3	24	Suelo sin nutrientes 3

2.4.Procedimientos

2.4.1.Muestreo de suelo para aislamiento de cepas fúngicas.

Para la toma de las muestras se seleccionaron siete pozos del área de estudio. Se procedió en base a lo descrito por Valencia *et al.* (2004), con modificaciones. En cada pozo de monitoreo se excavó, con una pala estéril a aproximadamente 0.5 m y se tomó, aproximadamente, 500 g de suelo, en cinco puntos cercanos a los pozos, en un radio de 5 m; se homogenizaron las muestras de suelo en un recipiente plástico estéril, y se tomó cerca de 500 g en fundas estériles herméticas, que se transportaron al laboratorio.

2.4.2. Selección de hongos.

Se tomaron 20 g de suelo de cada uno de los siete pozos someros seleccionados. Se inocularon las muestras de suelo en medio de enriquecimiento propuesto por Potin *et al.* (2004_a, 2004_b), con modificaciones, compuesto de (g.L⁻¹): Extracto de malta, 3; extracto de levadura, 3; peptona, 5; glucosa, 10; pH 5.4. Este inóculo se sometió a agitación por 10 min. A partir de este inóculo se realizaron diluciones seriadas desde 1x10⁻³ hasta 1x10⁻⁵. De cada dilución se tomó 0.1 mL y se inoculó, por triplicado, en medio mineral (MM) sólido, propuesto por Saraswathy & Hallberg (2002), consistente de (g.L⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 2.4; K₂HPO₄, 1.55; Na₂HPO₄.H₂O, 0.85; NaCl, 0.5; MgSO₄.7H₂O, 0.26; 1 mL de solución de elementos traza, a pH 5. La composición de la solución traza es (mg.L⁻¹): Ácido nítrico triacético, 15; CaCl₂.2H₂O, 15; MnSO₄. H₂O, 6; FeSO₄.7H₂O, 1; Co(NO₃)₂.6H₂O, 1; ZnSO₄, 1; CuSO₄, 0.1; H₃BO₃, 0.1; Na₂MoO₄, 0.1; Al₂(SO₄)₃.H₂O, 0.1. Este medio fue suplementado con petróleo a distintas concentraciones: 0.1, 0.5 y 1%, para favorecer la selección de hongos tolerantes al petróleo en el medio (Viñas, 2005; Walker & Colwell, 1975). Se sometieron a incubación, en posición invertida, a 28°C, durante 11 días, luego de los cuales se evaluó de manera visual el crecimiento de colonias fúngicas sobre el medio sólido. Se seleccionaron las colonias fúngicas que presentaron crecimiento en forma de moho y que se mostraron más aisladas, las cuales se inocularon en medio

sólido PDA + 50 µg/mL de gentamicina y se incubaron durante tres días, en posición invertida a 22°C.

2.4.3. Identificación de las colonias fúngicas.

A partir de los cultivos que crecieron en medio PDA de 5 días de crecimiento, se observaron las características macroscópicas y microscópicas, de acuerdo a Valencia (2004). Dentro de las características macroscópicas se observó la forma de crecimiento de la colonia fúngica, la textura, el color, la presencia de pigmentos y la formación o no de anillos concéntricos; esto también para el anverso del cultivo. Con respecto a la evaluación microscópica, se observó la formación de estructuras aéreas como hifas; asimismo con tinciones con azul de lactofenol se determinó el tipo de hifa y la presencia de cuerpos fructíferos. Basados en estos particulares, la identificación de las colonias fúngicas se consiguió en base a la clave taxonómica propuesta por Barnett & Barry (1972) y con la ayuda del Ing. Abraham Oleas, especialista en hongos.

2.4.4. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Para el conteo de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales y de hongos degradadores de petróleo, se procedió como indica Valenzuela *et al.* (2006), con modificaciones. Para el conteo de la población heterótrofa se tomó 20 g, que se inocularon en 80 mL de solución salina 0.9 % estéril, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-7} , por triplicado, que a su vez fueron inoculados en medio PDA, incubados en posición invertida durante 72 h., hasta visualizadas colonias fúngicas aisladas a manera de moho. De cada caja se realizó el conteo del total de colonias, se aceptaron como válidas las cajas que presentaron crecimiento entre 30 y 300 colonias en medio sólido (Madigan *et al.*, 1998), y se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo de suelo. Para el conteo de poblaciones degradadoras de petróleo, se inocularon las diluciones en Medio Agar de Sales Minerales + 1% de

petróleo (Wunder, Kremer, Sterner, & Anke, 1994), cuya composición consta en la Tabla 2.4.4 -1, en un tiempo de incubación de 9 días, tiempo en el que se evidenció crecimiento aislado de colonias fúngicas.

Tabla 2.4.4-1 Composición del Medio Agar Minerales suplementado con petróleo, modificado de Wunder, Kremer, Sterner, & Anke (1994).

Composición	Cantidad (g.mL ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.560
K ₂ HPO ₄	1.008
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.553
NaCl	0.325
MgSO ₄ .7H ₂ O ₄	0.169
pH	5
Petróleo	1%

2.4.5. Evaluación del antagonismo entre colonias fúngicas seleccionadas.

Para determinar el antagonismo de las cepas seleccionadas, se procedió como indica Guédeza *et al.* (2009), con modificaciones. A partir de cultivos en medio PDA de las cepas fúngicas correspondientes a *Aspergillus* sp., *Geotrichum* sp. y *Penicillium* sp., de siete días de crecimiento, se tomaron con sorbetes estériles, porciones de cultivo, a manera de sacabocado, que fueron inoculados en la caja de la cepa contra la que se deseaba determinar si se establecía o no relación antagónica. Se depositaron tres porciones del cultivo foráneo en posición triangulada en la caja del cultivo fúngico a evaluar. Con esto se formó las combinaciones que constan en el Tabla 2.4.5- 1.

Tabla 2.4.5-1 Establecimiento de cultivos para evaluar relaciones de antagonismo.

Denominación	Colonia fúngica receptora	Colonia fúngica a ser evaluada
A/p	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
A/g	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Geotrichum</i> sp.
G/a	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
G/p	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
P/a	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
P/g	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Geotrichum</i> sp.

El esquema de este ensayo realizado se presenta en la Figura 2.4.5-1, a continuación.

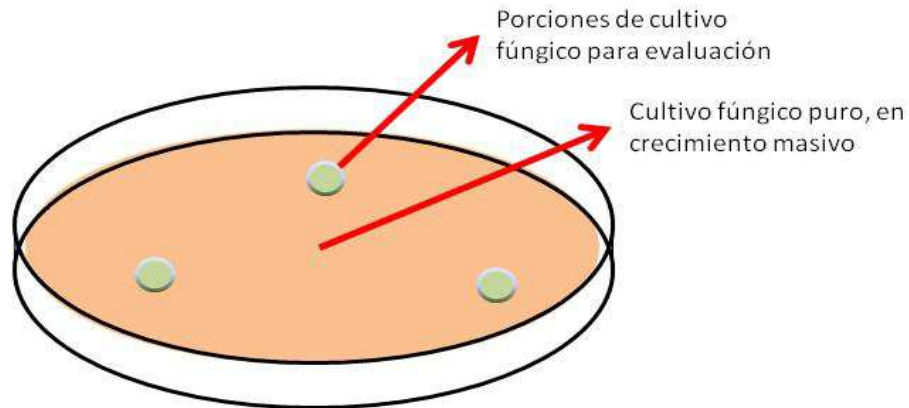


Figura 2.4.5-1 Esquema gráfico para representar el ensayo de evaluación del antagonismo de las cepas fúngicas, según Güédeza *et al.* (2009).

2.4.6. Cultivo para obtención de biomasa.

Con el objetivo de establecer microcosmos, se indujo el crecimiento masivo en medio líquido de las cepas fúngicas seleccionadas, tanto en medio mineral AMI + 1%P (Valenzuela *et al.* 2006), así como en medio de glucosa-sucrosa (Valenzuela *et al.* 2006), cuya composición constan en la Tabla 2.4.6-1. Por medio de conteo de esporas o fragmentos de hifas (según el caso), en cámara de recuento de Neubauer (Boeco, Neubauer, Germany), se procedió como lo reporta la bibliografía (Potin, *et al.* 2004_a, Potin, *et al.* 2004_b). El tiempo de incubación fue de 48 h.

Tabla 2.4.6-1 Composición de los medios empleados para la obtención de biomasa de las cepas fúngicas (Valenzuela, *et al.* 2006; Potin, *et al.* 2004a).

MEDIO AMI + P		MEDIO GLUCOSA – SUCROSA	
Composición	Cantidad (g.mL ⁻¹)	Composición	Cantidad (mg.mL ⁻¹)
CaCl ₂	0.1	Glucosa	5
KCl	0.5	Sucrosa	5
KH ₂ PO ₄	1.0		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5		
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	0.2		
pH	5.0		

2.4.7. Índice de Actividad Emulsificante (E24)

Para medir la actividad emulsificante, se procedió como indica Cooper & Goldenberg (1987), con modificación; se empleó un tubo de ensayo de 20 cm de longitud, en el cual se depositó 6 mL de diesel y se adicionó 4 mL de muestra de cultivo líquido, mencionados en el literal anterior, de cuatro días de crecimiento, previamente centrifugado a 10 000 RPM. Se agitó en vórtex a su máxima capacidad durante 2 min. Se dejó reposar a los tubos en posición vertical durante 24 h. Posterior a este tiempo se obtuvo el porcentaje de emulsión, dividiendo la altura de la capa de emulsión para la altura total, multiplicado por 100.

2.4.8. Muestreo de suelo para el establecimiento de microcosmos en sustrato sólido.

Para el establecimiento del microcosmos se seleccionó muestras de suelo correspondiente al pozo de muestreo 23D, que presentó una alta concentración de hidrocarburos, reportados en el Anexo 1. Se realizó la selección de una muestra compuesta, como indica Valenzuela *et al.* (2006). Se tomaron muestras de suelo en cinco puntos distintos, espaciados horizontalmente en un radio de hasta un metro entre cada uno, a una profundidad de 0.5 m, homogenizando la muestra de suelo para obtener una muestra representativa del sector.

2.4.9. Muestreo de agua para el establecimiento de microcosmos en sustrato líquido.

Con el uso de un instrumento para el muestreo de aguas, denominado *bailer*, de un litro de capacidad, se recogió el agua del pozo 23 contaminada, información demostrada en los análisis entregados por la empresa GRÜNTEC, y transportadas al laboratorio desde el área de estudio en botellas ámbar de 1 L. de capacidad bajo refrigeración a 4°C.

2.4.10. Establecimiento de Microcosmos en Agua.

En frascos BOECO® de 250 mL de capacidad se distribuyeron 200 mL de cada uno de los tratamientos y se inocularon con piezas de agar PDA con crecimiento de los hongos seleccionados, de aproximadamente 1 cm²; se mantuvieron los cultivos en agitación a 110 rpm a 18°C durante tres semanas. Al cabo de este tiempo se realizó la evaluación de la disminución de los hidrocarburos en los cultivos por medio de Cromatografía de Gases con Detección de Ionización de Llama (GC-FID).

2.4.11. Establecimiento de Microcosmos en Suelo.

En matraces de 250 mL de capacidad se depositaron 150g de suelo seco, alimentado por un sistema de aireación vertical (de abajo hacia arriba) para proveer oxígeno a la columna de suelo de aproximadamente 6 cm de longitud, como se esquematiza en la Figura 2.4.11- 1.

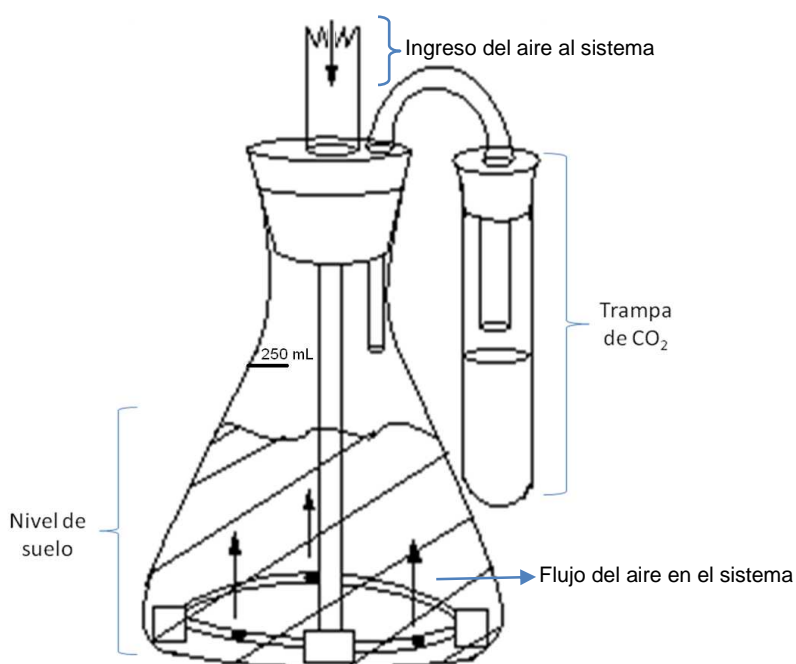


Figura 2.4.11-1 Esquema gráfico de las unidades experimentales que conformaron los microcosmos en suelo. Las flechas indican el flujo de aire.

La trampa de CO₂ del gráfico fue empleada para determinar la respiración o CO₂ libre en los cultivos, empleando el método de titulación que se describirá más adelante. A partir de los reportes entregados por los laboratorios CESAQ-PUCE y GRÜNTEC (Anexos 3 y 4) sobre las concentraciones de nutrientes en el suelo seco del sector, y estableciendo una concentración de nutrientes de 100C : 10N : 1P, como lo indica Viñas (2005), se determinó necesario suministrar fósforo y nitrógeno, en forma de K₂HPO₄ y KNO₃, en dilución estéril para alcanzar un porcentaje de humedad del 60%.

Para determinar el porcentaje de humedad del suelo se procedió usando el método gravimétrico como indican Arias y Piñeros (2008), con modificación. A una masa de suelo se secó al aire, permitiendo eliminar el exceso de agua, a fin de que contenga únicamente la humedad higroscópica. De esta masa, se pesaron por triplicado 20 g de suelo en crisoles tarados. Las muestras se llevaron a la estufa, secándolas a una temperatura de 110°C, durante toda la noche. Se dejaron reposar las muestras en un desecador, durante una hora. Se pesaron nuevamente las muestras. La diferencia de peso, relativo a la masa de suelo seco, constituye el porcentaje de humedad.

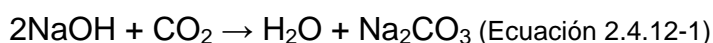
Cada cuatro días se realizó la determinación de la humedad o según las condiciones lo requerían y se ajustó la humedad al porcentaje determinado. Las cantidades empleadas constan en el Tabla 2.4.11-1. Se mantuvo el experimento en incubación durante 25 días. Para evaluar la posible disminución de los hidrocarburos en los cultivos, se empleó Cromatografía de Gases con Detección de Ionización de Llama (GC-FID).

Tabla 2.4.11-1 Cantidades de nutrientes suplementadas en el ensayo de microcosmos en suelo.

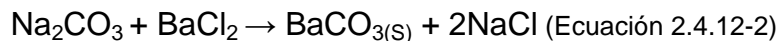
Nutrientes	Cantidad	Unidades
K ₂ HPO ₄	0.174	g
KNO ₃	0.606	g
Agua	81.750	mL
pH	5	

2.4.12.Determinación del CO₂ libre en microcosmos de suelo, por el método de titulación.

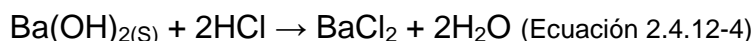
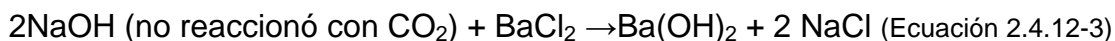
Se procedió como indica Acosta *et al.* (2006), con modificaciones. En tubos de ensayo herméticamente cerrados con tapones de caucho, se depositó 10 mL de NaOH 1N, captor del CO₂ libre emitido dentro de los microcosmos, como se revisa en la ecuación estequiométrica 2.4.12-1:



Cada día se determinó por titulación con HCl 0.1N la cantidad de CO₂ libre producido, durante 13 días. Se vertió en cada tubo trampa un exceso de BaCl₂ para que precipite el CO₂ capturado, como BaCO₃, según la ecuación estequiométrica 2.4.12-2:



Tras la precipitación del BaCO₃, se tituló el CO₂ no precipitado con el HCl 0.1N, hasta el cambio de viraje de color de la fenolftaleína, indicador de cambio de pH, dando origen al siguiente conjunto de ecuaciones:



El volumen (mL) de HCl 0.1N gastados corresponden al NaOH que no reaccionó, por lo cual la fórmula para el cálculo de mg CO₂ producido se expresa de la siguiente forma, por estequiometría, como se observa en la ecuación 2.4.12-5:

$$\text{mg CO}_2 \text{ producidos} = (10 - V) \times N \times 2.2 \text{ mg CO}_2 \text{ (Ecuación 2.4.12-5)}$$

Donde V corresponde a los mL de HCl gastados y N es la Normalidad del HCl empleado en la titulación.

2.4.13. Evaluación de la posible actividad reductora de TPHs de los hongos en microcosmos.

Se evaluó la actividad reductora que pudieran realizar los hongos en los distintos microcosmos ensamblados en el laboratorio por medio de la determinación de la concentración TPHs en el medio, para lo cual se emplearon los métodos descritos por Rosero (2010), para extraer TPHs en agua y suelo, y la determinación de la concentración de TPHs por CG-FID.

2.4.13.1. Extracción de TPHs en agua.

Se realizó la extracción de TPHs en agua siguiendo el método estandarizado EPA 3510C (1996), validado dentro del laboratorio de Remediación Ambiental del CEINCI (Rosero, 2010).

2.4.13.2. Extracción de TPHs en suelo.

Se procedió en base al método estandarizado EPA 3550B (1996), validado para las condiciones del laboratorio (Rosero, 2010).

2.4.14. Determinación de la concentración de TPHs por CG-FID.

Se empleó el método estandarizado EPA 8015B (1996), validado para las condiciones de laboratorio (Rosero, 2010). Los viales con el contenido de extracción de TPHs para suelo fueron enviados a los laboratorios GRÜNTEC, para ser analizados en sus cromatógrafos con detector FID.

3.CAPÍTULO TERCERO: RESULTADOS

3.1. Selección e identificación de hongos con posible capacidad hidrocarburofítica.

Tras el tiempo de incubación de los medios sólidos minerales con petróleo, se evaluó el crecimiento de colonias fúngicas. Por observación directa y con ayuda del microscopio, como se muestra en la Figura 3.1-1, se seleccionaron las colonias que crecieron sobre superficies cubiertas de petróleo.

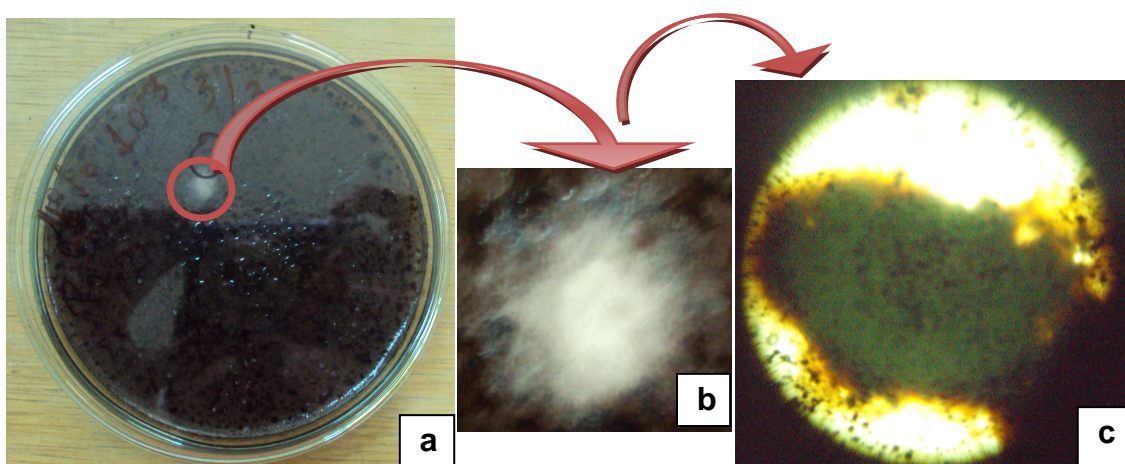


Figura 3.1-1. Evaluación visual del crecimiento fúngico en medio sólido, hacia los 11 días de incubación. a. Medio sólido con concentración al 1% de petróleo, sembrado con alícuotas de dilución en orden de 1×10^{-3} . b. Aumento de 4.2X a la colonia fúngica. c. Observación al estéreomicroscopio, con un lente objetivo de 40X.

Se obtuvieron 71 cajas de medio sólido con petróleo, con crecimiento fúngico. A las colonias fúngicas seleccionadas se aplicaron las bases de identificación taxonómicas explicados en la metodología, reportándose cinco géneros, enlistados en la Tabla 3.1-1.

Tabla 3.1-1 Géneros fúngicos obtenidos.

<u>Géneros Identificados</u>
<i>Aspergillus sp.</i>
<i>Fusarium sp.</i>
<i>Geotrichum sp.</i>
<i>Penicillium sp.</i>
<i>Paecilomyces sp.</i>

Se seleccionaron *Aspergillus sp.* y *Geotrichum sp.* para la conformación de microcosmos líquidos, ya que presentaron mejor crecimiento en medios líquidos comerciales. Para los microcosmos en suelo, a parte de las cepas mencionadas, se escogió también a *Penicillium sp.* Estas cepas están reportadas en varios estudios relativos a trabajos de biorremediación de ambientes contaminados por petróleo o sus derivados, por presentar niveles representativos de reducción de contaminación en medios sólidos o líquidos (Saraswathy & Hallberg, 2002; Potin *et al.*, 2004; Ifeanyichukwu *et al.*, 2005; Aguayo, 2008).

Se descartó el uso de *Fusarium sp.* y *Paecilomyces sp.*, porque son fitopatógenos potencialmente dañinos, lo que podría representar un riesgo a la flora del sector en caso de ser empleadas en procesos de biorremediación *in situ* (Gilman, 1957).

Geotrichum sp. presentó micelio blanco, algodónoso, sin formaciones concéntricas, mostró difusión de un pigmento rojo oscuro tanto en medio líquido como en medio sólido. Se puede apreciar en las Figuras 3.1-2a y 3.1-2b la morfología macroscópica de la colonia, tanto de la parte superior como inferior del cultivo sólido. En sus características microscópicas, visibles en la Figura 3.1-2c, presentó un micelio septado similar a un césped, que por fisión simple da origen a sus conidioforas y conidias, de corto tamaño, erecto y ascendente. Cada conidia fue hialina, monocelular, cilíndrica, de extremo truncado, como cadena. Coincide con la descripción de Gilman (1957) y Barnett & Hunter (1972).

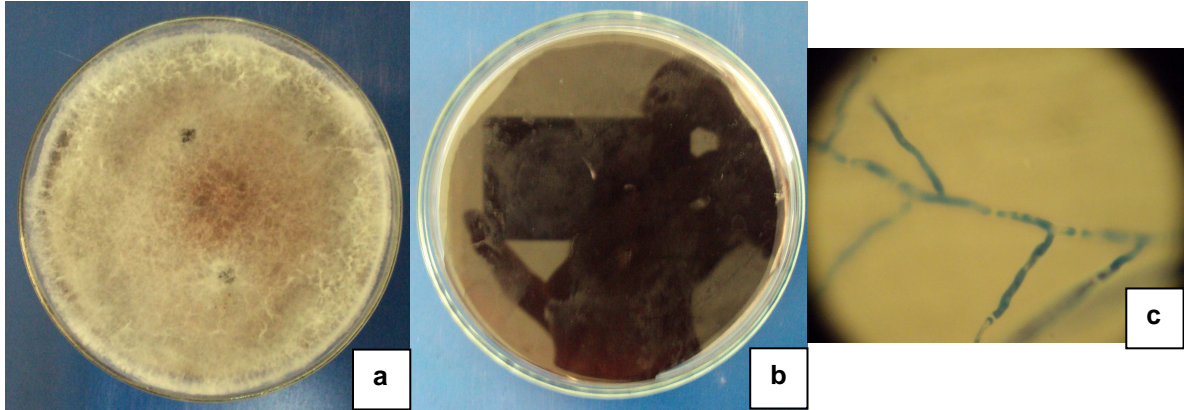


Figura 3.1-2 Fotografías Macro y Microscópicas de las colonias de *Geotrichum sp.* a. Parte superior del cultivo en medio sólido. b. Parte inferior del cultivo. c. Observación al microscopio de contraste de fase con lente objetivo 100x.

Penicillium sp. presentó colonias blancas, aterciopeladas, ya avanzado en tiempo de crecimiento presentó una coloración verdosa oscura, no generó pigmentos en los medios de crecimiento. Mostró formaciones concéntricas, conservando su anverso de color blanco (Figuras 3.1-3a y 3.1-3b). La Figura 3.1-3c muestra las características a nivel microscópico. Sus hifas vegetativas, formadas por simple división, dieron origen a métulas. Cada métula dio origen a tres fiálides que terminaban en células conidiógenas o conidióforos, que a su vez, dieron origen a conidios. Se observa su peculiar forma de “cabeza de cepillo”. Sus conidios son de forma oval y que presentaron desprendimiento a manera de cadena.

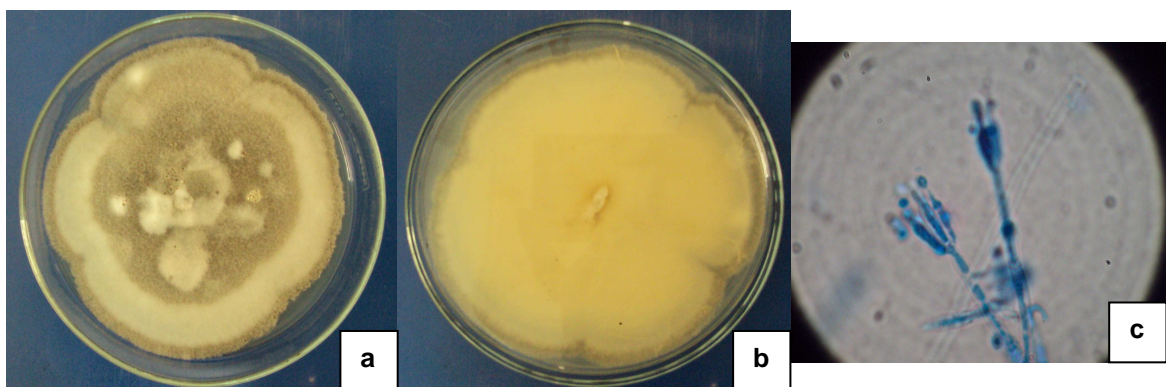


Figura 3.1-3 Fotografías de colonias aisladas de *Penicillium sp.* a. Parte superior del cultivo en medio sólido. b. Parte inferior del cultivo. c. Observación al microscopio compuesto, con lente objetivo 100x.

Las cepas de *Aspergillus sp.* en medio sólido presentaron crecimiento concéntrico, de textura polvosa y en color verde oscuro, en el revés del cultivo sólido se observó un color blanquecino, apreciable en las Figura 3.1-4a y 3.1-4b. Visto en el microscopio compuesto, como consta en la Figura 3.1-4c, se apreció hifas rectas, tabiculares, con conidioforas ubicadas en el ápice de las hifas, compuestas por una corona de fiálides a manera de cojinete que contienen conidias unicelulares, mostrando su particular apariencia globosa.

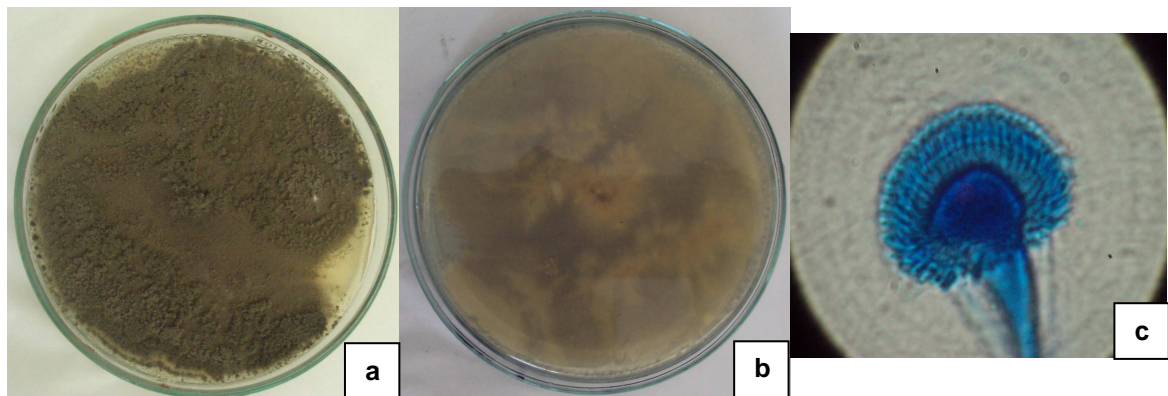


Figura 3.1-4. Imágenes Macro y Microscópicas de *Aspergillus sp.* a. Parte superior del cultivo en medio sólido. b. Parte inferior del cultivo. c. Observación al microscopio compuesto, con lente objetivo 100x.

3.2. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

En el recuento de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales, se seleccionaron los medios sólidos con crecimiento de colonias, pertenecientes a los órdenes de dilución entre 10^{-3} a 10^{-5} , obtenidas a las 72 h de incubación.

Los resultados de los recuentos de colonias fúngicas fueron empleados en el análisis de varianza (ADEVA) de la Tabla 3.2-1, que sirvió como un referente de la validez estadística del escogimiento de las unidades experimentales.

Tabla 3.2-1 ADEVA para las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales, en un gramo de suelo seco.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Orden de Dilución	1780610755555,54	2	890305377777,77	70,04	0,00
Error	76268800000,00	6	12711466666,67		
Total	1856879555555,55	8			

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

Se observa una significación menor al criterio base *alfa*, lo que indicó que no fueron homogéneos los órdenes de dilución seleccionados para los recuentos de UFC. Aplicando la Prueba de Tukey, que consta en la Tabla 3.2-2, se obtuvieron subgrupos estadísticamente homogéneos, cuya significación se evaluó respecto al criterio base *alfa*.

Tabla 3.2-2 Subconjuntos Homogéneos obtenidos con Tukey, para los promedios las UFC de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales.

Ord. Dilución	N	Subconjunto	
		2	1
1x10-3	3	220666,67	
1x10-4	3	843333,33	
1x10-5	3		3466666,67
Significación*		0,16	1,00

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

Tukey indica que el número más homogéneo de UFC se encontró en las diluciones correspondientes a los órdenes de 10^{-3} y 10^{-4} . Se determinó que el promedio de UFC para hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos totales es de 5×10^5 UFC.g⁻¹, aproximadamente.

En el caso de colonias fúngicas hidrocarbonoclasticas, se seleccionaron cultivos en medio sólido pertenecientes al orden de dilución de 10^{-4} y 10^{-5} . Su tiempo de incubación fue de 9 días. Con los datos del recuento de UFC se realizó el ADEVA de la Tabla 3.2-3.

Tabla 3.2-3. ADEVA para las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos hidrocarburolíticos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Ord. Dilución	516266666666,67	1	516266666666,67	6,92	0,06
Error	298466666666,67	4	746166666666,67		
Total	814733333333,34	5			

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

En este ADEVA, los resultados fueron homogéneos, ya que la significancia es mayor al criterio de *alfa*, que indica que el conteo de unidades formadoras de colonias fúngicas hidrocarbonoclasticas es estadísticamente representativo para la muestra de suelo. Se establece que existió una concentración promedio es de 7×10^5 UFC.g⁻¹ de suelo seco, aproximadamente.

3.3. Resultados y Análisis Estadístico del Índice de Actividad Emulsificante (E24).

Se obtuvieron porcentajes de emulsificación, presentes en la Tabla 3.3-1, de las cepas *Aspergillus sp.*, *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.* evaluados a las 24 h.

Tabla 3.3-1 Porcentajes de Emulsificación (%), obtenido a las 24h de cultivo, por Cepa y Medio de Cultivo.

Cepas Inoculadas	Repeticiones	Medios de Cultivo Inoculados	
		Salino	Sucrosa – Glucosa
<i>Aspergillus sp.</i>	r1	5,0	5,0
	r2	17,0	4,0
	r3	5,0	7,0
<i>Geotrichum sp.</i>	r1	0	4,0
	r2	0	4,0
	r3	0	4,0
<i>Penicillium sp.</i>	r1	0	20,0
	r2	0	40,0
	r3	0	40,0

En la Figura 3.3-1 se observa la capa de emulsión formada por *Penicillium sp.* en el medio líquido Sucrosa-Glucosa.

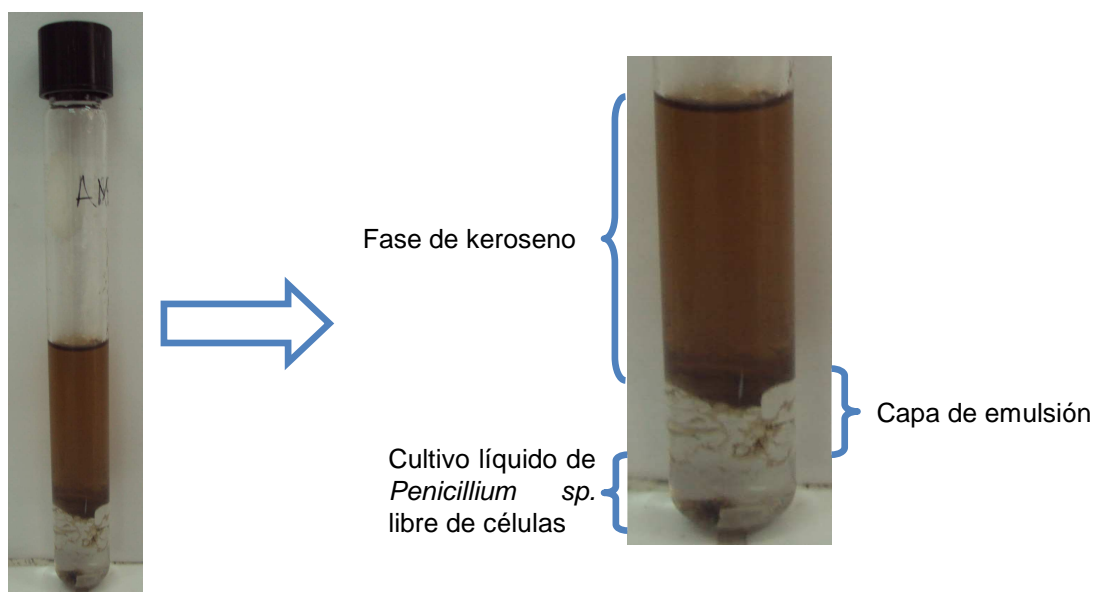


Figura 3.3-1. Emulsión formada y mantenida a las 24 h. por el cultivo de *Penicillium sp.* en fase contacto con el keroseno, en un tubo de ensayo de 20 cm de longitud.

La Tabla 3.3.-2 corresponde al análisis de varianza de los porcentajes de emulsificación, producido por el crecimiento de las cepas en el medio Glucosa – Sucrosa y permanente hacia las 24h. Se observó que la significancia es menor al criterio base, señalando que las cepas estudiadas no fueron iguales en la producción de agentes emulsificantes.

Tabla 3.3-2 ADEVA del Índice E_{24} producidos por los cultivos fúngico en Medio Glucosa – Sucrosa.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media Cuadrática	F	Significación*
Cepa – Cultivo	1646,22	2	823,11	18,20	0,00
Error	271,33	6	45,22		
Total	3738,00	8			

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

Se empleó la Prueba de Tukey, que agrupó las medias en subconjuntos homogéneos (Tabla 3.3-3). La prueba señaló que la cepa de

Penicillium sp. fue la cepa que presentó el mayor índice de emulsificación, con un promedio de 33.33%.

Tabla 3.3-3 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey, con los promedios de los resultados del Índice E24 producidos por los cultivos fúngico en Medio Glucosa – Sucrosa.

Cepa – Cultivo	N	Subconjunto	
		2	1
Medio Glucosa/Sucrosa - Cultivo de <i>Geotrichum sp.</i>	3	4,00	
Medio Glucosa/Sucrosa - Cultivo de <i>Aspergillus sp.</i>	3	5,33	
Medio Glucosa/Sucrosa - Cultivo de <i>Penicillium sp.</i>	3		33,33
Significación*		0,97	1,00

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

Con un porcentaje del 5.33%, le sigue la cepa de *Aspergillus sp.* y *Geotrichum sp.* en un porcentaje del 4%,

El análisis de varianza de la Tabla 3.3.-4, corresponde a los resultados de los índices de emulsificación producido por el crecimiento de las cepas fúngicas en Medio Salino. Se evidencia una significancia menor a *alfa*, criterio base, que indica que las cepas fúngicas presentaron diferentes índices de emulsificación.

Tabla 3.3-4 ADEVA del Índice E₂₄ producidos por los cultivos fúngico en Medio Salino.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Cepa – Cultivo	304,22	2	152,11	11,04	0,01
Error	82,67	6	13,78		
Total	539,00	8			

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

Aplicando la Prueba de Tukey, se obtuvieron subconjuntos homogéneos presentes en la Tabla 3.3-5. Reveló una mayor producción de emulsificantes con la cepa de *Aspergillus sp.*, con un promedio de emulsificación del 12.33%.

Tabla 3.3-5 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey, en base a los promedios de los resultados del Índice E_{24} obtenidos por los cultivos fúngico, en Medio Glucosa – Sucrosa.

Cepa – Cultivo	N	Subconjunto	
		2	1
Medio Salino - Cultivo de <i>Geotrichum</i>	3	0,00	
Medio Salino - Cultivo de <i>Penicillium</i>	3	0,00	
Medio Salino - Cultivo de <i>Aspergillus</i>	3		12,33
Significación		1,00	1,00

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

Las cepas de *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.*, no produjeron emulsificación en medio salino.

3.4. Resultados y Análisis Estadísticos de los microcosmos en agua.

En la Figura 3.4-1, se observan fotografías de las unidades experimentales al tiempo de finalización del ensayo.

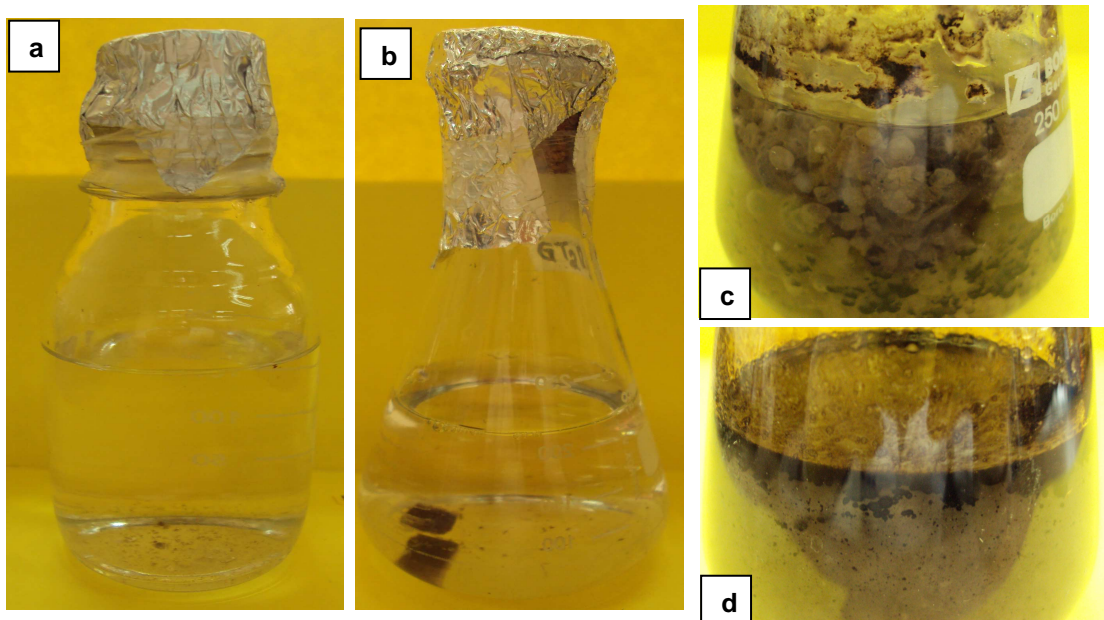


Figura 3.4-1. Unidades experimentales de los microcosmos líquidos. a. Agua de San Carlos contaminada, con inóculo de *Geotrichum*; b, Agua de San Carlos contaminada con inóculo de *Penicillium*, c, Medio PDB + 1% petróleo con inóculo de *Geotrichum*; d, Medio PDB + 1% petróleo con inóculo de *Penicillium*.

Para determinar el efecto de los inóculos fúngicos sobre la concentración de TPHs presentes en el agua contaminada, se realizó el análisis estadístico (Tabla 3.4-1) de los resultados de las concentraciones de TPHs (mg.L⁻¹) de los microcosmos con agua de San Carlos contaminada.

Tabla 3.4-1 ADEVA de las concentraciones de TPHs en microcosmos del agua de San Carlos contaminada, con las cepas fúngicas y el control.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Cepas y control	11965,87	2	5982,93	8,48	0,02
Error	4232,06	6	705,34		
Total	92862,31	8			

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

La significación menor a *alfa* que presentan los factores indica que fueron estadísticamente diferentes los tratamientos ensayados. Es decir que la variación en la concentración de TPHs en los microcosmos revela que la presencia de las cepas fúngicas jugó un papel importante. Se aplicó la prueba de Tukey, obteniendo subconjuntos homogéneos, presentados en la Tabla 3.4.-2.

Tabla 3.4-2 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey para los promedios de los resultados de las concentraciones en mg.L-1 de los tratamientos de los microcosmos en agua de San Carlos contaminada, con cepas fúngicas y control.

Interacción	Subconjunto	
	2	1
<i>Geotrichum</i> -agua pozo 23	45,6	
<i>Penicillium</i> - agua pozo 23	96,8	96,8
Control- agua pozo 23		134,5
Significación*	0,1	0,3

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

Con la prueba de Tukey se determinó que tuvieron efecto reductor, en la concentración de TPHs de los microcosmos con agua contaminada, las cepas de *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.*, respecto al control que presentó la más alta concentración. Estadísticamente, tuvieron igual efecto reductor las dos cepas aisladas en el laboratorio, en la concentración de TPHs.

Los valores de porcentajes de remoción correspondientes son los siguientes:

Geotrichum sp. = 66,14%

Penicillium sp. = 28,04%

La Figura 3.4-2 evidencia la diferencia de concentraciones de TPHs empleando las dos cepas fúngicas, respecto al control sin inóculo.

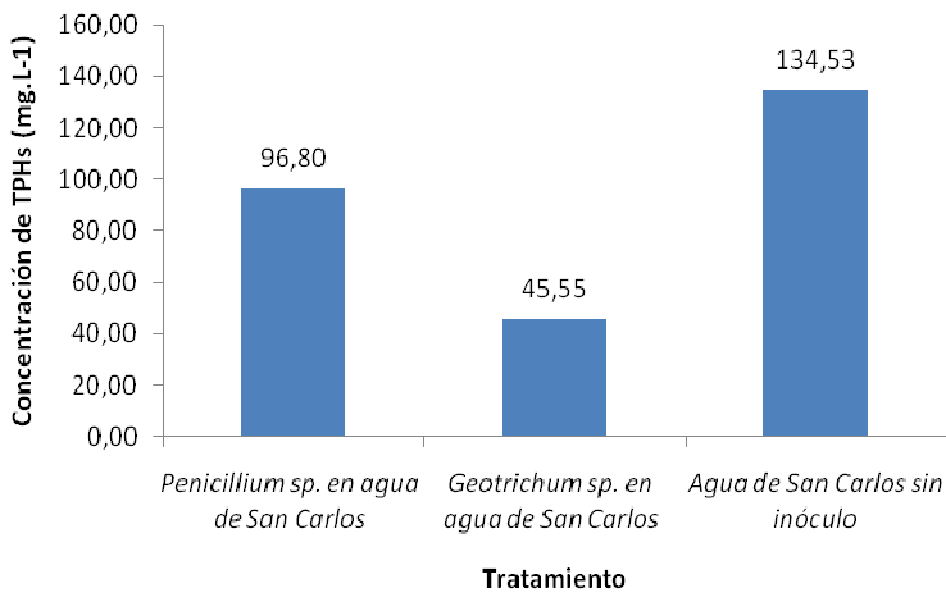


Figura 3.4-2 Promedios de las concentraciones en los microcosmos en agua de San Carlos contaminada con TPHs.

En la Tabla 3.4-3, se presenta el ADEVA de las concentraciones, en mg.L^{-1} , de TPHs del ensayo en medio PDB + 1% de petróleo, con los inóculos fúngicos y el control.

Tabla 3.4-3 ADEVA de los tratamientos de medio PDB + 1% de petróleo con inóculos fúngicos y control.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Cepas y control	338052,91	2	169026,46	84,58	0,00
Error	11991,05	6	1998,50		
Total	1000991,72	8			

*Basado en un criterio de $\alpha=0.05$

En este análisis de varianza la significancia del factor *Cepas y control* fue menor a *alfa*, demostrando que los tratamientos, estadísticamente, no fueron iguales. Se realizó la Prueba de Tukey (Tabla 3.4.-4)

Tabla 3.4-4 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey, de las concentraciones promedio de TPHs (mg.L^{-1}) de los microcosmos del medio PDB + 1% de petróleo.

Interacción	Subconjunto	
	2	1
<i>Geotrichum</i> -medio PDB +1% petróleo	93,15	
<i>Penicillium</i> - medio PDB +1% petróleo	174,72	
Control- medio PDB +1% petróleo		539,0
Significación*	0,14	1,0

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Los resultados de la prueba de subconjuntos homogéneos de Tukey indican que el Control presentó una concentración más elevada de TPHs. Los grupos aplicados los inóculos de *Geotrichum* y *Penicillium*, presentaron concentraciones menores de TPHs. Esto indica que las cepas fúngicas removieron TPHs en los microcosmos. Estadísticamente, las cepas tienen igual efecto reductor, ya que su significación es mayor a *alfa*.

En base a los promedios se calcularon los porcentajes de remoción de cada una de las cepas inoculadas, los que se muestran a continuación:

Geotrichum sp.= 67,58%

Penicillium sp.= 82,72%

En la Figura 3.4-3 se representan las concentraciones promedio de los tratamientos ensayados.

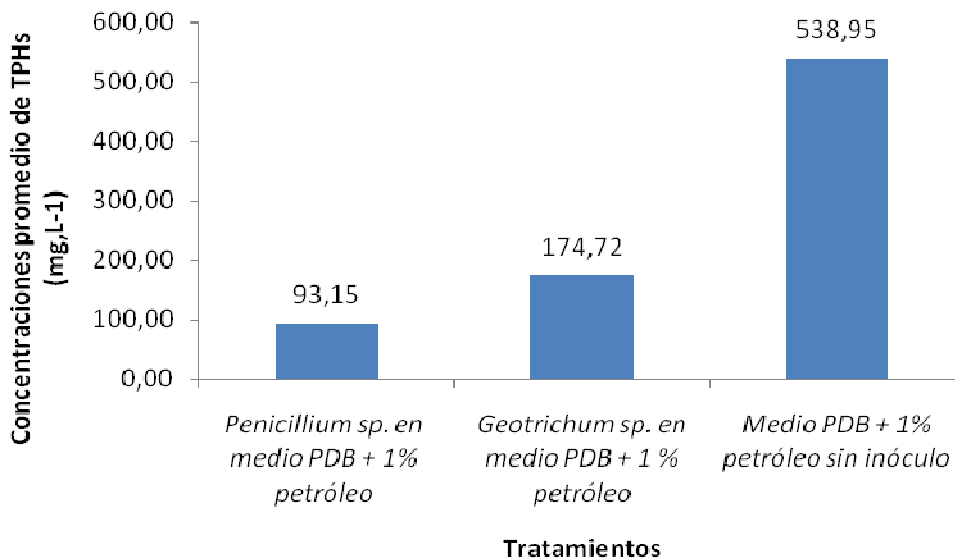


Figura 3.4-3 Promedios de las concentraciones en los microcosmos en agua de San Carlos contaminados con TPHs.

3.5. Evaluación del antagonismo entre colonias fúngicas seleccionadas.

Mediante la formación de grupos para la evaluación de antagonismo entre *Aspergillus sp.*, *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.*, descrito en la metodología, se encontró que las cepas fueron mutuamente excluyentes. Las cepas dispuestas en pares de confrontación exhibían crecimientos dominantes, si eran masivos (Figura 3.5-1), e inhibían el crecimiento de las porciones inoculadas con las cepas objetos de análisis. Ambas cepas cotejadas aprovechaban los espacios libres para extenderse, sin llegar a trastocar el cultivo vecino.

Las fotografías de la Figura 3.5-1, vistas en aumento, revelan inhibición sobre las áreas de contacto.

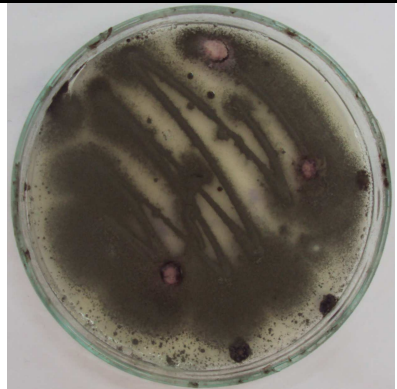
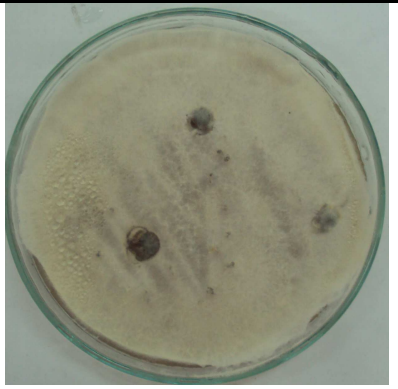
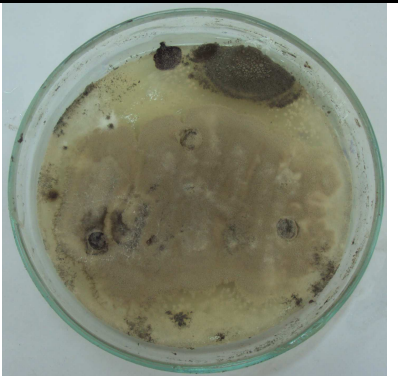
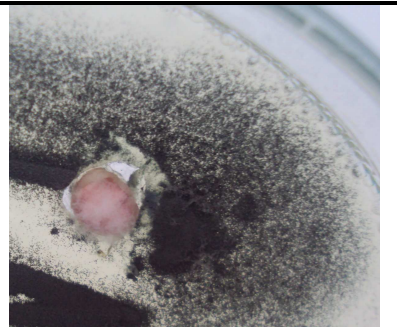
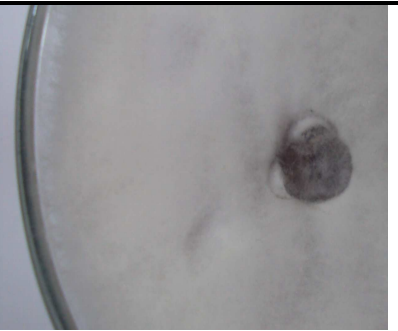
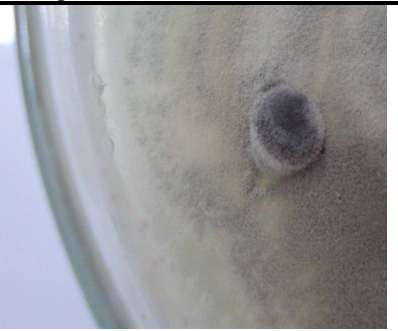
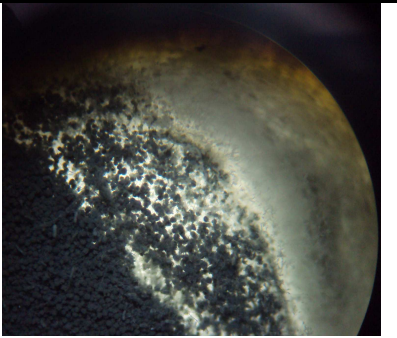

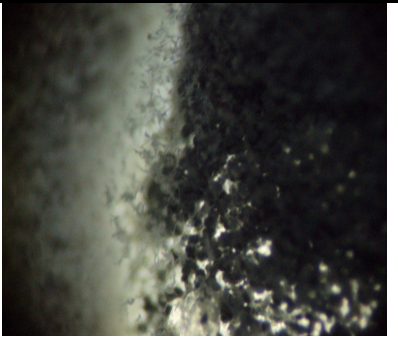

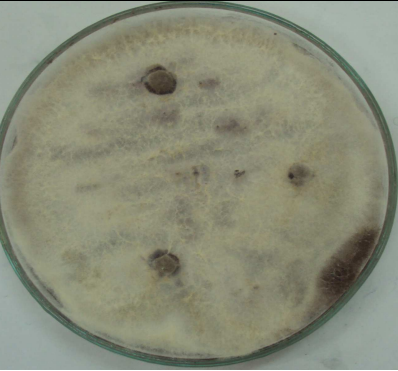
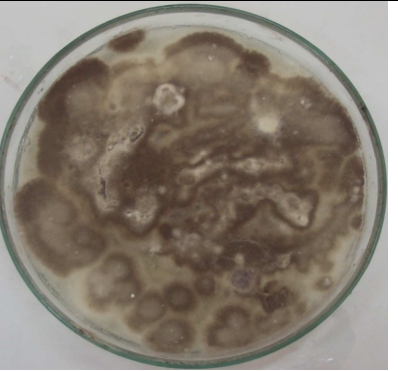
Cultivo masivo de <i>Aspergillus sp.</i> frente a <i>Geotrichum sp.</i>	Cultivo masivo de <i>Geotrichum sp.</i> frente a <i>Aspergillus sp.</i>	Cultivo masivo de <i>Penicillium sp.</i> frente a <i>Aspergillus sp.</i>
		
Observación aumentada del área de evaluación antagónica		
		
Observación a través del estereomicroscopio con lente objetivo de 40X.		
		
Cultivo masivo de <i>Aspergillus sp.</i> frente a <i>Penicillium sp.</i>	Cultivo masivo de <i>Geotrichum sp.</i> frente a <i>Penicillium sp.</i>	Cultivo masivo de <i>Penicillium sp.</i> frente a <i>Geotrichum sp.</i>
		

Figura 3.5-1. Cultivos masivos inoculados con porciones de las cepas a ser probadas.

3.6.Resultados y Análisis Estadístico para microcosmos en suelo

La lectura inicial de la concentración de TPHs fue de 4 435 mg por kg de suelo seco. A continuación, se evaluó la variación de la concentración de TPHs al transcurso de los días de incubación. Con esta finalidad se realizó el análisis de varianza (ADEVA), Tabla 3.6-1, de las concentraciones de TPHs obtenidas con los tres inóculos fúngicos y suelo solo, para los días de incubación 9, 15 y 25.

Tabla 3.6-1 ADEVA de las concentraciones de TPHs, en mg.kg⁻¹, de las unidades experimentales.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Días	25237696,36	2	12618848,181	6,24	0,00
Inóculos	3983266,83	7	569038,119	0,28	0,96
Días* Inóculos	45129636,75	14	3223545,482	1,59	0,12
Error	97057899,33	48	2022039,569		
Total	1732043834,00	72			

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

La significación menor a *alfa* en el factor *Días*, indica que los tratamientos son estadísticamente distintos entre sí respecto a los tres días de medición de las concentraciones de TPHs. En tanto que para el factor *Inóculos* se observa una significancia mayor, que representa una acción igual de las cepas fúngicas en la reducción de la concentración del contaminante en los microcosmos de suelo.

Cabe destacar que el efecto del racionamiento de nutrientes no pudo ser evaluado, estadísticamente, en forma particular; más bien, estuvo asociado con los otros factores de estudio, como con la acción de los inóculos fúngicos y los días de evaluación. Este ensayo sólo considera la presencia o ausencia de nutrientes suministrados.

Para evaluar la relevancia del factor *Días* en los tratamientos, se realizó el análisis estadístico por cepas respecto a los tiempos establecidos. En

primera instancia, se obtuvo el ADEVA (Tabla 3.6-2) correspondiente a los resultados de las concentraciones de TPHs con respecto a los días de seguimiento, para el suelo sin los inóculos fúngicos, con y sin la adición de nutrientes.

Tabla 3.6-2 ADEVA de las concentraciones de TPHs en mg.kg-1 para los microcosmos del suelo con y sin nutrientes.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Días	6504410,33	2	3252205,17	1,41	0,28
Días * Nutrientes	10963354,33	2	5481677,17	2,38	0,14
Error	27675025,33	12	2306252,11		
Total	45251368,00	17			

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Debido a que la significación de los factores en estudio fue mayor a *alfa*, se reconoce que los tratamientos son estadísticamente iguales. Esto indica que no influyó la adición de nutrientes en la reducción de la concentración de TPHs de los microcosmos, respecto a los días de evaluación.

A continuación, en la Tabla 3.6-3 se presenta el ADEVA de los resultados obtenidos únicamente para *Aspergillus*, con y sin nutrientes, *versus* al suelo solo.

Tabla 3.6-3 ADEVA de los resultados de las concentraciones de los microcosmos inoculados con *Aspergillus* sp. y los microcosmos de suelo solo, con y sin nutrientes.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	GL	Media cuadrática	F	Significación
Días	18122477,72	2	9061238,86	4,52	0,02
Días*Nutrientes	30972040,50	6	5162006,75	2,58	0,05
Error	48086402,67	24	2003600,11		
Total	98554702,31	35			

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

La significación obtenida en este ADEVA, igual a *alfa*, indica que no existió diferencias en las concentraciones de TPHs en los días de estudio debido al efecto de los nutrientes por la acción de la cepa de *Aspergillus* sp. La

prueba de Tukey (Tabla 3.6-4) arrojó los siguientes subconjuntos homogéneos, permitiendo distinguir la variación de las concentraciones de TPHs en los días de evaluación.

Tabla 3.6-4 Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey para los promedios de las concentraciones de los microcosmos inoculados con *Aspergillus sp.* y de los microcosmos de suelo solo. Las concentraciones de TPHs están expresadas en mg.kg-1.

Días	N	Subconjunto	
		2	1
día25	12	3817,17	
día15	12	5152,00	5152,00
día9	12		5448,42
Significación*		0,07	0,87

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

En el Subconjunto 1 constan los promedios de las concentraciones a los 9 días de transcurso del experimento, siendo éstas las más altas. Hacia el día 25 alcanzó la reducción de las concentraciones de TPHs.

Empleando el mismo criterio, se analizó los resultados de los microcosmos inoculados con cepas de *Geotrichum sp.*, con y sin nutrientes, respecto al suelo solo. El ADEVA correspondiente consta en el Tabla 3.6-5.

Tabla 3.6-5 ADEVA de los resultados de las concentraciones de los microcosmos inoculados con *Geotrichum sp.* y de los microcosmos de suelo solo, con y sin nutrientes.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Días	10140263,17	2	5070131,58	2,03	0,15
Días * Nutrientes	17712499,28	6	2952083,21	1,18	0,35
Error	59898544,00	24	2495772,67		
Total	88231414,75	35			

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Todos los factores de estudio exhibieron una significancia mayor a *alfa*, marcando igualdad estadística de las concentraciones de TPHs en los microcosmos con *Geotrichum sp.* y suelo sin inóculo fúngico, para los días evaluados.

En el análisis correspondiente a *Penicillium sp.* con y sin nutrientes, respecto al suelo solo (Tabla 3.6-6), se observó significancia mayor a *alfa*, en los factores de estudio, indicando igualdad estadística de la concentración de TPHs, respecto a la aplicación de cepas *Penicillium sp.* y suelo sin inóculo fúngico.

Tabla 3.6-6 ADEVA de los resultados de las concentraciones en mg.kg⁻¹ de los microcosmos inoculados con *Penicillium sp.* y de de los microcosmos de suelo solo, con y sin nutrientes para ambos casos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	GL	Media cuadrática	F	Significación
Días	10561811,72	2	5280905,86	2,85	0,08
Días * Nutrientes	17793770,06	6	2965628,34	1,60	0,19
Error	44423003,33	24	1850958,47		
Total	73985529,56	35			

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Se evaluó estadísticamente, en conjunto, las concentraciones de TPHs de los microcosmos con la acción de las tres cepas de hongos filamentosos aislados, con y sin adición de nutrientes, para determinar si presentaron diferencias significativas debido al uso de una u otra cepa. La Tabla 3.6-7 presenta el ADEVA de este referente.

Tabla 3.6-7 ADEVA de los resultados de las concentraciones en mg.kg⁻¹ de los microcosmos inoculados con *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Geotrichum sp.* en suelo, con y sin nutrientes.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Inóculos*Nutrientes	3868307,93	5	773661,60	0,40	0,85
Días	18947436,59	2	9473718,30	4,92	0,01
Inóculos*Nutrientes*Días	33952131,85	10	3395213,20	1,76	0,10
Error	69382874,00	36	1927302,06		
Total	126150750,37	53			

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Se observa una significación mayor a *alfa* en el factor *Inóculos*Nutrientes*, indicando que frente a la aplicación de cualquiera de las cepa aisladas en el laboratorio no existió diferencia de su acción reductora de TPHs. El factor *Días* indica que si hubo diferencia estadística respecto al

tiempo de incubación de los hongos seleccionados en los microcosmos. Tukey, Tabla 3.6-8, asocia concentraciones estadísticamente iguales en subconjuntos homogéneos.

Tabla 3.6-8 Subconjuntos Homogéneos obtenidos por la Prueba de Tukey para los promedios de las concentraciones en mg.kg^{-1} de los microcosmos inoculados con *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Geotrichum sp.*, en suelo, con y sin nutrientes.

Días	N	Subconjunto	
		2	1
día25	18	3813,00	
día15	18		5045,11
día9	18		5092,67
Significación		1,00	1,00

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Las menores concentraciones de TPHs se obtuvieron hacia el día 25 de incubación de los microcosmos. Los perfiles de reducción de TPHs se observan en la Figura 3.6-1.

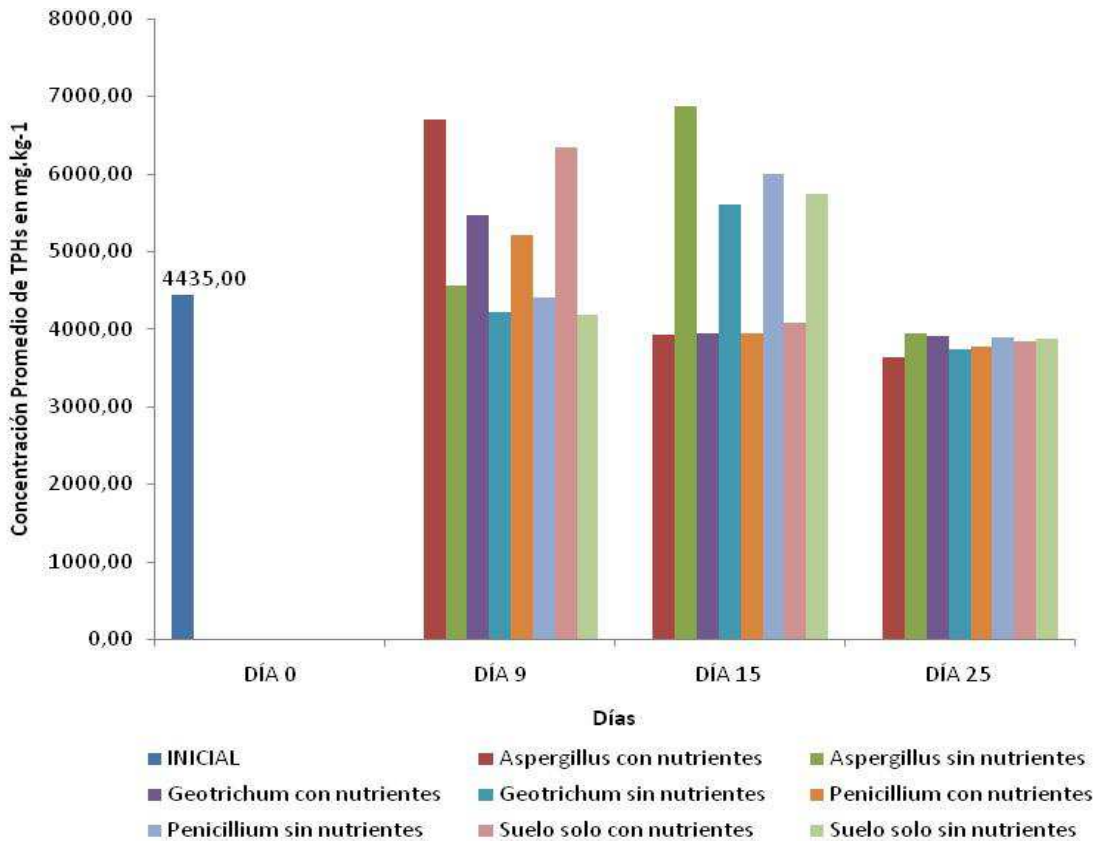


Figura 3.6-1. Promedio de las concentraciones de TPHs, en mg.Kg^{-1} , en microcosmos de suelo para las cepas fúngicas seleccionadas, con y sin aporte de nutrientes, para los días de evaluación.

Mediante el análisis estadístico se determinó que no existen variaciones en las concentraciones de TPHs en los microcosmos de suelo solo o por la acción de las cepas fúngicas aisladas. El factor de importancia en la reducción del contaminante está estipulado por el tiempo de incubación de los microcosmos. Considerando las lecturas de las concentraciones de TPHs del día 9 como punto de inicio, los porcentajes de reducción para los tratamientos son los siguientes:

<i>Aspergillus sp.</i> con nutrientes: 45,78%	<i>Aspergillus sp.</i> sin nutrientes: 13,69%
<i>Geotrichum sp.</i> con nutrientes: 28,55%	<i>Geotrichum sp.</i> sin nutrientes; 11,22%
<i>Penicillium sp.</i> con nutrientes: 27,46%	<i>Penicillium sp.</i> sin nutrientes: 11,83%
Suelo solo con nutrientes: 39,58%	Suelo solo sin nutrientes: 7,68%

Los porcentajes de remoción alcanzados hacia el día 25 de evaluación fueron mayores con la adición de nutrientes a los microcosmos. El mayor porcentaje de remoción se alcanzó en microcosmos inoculados con cepas de *Aspergillus sp.*

3.7. Determinación del CO₂ libre en microcosmos de suelo, por el método de titulación.

A partir de los resultados de CO₂ liberados por los microcosmos, durante los 25 días de incubación, se realizó el análisis estadístico correspondiente, cuyo ADEVA consta en el Tabla 3.7-1.

Tabla 3.7-1 ADEVA de los resultados de los valores de CO₂, en mg, emitidos por los microcosmos inoculados con *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.* y suelo solo, con y sin nutrientes.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	GL	Media cuadrática	F	Significación*
Día	3378,99	12	281,58	7,33	0,00
Inóculo	731,16	7	104,45	2,72	0,01
Día * Inóculo	3213,54	84	38,26	1,00	0,50
Error	7986,68	208	38,40		
Total	15310,37	311			

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Este análisis presenta una significancia menor al criterio base de *alfa*, para los factores *Día* e *Inóculo*, que indica que hubo diferencias en la concentración de mg de CO₂ por día, así como de acuerdo a la cepa empleada o el suelo solo.

Empleando la prueba de Tukey se obtuvo subconjuntos homogéneos que permitieron verificar las diferencias estadísticas. Con el factor *Días* se obtuvo los subconjuntos homogéneos presentes en el Tabla 3.7-2.

Tabla 3.7-2 Subconjuntos homogéneos obtenidos con la Prueba de Tukey para el factor *Días*, en base a los promedios de los valores de CO₂ emitidos por los tratamientos, durante los 13 días de evaluación.

Días	N	Subconjunto		
		3	2	1
día1	24	3,15		
día8	24	3,58		
día12	24	4,10		
día3	24	4,64		
día5	24	4,93		
día13	24	5,18		
día4	24	5,22		
día2	24	7,66	7,66	
día11	24	8,05	8,05	
día7	24	8,18	8,18	
día10	24	8,22	8,21	
día6	24		12,60	12,60
día9	24			14,34
Significación		0,2	0,30	1,00

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

En base a la secuencia cronológica de eventos del experimento, se reordenó la Tabla 3.7-2 de subconjuntos homogéneos de Tukey, que permitió obtener la Tabla 3.7-3.

Tabla 3.7-3. Secuencia cronológica y promedios de concentración de CO₂ libre en los microcosmos en suelo, a partir de la prueba de Tukey.

Días	Subconjunto			Observaciones
	3	2	1	
día1	3,15			Inicio del experimento
día2	7,66	7,66		Valores máximos titulados de CO ₂ , desde inicio del experimento
día3	4,64			Disminución del porcentaje de humedad en microcosmos
día4	5,22			Determinación de humedad / Adición de agua estéril
día5	4,93			Estabilización del contenido de humedad
día6		12,60	12,60	Valores máximos titulados de CO ₂ , desde la adición de agua estéril. Descenso del porcentaje óptimo de humedad.
día7	8,18	8,18		Determinación de humedad / Adición de agua estéril
día8	3,58			Estabilización del contenido de humedad
día9			14,34	Valores máximos titulados de CO ₂ , desde la adición de agua estéril
día10	8,22	8,21		Determinación de humedad / Porcentajes normales de humedad en los microcosmos.
día11	8,05	8,05		Determinación de humedad / Adición de agua estéril
día12	4,10			Exceso de humedad en los microcosmos.
día13	5,18			Estabilización del contenido de humedad
Significación	0,2	0,30	1,00	

Se observan tres subconjuntos homogéneos, donde los mayores valores de CO₂ obtenidos fueron, en orden ascendente, para los días: 2, 11, 7 y 10 y finalmente los días 6 y 9, que coinciden con días posteriores a los de suministro de agua estéril para mantener el porcentaje de humedad de los microcosmos. Los siguientes días presentaron emisiones estadísticamente iguales entre sí. El día 9 es el día en el que se registra un máximo valor de CO₂ emitido por los microcosmos, que demuestra que las cepas tuvieron un desarrollo metabólico mayor hacia este día de titulación y el último valor del

ensayo que permitió dar seguimiento a la actividad biológica de los microorganismos presentes en el suelo.

Se aplicó Tukey para el factor *Inóculo*, como se reporta en el Tabla 3.7-4, en lo que se determinó dos subconjuntos homogéneos. Se estableció que los mayores índices de respiración o actividad biológica se obtuvieron con cepas de *Penicillium sp.*

Tabla 3.7-4 Subconjuntos homogéneos obtenidos con la Prueba de Tukey para el factor *Inóculo*, en base a los promedios de los valores de CO₂ emitidos por los tratamientos, durante los 13 días de evaluación del ensayo.

Inóculo	Subconjunto	
	2	1
<i>Geotrichum</i> con nutrientes	5,24	
<i>Aspergillus</i> sin nutrientes	5,49	5,49
Suelo solo con nutrientes	5,81	5,81
Suelo solo sin nutrientes	5,88	5,88
<i>Geotrichum</i> sin nutrientes	6,52	6,52
<i>Aspergillus</i> con nutrientes	8,09	8,09
<i>Penicillium</i> sin nutrientes	8,69	8,69
<i>Penicillium</i> con nutrientes		9,55
Significación*	0,22	0,08

*Basado en un criterio de $\alpha=0,05$

Los otros grupos presentaron producciones menores de CO₂ y estadísticamente iguales entre sí. La evolución de los microcosmos posteriormente se determinó, con la evaluación de las concentraciones de TPHs en los microcosmos.

Considerando que en el día 9 se registraron los valores máximos, en promedio, de emisión de CO₂ para los cultivos de los microcosmos, se relacionó estos valores con las lecturas de las concentraciones de TPHs (mg.kg⁻¹), representados en la Figura 3.7-1, a fin de establecer la correspondencia del parámetro de actividad biológica con respecto al consumo

del contaminante por parte de las cepas fúngicas inoculadas en los microcosmos.

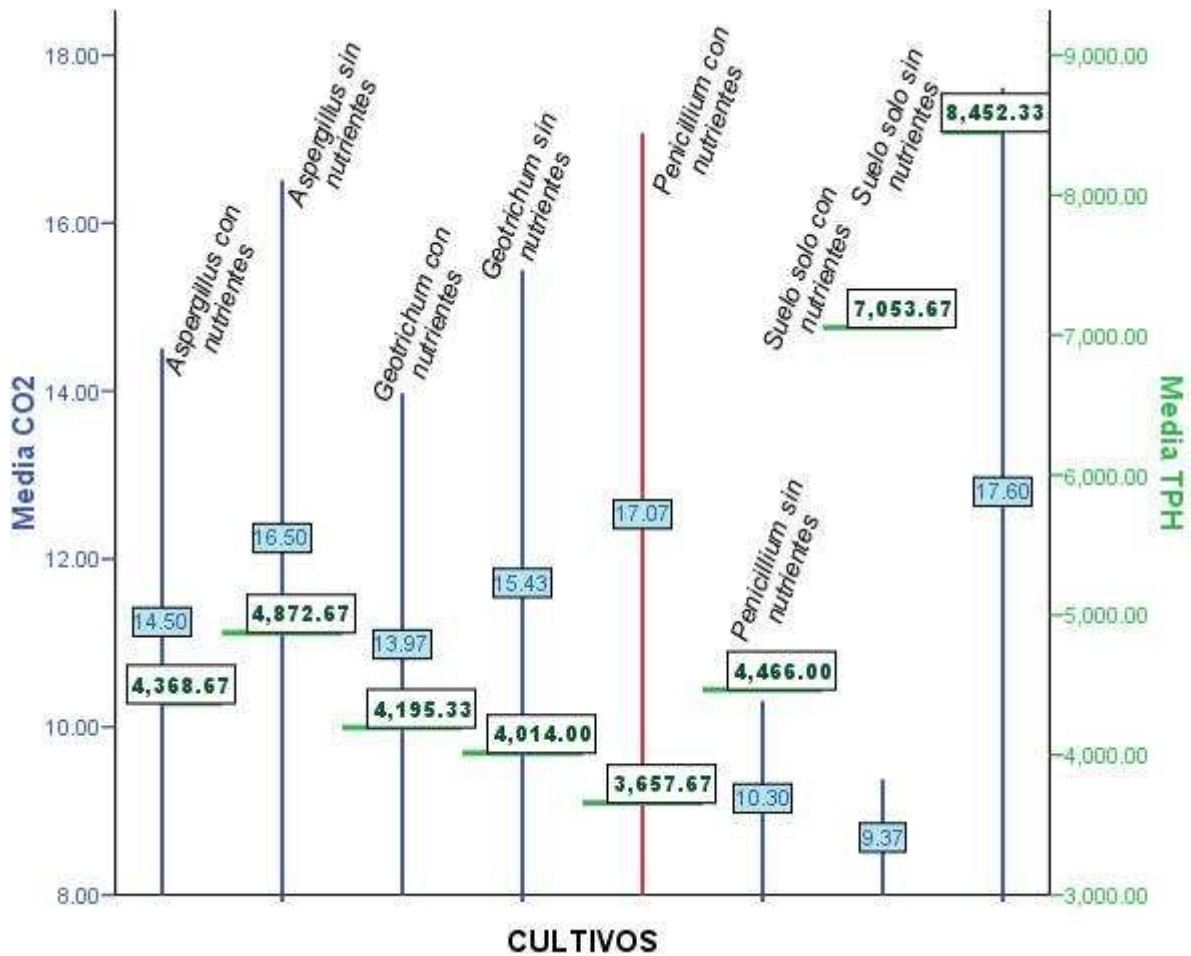


Figura 3.7-1 Relación de la concentración promedio de TPHs (mg.kg⁻¹) versus la concentración promedio de CO₂ (mg.kg⁻¹) de los cultivos de los microcosmos, en el día 9 de evaluación.

Se identifica que el valor máximo de emisión de CO₂ y la mínima concentración de TPHs fue conseguida en los microcosmos de *Penicillium* con nutrientes, considerándose a este como el mejor tratamiento. La interpretación general de la gráfica indica que los microcosmos con los inóculos fúngicos y con aporte de nutrientes son favorecidos para ejecutar una mayor reducción de de TPHs y mejorar su actividad biológica.

4. CAPÍTULO CUARTO: DISCUSIÓN

4.1. Selección de colonias fúngicas

Dentro de las especies de hongos filamentosos, con capacidad hidrocarbonoclástica, se aislaron los géneros *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, y *Paecilomyces sp.* Estos hongos filamentosos son habitantes comunes de la rizósfera, pero gracias a su tolerancia a varios compuestos de los hidrocarburos de petróleo, son aislados de las muestras de suelo del sector en los medios selectivos probados. Como lo indican Saraswathy & Hallberg (2002), los medios salinos suplementados con petróleo permitieron el desarrollo de colonias fúngicas de *Penicillium*, tomando el contaminante como fuente de carbono, al igual que los estudios de remediación ejecutado por Valenzuela *et al.* (2006), quienes aislaron gran número de colonias del género *Penicillium*, así como con las colonias aisladas por Ifeanychukwu, Haynes y Wallis (2005) que fueron *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

El género *Geotrichum sp.* se encontró de forma abundante en los medios enriquecidos con petróleo, pese a que no existen muchos documentos de su uso, pero una muestra de este caso de esto constituye el estudio de Zheng & Obbard (2003) y en el que no se ha reportado fitotoxicidad específica de la cepa.

Como indica Ifeanychukwu, Haynes y Wallis (2005), las colonias fúngicas aisladas en este tipo de métodos de selección permiten adquirir microorganismos adaptados a condiciones que restringen el crecimiento de poblaciones oportunistas.

4.2. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Mediante el conteo de UFC Totales en la muestra de suelo se establece el número de hongos viables que, aproximadamente, están presentes en el orden de 1×10^5 UFC por gramos de suelo seco; en trabajos de bioremediación se acepta que los inóculos fúngicos estén en un orden de 10^4 a 10^8 de conidias por mL de cultivo (Potin *et al.*, 2004; Stoilova *et al.*, 2008), por lo que en tratamientos *in situ* el número de hongos mesófilos heterótrofos aeróbicos encontrados por este estudio está dentro del rango aceptado.

Siguiendo la línea de investigación llevada a cabo por Solórzano *et al.* (2002) y Viñas (2005), para el trabajo en microcosmos, se empleó una concentración de 10^7 conidias por gramo de suelo seco, que asegure un mayor número de microorganismos aislados y seleccionados en el laboratorio con un mayor potencial de adaptación y sobrevivencia frente al contaminante. Trabajos como los efectuados por Potin *et al.* (2004_b), inclusive, no solo emplean inóculos de esporas, sino fracciones de micelio, obteniendo porcentajes de remoción promedio de 20%, con géneros fúngicos: *Mucor*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Sphaeropsis* y *Trichoderma*, hacia las 4 semanas de evaluación de las concentraciones de TPHs.

4.3. Índice de Actividad Emulsificante (E24).

Los resultados obtenidos de Actividad Emulsificante indican que la mayor producción de agentes emulsificantes está dada por la cepa de *Penicillium sp.*, como lo reportan Luna *et al.* (2005).

Aplicando la técnica reportada por Paraszkiwicz *et al.* (2002), a partir de los trabajos de Cameron *et al.* (1988), se tiene una máxima recuperación del agente tensoactivo en cultivos líquidos. En forma similar a este estudio, se confirmó que la presencia de carbono de fácil asimilación celular, como el caso de la glucosa, determina una mayor producción de surfactantes. En el estudio

de Luna *et al.* (2005), que evaluaron los medios adecuados para obtener una mayor cantidad de biosurfactantes por la cepas aisladas, encontraron que un medio que contenía polipeptona y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se recobró un 60% el biosurfactante producido por *Penicillium sp.* y permitió una remoción mayor en 3 veces de fenantreno, respecto a controles sin optimizar. Esto indica que una fuente adicional de carbono biodisponible mejora el metabolismo del hongo filamentoso.

En este ensayo el mayor valor registrado del índice de emulsificación fue de 33.3% con cepas de *Penicillium* en cultivo de glucosa/sucrosa, con remoción de células del cultivo líquido por precipitación de las mismas. Este porcentaje es coincidente con el valor obtenido por Cooper y Goldenberg (1987), que ensayaron con cultivos libres de células y con cultivos celulares, en los cuales los resultados de producción de emulsión fueron, aproximadamente, del 30%. Además probaron que la presencia de células no altera la acción tensioactiva del biosurfactante producido por las cepas, pero el uso de solventes para la extracción del tensoactivo, como cloroformo, alteró la acción del surfactante.

Los surfactantes anfipáticos han evidenciado ser componentes potenciadores en procesos de biorremoción y cuyo uso ha permitido la obtención de resultados óptimos (Riser-Roberts, 1998). El uso de estos agentes, de tipo sintético, han favorecido trabajos de biodegradación de fracciones como BTEX, naftalenos, pirenos, hidrocarburos saturados e insaturados, e inclusive asfaltenos. El experimento de Lemos *et al.* (2002) con cepas de *Aspergillus versicolor*, con biosurfactantes sintéticos como los ramnolípidos, presentaron a los 30 días de desarrollo de experimentos en microcosmos con suelo niveles de reducción del 40%, aproximadamente, de la concentración de TPHs. Para el presente estudio, el manejo de condiciones como humedad (del 60%), suministro de nutrientes como fósforo y nitrógeno (100C : 10 N : 1P), permitieron conseguir, sin la adición de surfactantes sintéticos, porcentajes de remoción del 45% hacia los 25 días con las cepas de

Aspergillus sp., lo que invita a sugerir el empleo de los hongos filamentosos obtenidos en este estudio para futuros trabajos de biorremediación. En el caso de las cepas de *Aspergillus sp.*, el índice de emulsificación obtenido fue de 12.33%, en medio salino y sin emulsión para cepas de *Geotrichum sp.*, tras las 24h de tiempo de este ensayo.

El Índice de Actividad Emulsificante (E_{24}) estudiado para hongos filamentosos, es un índice de correlación en la producción de ramnolípidos. Lo mismo que sucede con otros microorganismos productores de este tipo de glicolípidos. Son de mayor preferencia en las aplicaciones biotecnológicas de biorremediación, pues los biosurfactantes permiten la desorción del contaminante de la matriz sólida y consecuentemente facilitan su movilización y remoción, favorecen su bioabsorción y consumo por parte de las células fúngicas (Luna, Esparza, Salazar, & Rodríguez, 2005).

4.4.Reducción de TPHs en microcosmos líquidos y en suelo.

En los tratamientos de microcosmos líquidos se evaluó la efectividad de reducción de hidrocarburos aplicando las cepas de *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.* Los microcosmos con agua del pozo 23 del sector de San Carlos, presentaron porcentajes de remoción estadísticamente similares entre sí, del 66.14% para *Geotrichum sp.* y 28.04% para *Penicillium sp.*, y el crecimiento de biomasa fue limitado. Se cree que la acción reductora de las cepas fúngicas en estos microcosmos es debido a la *bioabsorción* de TPHs por los micelios de los hongos, y que luego éstos son ingeridos y utilizados como fuente de carbono. Probablemente el consumo resultante de TPHs se deba al producto de la biodegradación o de inclusiones citoplasmáticas de las moléculas del contaminante que lograron captar del medio de cultivo (Riser-Roberts, 1998).

Como lo describe Riser-Roberts (1998), las moléculas de la sustancia xenobiótica son captadas y entran en contacto cercano a enzimas de membranas, desencadenando otras reacciones que permiten la transformación de las moléculas, con esto los hidrocarburos pasan a formar componentes orgánicos de las células con limitadas modificaciones químicas.

En el ensayo con microcosmos líquidos, el medio comercial PDB + 1% de petróleo, se produjo abundante incremento de biomasa en el medio, debido a la presencia de nutrientes del medio y fuentes adicionales de carbono propios del carbohidrato base del medio comercial utilizado: papa. Se consiguió la reducción de TPHs en el medio, de 82.72% para *Geotrichum sp* y 67.58% para *Penicillium sp*, mientras que los controles abióticos mantuvieron concentraciones elevadas de TPHs. Estos resultados son similares a los obtenidos por Luna *et al.* (2005) y Camargo-de-Marais, *et al.* (2003), quienes emplearon cepas aisladas consiguiendo una reducción de hasta el 80% de TPHs en microcosmos líquido y del 45% en microcosmos en suelo.

Las pruebas de microcosmos se efectuaron con las cepas fúngicas filamentosas, en forma individual, para evaluar su capacidad hidrocarbonoclástica, tanto en medios líquidos o sólidos, como lo reportan diversos estudios. Un ejemplo de ello, es el trabajo realizado por Saraswathy & Hallberg (2002), quienes emplearon cepas de *Trichoderma harzianum*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium funiculosum* and *Penicillium terrestre*, en cultivos líquidos con pireno como contaminante, consiguiendo porcentajes de remoción de hasta el 75%. El trabajo de Pérez *et al.* (2010) reporta ensayos con cepas de *Aspergillus niger*, *Penicillium glabrum*, y *Cladosporium cladosporioides*, aisladas de suelos contaminados, inoculadas en reactores de lote con suelo contaminado, donde se alcanza porcentajes de remoción de TPHs del 78.5%.

Mediante la ejecución de microcosmos se consigue obtener un referente del comportamiento de los microorganismos frente a su uso con los hidrocarburos, en la matriz propia que recibe la contaminación, permitiendo aplicar los tratamientos propuestos en sus propias condiciones físico-químicas. Cabe indicar que en este trabajo se empleó crudo de petróleo, sin embargo muchos de los ensayos reportados manejan una determinada fracción de la amplia gama de los TPHs y aún no se comprende totalmente cómo actúan con múltiples sustratos (Riser-Roberts, 1998; Bennet, *et al.*, 2000). Se han venido realizando estudios de carácter bioquímico, para entender en mejor manera la función metabólica de las colonias sobre los contaminantes (Saraswathy & Hallberg, 2002; Prenafeta *et al.*, 2006).

En los estudios realizados en biopilas, por Vásquez *et al.* (2010) se inició con la evaluación de antagonismo de las cepas seleccionadas de bacterias y hongos para su posterior introducción en las biopilas en concentraciones de 10^6 esporas/mL, a partir de caldos maltosados, mencionados previamente por Luna *et al.* (2005). Los inóculos, conjuntos de bacterias y hongos, consiguieron porcentajes de remoción de fracciones de TPHs, en biopilas, en un promedio del 74% al 95% hacia los 40 y 75 días de evaluación. Esto se contrasta con los resultados conseguidos a las 3 semanas de incubación de este estudio, con porcentajes de reducción de 20% a 80% en medios líquidos, por cepas aisladas de *Geotrichum* y *Penicillium*, comprobando sus facultades reductivas de TPHs en medios líquidos.

Los trabajos realizados con microcosmos en medios líquidos presentan grandes ventajas frente a aquellos establecidos en suelo, ya que permite una mezcla más homogénea entre las células de los microorganismos degradadores, así lo menciona Riser-Roberts (1998) y manifiesta que mediante mecanismos físicos de aireación, en este caso el sistema continuo de agitación, favorece a que ocurra la degradación aeró bicamente.

En lo referente a la aplicación de microcosmos en suelo, el incremento de nutrientes, aireación y el aporte adecuado de humedad fueron factores ambientales que favorecieron un desarrollo óptimo de la biomasa de las cepas de *Aspergillus sp.*, *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.*, lo mismo que para la microbiota presente en la muestra de suelo, pues no fue previamente esterilizado, aspecto que coincide con el estudio de Valenzuela, *et al.* (2006), quienes reportan crecimiento de las cepas fúngicas en los medios con presencia de contaminantes y con aporte de nutrientes.

La gráfica de los perfiles de reducción de la concentración de TPHs en los microcosmos en suelo, dejan ver un aumento de la concentración de TPHs en el día 15 (Figura 3.6-1), para los microcosmos sin suministro de nutrientes. Los valores son superiores inclusive al del día inicial, posteriormente se consigue la reducción de los niveles de concentración hacia el día 25. En tanto que los microcosmos con adición de nutrientes muestran una reducción progresiva del contaminante durante los días de evaluación. La diferencia radica en el suministro de nutrientes y su relación con los biosurfactantes producidos por las cepas fúngicas. Tal como lo demuestra la teoría de Salager & Fernández (2004), los surfactantes de carácter anfipático, frente a los electrolitos aportados por los nutrientes K_2HPO_4 y KNO_3 , facilitan la movilización de las moléculas de hidrocarburos adheridas a las partículas de suelo, permitiendo su inserción en la fase acuosa-oleosa dentro de la emulsión, lo que las vuelve de más fácil acceso a las células de los microorganismos presentes en el medio. Este proceso de liberación de los contaminantes de la matriz sólida se vuelve más lento sin el aporte de nutrientes, como ocurre con los microcosmos sin bioestimulación. De forma general, el máximo consumo conseguido en el presente estudio, de las moléculas de hidrocarburos, por las células fúngicas, en todos los microcosmos, se consiguieron hacia el día 25 de evaluación, demostrado por las bajas concentraciones de TPHs de la Figura 3.6-1.

En la evaluación general de los resultados de reducción de TPHs no se presentan diferencias estadísticas entre la presencia de los inóculos fúngicos y la microbiota normal del suelo sin los inóculos, más bien el tiempo de inoculación de los microcosmos, hacia el día 25, es un punto de relevancia para la disminución del contaminante. Este hecho está reportado por estudios realizados por Potin, *et al.* (2004), quienes en ensayos de 4 semanas evidenciaron reducción de contaminantes para inóculos fúngicos con micelios frente a controles conformados por el suelo estéril, ellos reportan la disminución de TPHs como un proceso de biodegradación, pues evaluaron el inóculo con micelios activos y micelios muertos por tratamiento con HgCl₂, lo que reveló diferencias en la reducción en un porcentaje de 27.5% después de un mes de inoculación.

En la presente investigación, hacia los 25 días de incubación, se alcanzaron los siguientes porcentajes de reducción: *Aspergillus sp.* con nutrientes: 45,78%, *Geotrichum sp.* con nutrientes: 28,55%, *Penicillium sp.* con nutrientes: 27,46%, Suelo solo con nutrientes: 39,58%, *Aspergillus sp.* sin nutrientes: 13,69%, *Geotrichum sp.* sin nutrientes; 11,22%, *Penicillium sp.* sin nutrientes: 11,83%, y Suelo solo sin nutrientes: 7,68%. Es decir que para ensayos en microcosmos en suelo, la cepa de *Aspergillus sp.* con nutrientes presentaron un mayor porcentaje de reducción de TPHs, al que le sigue las cepas de *Geotrichum sp.* y *Penicillium sp.*, con la adición de nutrientes, lo que demuestra la acción positiva de los nutrientes en el gasto del contaminante. Los menores porcentajes de reducción de TPHs están indicados para los tratamientos sin la adición de nutrientes.

Cabe indicar que la presencia de la microbiota propia del suelo, gracias al efecto de la bioestimulación con los nutrientes, alcanzó importantes niveles de reducción de TPHs, lo que demuestra que los microorganismos presentes en el suelo tuvieron un desarrollo considerable por la acción de los mismos. El porcentaje promedio de 39,85% de reducción de TPHs revela este particular. El trabajo realizado por Pérez, *et al.* (2010), presentó resultados con similar

tendencia, con un tiempo de incubación de los ensayos de suelo de 25 días, en los que los mayores porcentajes de degradación y reducción de TPHs estuvo registrado por tratamientos de suelo no esterilizado con nutrientes (78.5% de reducción del contaminante) y del suelo no esterilizado con inóculo de *Cladosporium cladosporioides* y nutrientes. En tanto que los mejores resultados se lograron con las cepas de *Aspergillus sp.* con nutrientes. Es posible sugerir que tiempos de incubación mayores indicarían si las cepas inoculadas registraran porcentajes de remoción más altos de contaminante, debido a que permitirían un mayor desarrollo de las cepas, mayor producción de biomasa y enzimas, como lo indica también Pérez, *et al.* (2010).

En los resultados de la evaluación de la emisión de CO₂ libre, como indicador de respiración y, conexamente, del crecimiento de los inóculos, se observó incrementos progresivos a mayor tiempo de incubación, tal es así que el mayor valor de producción de CO₂ se obtuvo en el último día de evaluación, que fue en el día 9 del experimento, con un promedio de 14.34 mg CO₂ por kg de suelo, con lo que en concordancia con el tiempo de incubación y reducción de TPHs, permite deducir que existió un alto índice de actividad biológica tras el consumo y reducción del contaminante en los microcosmos, como se observa en la grafica 3.7-1. Este resultado es ratificado por los estudios de Mancera *et al.* (2008), que con las cepas *Rhizopus sp.*, *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus sydowii* presentaron máximos niveles de reducción de hidrocarburos y altos niveles de emisión de CO₂ entre los días 14 a 17 de incubación de los microcosmos en suelo, con un valor promedio de 80% de CO₂. Resultados coincidentes, de un aproximado de 14% de emisión de CO₂, fueron indicados en el trabajo de Pérez, *et al.* (2010), su porcentaje de mayor acumulación al final del experimento.

En resumen, estos resultados refieren el potencial de las cepas fúngicas aisladas en este estudio, para su empleo en trabajos de remediación ambiental. Sin embargo, para su aplicación en campo se requieren de estudios previo de cinética de crecimiento de las colonias fúngicas y su escalado en

prototipos que asemejen las condiciones físico-químicas, así como climáticas del sector. El aporte relevante de este trabajo es el indicio de las capacidades reductoras de estas cepas, que permiten la remoción de hidrocarburos recalcitrantes en medios líquidos y sólidos, a través de procesos de bioestimulación y bioaumentación. Asimismo, es necesario el estudio del comportamiento de la microbiota autóctona del sector, en el suelo no esterilizado, frente a su desarrollo conjunto con los inóculos fúngicos.

5.CAPÍTULO QUINTO: CONCLUSIONES

- Se obtuvieron tres géneros de cepas fúngicas: *Aspergillus*, *Geotrichum* y *Penicillium*, que presentaron potencial hidrocarburofílico, en microcosmos líquidos y sólidos.

- Las cepas fúngicas aisladas demostraron ser productoras de biosurfactantes, siendo la cepa de *Penicillium* la mayor productora, con un índice de emulsificación de 33.3%.

- La adición de nutrientes favoreció la reducción de la concentración de TPHs, debido a que incrementó la producción de biosurfactantes por parte de las cepas inoculadas, así también ayudó en el crecimiento microbiano.

- La actividad biológica, determinada por los niveles de emisión de CO₂ en microcosmos en suelo, demostró incrementarse al transcurso de los días evaluados, registrándose la máxima producción en el día 9 del ensayo, con un valor de 14.34 mg de CO₂, esto debido al mantenimiento de condiciones como la humedad y el suministro constante de oxígeno en los microcosmos, beneficiando el desarrollo de las cepas de hongos.

6. CAPÍTULO SEXTO: RECOMENDACIONES

- Es necesario conocer la ruta metabólica de los microorganismos inoculados, por lo cual se debe realizar más estudios respecto a los metabolitos generados tras la reducción del contaminante.

- Se debe realizar ensayos con fracciones específicas de hidrocarburos que permitan determinar la secuencia bioquímica de la degradación que toman.

- Con el objetivo de conocer el comportamiento de los microorganismos se debe realizar un estudio de la cinética de crecimiento de las cepas fúngicas, dentro del desarrollo de los microcosmos, que permitan correlacionar el tiempo de desarrollo óptimo de las cepas frente al consumo del contaminante.

- Se recomienda realizar ensayos para la producción de enzimas por parte de las cepas fúngicas aisladas, a fin de determinar su posible presencia y acción sobre el contaminante.

- A fin de valorar la conducta metabólica de las cepas aisladas se recomienda realizar a futuro ensayos con muestras de suelo esterilizadas, provenientes del sector impactado, así como con muestras no esterilizadas, que permitan sugerir la acción exclusivas de las cepas inoculadas.

7.CAPÍTULO SÉPTIMO: BIBLIOGRAFÍA

Acosta, Y., Cayama, J., Gómez, E., Reyes, N., Rojas, D., & García, H. (2006). Respiración microbiana y pruebas de toxicidad en el proceso de compostaje de una mezcla de residuos orgánicos. *Multiciencias, Universidad de Zulia, Venezuela*, 220-227.

Aguayo, F. (2008). Caracterización de microorganismos hidrocarburolíticos nativos y su potencial en biorremediación de suelos contaminados por derrames de petróleo en el campo Sacha. Tesis de Grado previa la obtención de Título de Ingeniero en Gestión Ambiental. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo. PP. 173.

Arias, E. y Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Tesis de grado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

Atagana, H., Haynes, R., & Wallis, F. (2006). Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air, and Soil Pollution* (172), 201–219.

Atlas, R. (1984). Petroleum Microbiology. McMillan Publishing Company. Estados Unidos. PP. 692.

Barnett, H., & Hunter, B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. 3era. Edición. Estados Unidos. PP.215.

Bennet, W., Wunch, K., & Faison, B. (2002) Use of fungi Biodegradation. Manual of Environmental Microbiology. 2da. Edición. ASM Press. PP.971.

Bustamante T., & Jarrín M. (Enero, 2005). Impactos sociales de la actividad petrolera en Ecuador: un análisis de los indicadores. Iconos. Revista de Ciencias Sociales. Núm. 21. Quito. Ecuador. PP. 19-34. Facultad de Ciencias Sociales – Sede América de Ecuador. ISSN: 1390-1249.

Byss, M., Elhottová, E., Tríska, 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, 1518–1523.

Camargo-de-Marais, M., Ramos, S., Pimentel, M., de-Morais Jr., M., & Lima, J. (2003). Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* , 19, 191-194.

Camino, E. (2003). Informe del Perito de la Inspección Judicial en Sacha 53. Juicio 002-2003 de La Corte Superior de Nueva Loja. Ecuador.

Cerniglia, C. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* ,No. 19, PP. 324–333.

Cerniglia, C., White, G., y Heflich, R. (1985). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Microbiology*. No. 143. PP: 105-110.

Cooper, D., y Goldenberg B. (1987). Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 53. No.2. American Society for Microbiology.

Cooper, G., & Goldenberg, B. (1986). Surface-active agents from two Bacillus species. *Applied and Environmental Microbiology*, 224-229.

Cumbal, L. (2010). Caracterización y establecimiento de un programa de remediación de las aguas de San Carlos, provincia de Orellana. Informe perteneciente al Ministerio del Ambiente. Ecuador.

Eweis J., Ergas S., Chang D., y Schroeder E. (1999). Principios de biorrecuperación (Tejero Iñaki y Amieva Juan, Trad.). España: McGraw-Hill.

Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N., Poggi-Varaldo, H., Alarcón, A., y Cañizares-Villanueva R. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48. No. 2.

Fontaine, G. (2004). Petróleo, contaminación y microconflictos ambientales en la Amazonía. Red Insumismos Latinoamericanos. Extraído el 28 de abril, 2010, de:

<http://www.insumisos.com/lecturasinsumisas/Petroleo%20y%20contaminacion%20en%20la%20Amazonia.pdf>

Fontaine, G. (2005). Microconflictos ambientales y crisis de gobernabilidad en la Amazonía ecuatoriana. Iconos. Revista de Ciencias Sociales. Num. 21, Quito, PP. 35-46.

Gilman, J. (1959). *A Manual of Soil Fungi*. Iowa, Estados Unidos.: The Iowa State University Press.

Guédeza, C., Cañizález, L., Castillo, C., Olivar, R. (2009) Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria spp*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. Vol. 29. PP: 34-38.

Hurting, A., & San Sebastián, M. (2002). Cáncer en la Amazonía del Ecuador (1985-1998). Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria "Manuel Amunarriz". Segunda edición. Ediciones Abya-Yala. Quito – Ecuador. PP.: 50.

Husain, S. (2008). Literature Overview: Microbial Metabolism of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Remediation Spring* , 131-161.

Lemos, J.; Milloli, V.; Santos, L.; Rizzo, A.; Cunha, C.; Soriano, A.; Leite, S., y Santos, R. (2002). Bioremediation: Assesing the addition of biosurfactants in the presence of fungi biodegradation of clay soil impacted by petroleum. Center for Mineral Technology. Ministry of Science and Technology. Federal University of Rio de Janeiro. Brasil.

Luna, A., Esparza, F., & Olivia, R. (2007). Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium sp*. *Process Biochemistry* , 42 (3), 310-314.

Luna, A., Esparza, F., Salazar, A., & Rodríguez, R. (2005). Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de un biosurfactante y remoción de fenantreno por *Penicillium sp*. En S. C. Bioingeniería (Ed.), *VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería*, T074. Habana.

Maldonado, A. y Narváez, A. (2003). Ecuador ni es, ni será ya, país amazónico. *Acción Ecológica*. Extraído el 14 de enero, 2009 de:

<http://www.accionecologica.org/descargas/areas/petroleo/documentos/Ecuador.pdf>

Madigan, M.; Martinko, J. & Parker, J. (1998). *Brock. Biología de los microorganismos*. 8va. Ed. Prentice Hall. España. PP. 991.

Moñino N., & Galdos A. (2008). Exposición a la contaminación por actividad petrolera y estado de salud de la Comuna Yamanunka (Sucumbíos, Ecuador). Memoria del Proyecto Final de Carrera de Ciencias Ambientales. Facultad de Ciències. Secció de Ciències Ambientals. Universidad Autònoma de Barcelona.

Paraszkievicz, K., Kanzwal, A., & Dlungonski, J. (2002). Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Cuvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology* 92. Polonia, 287-294.

Pérez, B., Martínez, D., Calixto, M., Alba, J., y Rodríguez, R. (2010). Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26 (3) 193-199.

Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, 20–33.

Potin, O., Rafin, C., & Veignie, E. (2004_a). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 45-52.

Potin, O., Veignie, E y Rafin, C. (2004_b) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 51 PP: 71–78.

Prenafeta, F., Summerbell, R., & Sybren, G. (2006). Fungigrowing onaromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounterwith biohazard? *Federation of European Microbiological Societies* , 109-130.

Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological, Physical, and Chemical Processes. Lewis Publishers. Estados Unidos de América. PP.542.

Rittmann, B. & McCarty, P. (2001). Biotecnología del Medio Ambiente. Principios y aplicaciones. McGraw-Hill/Interamericana de España. PP. 745.

Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., y Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. Instituto Mexicano del Petróleo. PP. 424 - 434.

Rosero, G. (2010). Determinación de la concentración de metales pesados, hidrocarburos totales y aromáticos de petróleo TPHs y HAPs en suelo y agua subterránea en la Parroquia San Carlos, Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana, y diseño de un programa de biorremediación del acuífero. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.

Salager, J. & Fernández, A. (2004). Surfactantes. Cuaderno FIRP S034 – PP. Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales. Universidad de los Andes. Venezuela. PP. 32.

Saraswathy, A., & Hallberg, R. (2002). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *Federation of European Microbiological Societies* , 210, 227-232.

Seitz, M. (Mayo, 2008). Ecuador: ¿petróleo vs. conservación. A fondo. BBC MUNDO.com. Extraído el 9 de febrero del 2010, de

http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/specials/2008/amazonas/newsid_7392000/7392262.stm

Solórzano, J., Rizzo, A., Millioli, V., Soriano, A., Moura, M., & Santos, R. (2002). Petroleum degradation by Filamentous Fungi. Centro para Tecnología Mineral del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Río de Janeiro.

Soria, R. (2010). Evaluación, selección y caracterización de cepas bacterianas con capacidad potencial de degradar petróleo crudo, a nivel de laboratorio, de muestras de suelo del Sector de San Carlos, Sacha – Ecuador. Tesis previa la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. PP. 137.

Stoilova, I., Krastanov, A., Yemendzhiev, H., & Alexieva, Z. (2008). Influence of concentration of conidia of *Aspergillus awamori* NRRL 3112 on the catabolism of aromatic hydrocarbons and their mixtures. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2833-2843.

Sutherland, J. (1992). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, Vol.9. PP. 53-62

Textos Unificados de Legislación Ambiental Unificada. (2002). Ministerio del Ambiente. Quito – Ecuador.

Valencia H. 2004. Práctica 16. Cultivo, microcultivo e identificación de hongos. *Manual de prácticas de microbiología básica*: 140. PP.99-116. 1era. Ed. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Biología. Colombia: Unibiblos.

Valenzuela, E., Solís, L., Martínez, O., y Pinochet, D. (2006). Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo. Universidad Austral de Chile. *Boletín Micológico*. Vol. 21. PP : 35 – 41.

Varea, A., y Ortiz, P. (1995). Marea Negra en la Amazonía. Conflictos socioambientales vinculados a la actividad petrolera en el Ecuador. Ediciones Abya-Yala. Primera edición. Quito – Ecuador. PP.: 396.

Vásquez, M., Guerrero, J., y Quintero, A. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. XII. No. 1. Colombia. PP. 141-157.

Viñas, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. *Doctorado en Microbiología Ambiental y Biotecnología, bienio 1998-2000* , 352. Barcelona: Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología.

Walker, J., & Colwell, R. (1975). Enumeration of Petroleum-Degrading Microorganisms. *American Society for Microbiology* , 198-207.

Weische, C.; Martens, R. y Zadrazil, F. (2003). The effect of interaction between white-rot fungi and indigenous microorganisms on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Water, Air and Soil Pollution , Focus 3*, 73-79.

Zheng, Z., & Obbard, J. (2003). Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungal Isolates from an Oil Contaminated Refinery Soil. *Environ Sci & Pollut Res* , 3 (10), 173-176.