

EMPLEO DE HONGOS FILAMENTOSOS, AISLADOS EN SUELO, CON CAPACIDAD HIDROCARBUROLÍTICA, EN MICROCOSMOS.

Vega, Marcela; Koch, Alma, M. Sc.; Cumbal, Luis, Ph. D.

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 (E₂₄), 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 CO₂ libre, durante los 13 primeros días de incubación, empleando el método volumétrico con NaOH y HCl. Se comprobó incrementos en la concentración de CO₂ al transcurso de los días de evaluación, siendo los microcosmos con *Penicillium sp.*, adicionado con nutrientes, los que presentaron la mayor producción de CO₂ (9,55 mg CO₂ 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.

INTRODUCCIÓN:

Los TPHs (Hidrocarburos Totales de Petróleo, por sus siglas en inglés), conforman un amplio grupo de compuestos estructurados en su mayoría por carbon e hidrógeno. En el ambiente son de compleja degradación debido a su característica conocida como “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).

Una tecnología de mayor auge en la actualidad, para la eliminación de estos contaminantes, 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).

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 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.

METODOLOGÍA:

Área de estudio: 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.

Aislamiento 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, se sometió a agitación por 10 min. A partir de este inóculo se realizaron diluciones seriadas desde 1×10^{-3} hasta 1×10^{-5} . De cada dilución se tomó 0.1 mL y se inoculó, por triplicado, en medio mineral (MM) sólido, propuesto por Saraswathy & Hallberg (2002). 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.

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 contextura, 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.

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC): Para el conteo de hongos mesófilos heterótrofos 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), en un tiempo de incubación de 9 días, tiempo en el que se evidenció crecimiento aislado de colonias fúngicas.

Evaluación del antagonismo entre colonias fúngicas seleccionadas: Para determinar el antagonismo de las cepas seleccionadas, se procedió como indica Guédez 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 1.

Tabla 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.

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). 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. 2004a, Potin, et al. 2004b). El tiempo de incubación fue de 48 h.

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.

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. 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.

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.

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).

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. Se empleó una 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, 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. 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).

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, 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. 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. 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 1:

$$\text{mg CO}_2 \text{ producidos} = (10 - V) \times N \times 2.2 \text{ mg CO}_2 \text{ (Ecuación 1)}$$

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

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.

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).

Extracción de TPHs en suelo.

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

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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

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: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp.,

Penicillium sp., Paecilomyces sp. 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; Ifeanychukwu 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).

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 107 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. (2004b), 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.

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 las 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 (E24) 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).

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 10⁶ 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 reductoras 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 aeróbica.

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, 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.