CARACTERIZACIÓN DE HONGOS HIDROCARBONOCLASTAS AISLADOS DE UN SUELO CONTAMINADO[1]

[CHARACTERIZATION OF HYDROCARBONOCLASTIC FUNGI ISOLATED FROM CONTAMINATED SOIL]

Adriana Vázquez Martínez[1§], Ma. Teresa Rodríguez Casasola[2], Carlos Cruz Mondragón[2], Elvira Ríos Leal[2], Fernando José Esparza García[2]

[1]Estudiante de prácticas profesionales, Instituto Tecnológico de Ciudad Madero. [2]Personal Académico del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col. San Pedro Zacatenco, C. P. 07360, México, D.F. [§]Autor para correspondencia: (ady_vazquez5@hotmail.com).

RESUMEN

La extracción, almacenamiento y uso de hidrocarburos causa grandes impactos en los ecosistemas, ocasionando la pérdida de suelo. Debido a estas afectaciones, es necesario encontrar soluciones efectivas y viables para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos. El uso de la biorremediación, resulta ser muy viable por su bajo costo y de nulo impacto negativo al ambiente, en comparación con métodos químicos y físicos, centrando la atención en elementos biológicos que contribuyen a la oxidación, transformación y degradación, utilizando los hidrocarburos como fuente de carbono y de energía. En el desarrollo del presente trabajo se aislaron cuatro cepas de hongos de muestras de suelo de la ex refinería 18 de marzo, pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* de acuerdo a su morfología colonial y celular observada. Se seleccionaron aquellos microorganismos con capacidad hidrocarbonoclasta, se utilizaron fermentaciones líquidas durante 120 h, para observar su desarrollo, tanto con una fuente de carbono de maltosa como con queroseno, presentando un crecimiento de 7.9, 7.28, 10.14 y 4.32% comparado con el crecimiento obtenido en una fuente de carbono de maltosa, obteniendo un 70.4, 50.83, 32.50 y 73.53% de degradación con respecto a la concentración inicial en un periodo de 120 h de incubación y analizado por CG-FID

Palabras clave: biorremediación, degradación de hidrocarburos, hongos filamentosos.

ABSTRACT

Hydrocarbon extraction causes major impacts on ecosystems, causing loss of soil. Owing to these effects, it is necessary to find effective and viable solutions for the recovery of hydrocarbon contaminated soils. The use of bioremediation turns out to be very viable for its low cost and no negative impact compared to chemical and physical methods. The biological factors focus in to contribute at oxidation, transformation and degradation, them using the hydrocarbons as a source of nutrition and energy. In order to determine the ability of degradation of fungi isolated from contaminated soil, four fungi were isolated and identified in *Penicillium*, *Fusarium and Aspergillus* genera in agreement to their colony morphology and cell observed. were selected

[1] Recibido: 4 de octubre de 2016.
Aceptado: 20 de junio de 2017.

those with hydrocarbonoclastic capacity, liquid fermentations were used for 120 hrs to observe its development in conventional carbon source such as kerosene as a carbon source, presenting an increase of 7.9, 7.28, 10.14 and 4.32% compared with growth obtained in a conventional carbon source. Obtaining a 70.4, 50.83, 32.50 and 73.53% degradation percentage relative to the initial concentration in a period of 120 hrs analyzed by CG-FID.

Index words: bioremediation, hydrocarbons degradation, hydrocarbonoclastic fungi.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo ha venido en gran parte como resultado de la exploración, explotación, refinación, almacenamiento y distribución de petróleo crudo y sus derivados. De acuerdo a lo anterior es necesario encontrar opciones factibles para tratamiento de suelos contaminados. La biorremediación es una alternativa eficaz, de bajo costo y nulo impacto negativo, el método se centra en utilizar organismos vivos presentes en el medio ambiente para neutralizar sustancias contaminantes. La biorremediación con microorganismos, se fundamenta en la degradación de sustancias orgánicas que se utilizan como fuente de carbono y fuente de energía según reportó Rodríguez (2003).

Los hongos como microorganismos remediadores presentan características importantes: soportan la acción tóxica de los hidrocarburos, son aptos para crecer en ambientes con bajas concentraciones de nutrientes, poca humedad y pH ácido. Producen enzimas que rompen, por hidrolisis, las cadenas de los hidrocarburos convirtiéndolos en CO2 o en sustancias inocuas para el ambiente (Martínez *et al*, 2011).

El objetivo fue caracterizar y determinar el nivel de degradación de hongos aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos proveniente de la ex refinería 18 de marzo. La determinación de la capacidad de degradación de hidrocarburos es fundamental para su aplicación en procesos de remediación, comienza por la identificación taxonómica de los microorganismos aislados con base a su morfología colonial y celular para conocer los géneros a los que pertenecen, al estudiar sus características de crecimiento así como su tolerancia y aceptación de diferentes fuentes de carbono, se seleccionan microorganismos con potencial hidrocarbonoclasta con mayor capacidad de degradación que permite su selección a un posible proceso de biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de hongos

El aislamiento y caracterización de los hongos hidrocarbonoclastas seleccionados se desarrolló en el laboratorio de Ecología Bioquímica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav-IPN. Se realizó por el método de diluciones seriadas a partir de muestras de suelo y plaqueoen agar de medio mineral ($(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g L^{-1}, KH_2PO_4 0.5 g L^{-1}, KCl 0.2 g L^{-1},

$MgSO_4*7H_2O$ 0.2 g L^{-1}, $CaCl_2*2H_2O$ 0.1 g L^{-1}, Rosa de Bengala 1.0 g L^{-1}, Agar 20 g L^{-1}) con queroseno como fuente de carbono.

Identificación de morfología colonial y celular

Se realizó en placa de agar con diferente fuente de carbono por 120 h describiendo la morfología colonial. La identificación de su morfología celular se realizó por microcultivos en cámara húmeda a 48 h para observar los cuerpos fructíferos (Smith, 1981; Ramírez-Gama *et al.*, 2011).

Selección de microorganismos y cinética de crecimiento

Los microorganismos estudiados se cultivaron en medio mineral líquido con queroseno al 2% como fuente de carbono, hacia una selección de aquellos con capacidad de degradación de esta fuente de carbono.

Para observar sus condiciones de desarrollo se realizaron estudios de la cinética de crecimiento en fermentaciones líquidas en caldo Sabouraud Maltosa y en un medio mineral con queroseno como fuente de carbono e inoculadas con micelio vegetativo de 48 h de crecimiento en una incubadora GYROMAX 737R a 30°C con agitación a 150 rpm a 30 °C por 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h para determinar el crecimiento de la biomasa en base seca.

Porcentaje de degradación

Para determinar el porcentaje de degradación del queroseno en fermentación líquida en un medio mineral y queroseno al 4% como fuente de carbono e incubando a 30 ° C con agitación a 150 rpm durante 120 h, se inoculó con micelio vegetativo de 48 h, al final de la incubación se realizaron extracciones líquido-líquido con hexano, para posterior análisis de las extracciones por cromatografía de gases con Detector de Ionización de Flama en un cromatógrafo PERKIN ELMER AUTO SYSTEM, con columna CP-SIL 8CB 25mm*0.32mm con detector de FID (Detector de Ionización de Flama), temperatura de detector: 280ºC, temperatura de inyector: 250ºC, Programa: 80ºC-10 min-3ºC / 250ºC-10 min, flujo N_2: 9 psi (Medina-Mendoza *et al.*, 2014).

RESULTADOS

Los hongos aislados se identificaron con la nomenclatura H1, H2, H4, y H9. El hongo H1de acuerdo a su morfología colonial presenta colonias tipo filamentosa de aspecto homogéneo con desarrollo abundante, de micelio aéreo de color verde grisáceo en el centro de la colonia orillas de color blanco con amarillo, consistencia seca de aspecto superficial algodonoso compacto. La morfología celular presenta hifas septadas con conidióforos ramificados en métulas, producen fialosporas de sucesión basipétida de aspecto redondo, liso y pequeñas perteneciente al generó *Penicillium* (Herrera y Ulloa, 1998).

Con un porcentaje de crecimiento total promedio de 7.9% calculado por diferencia entre el crecimiento en una fuente de carbono de maltosa y el crecimiento en un medio con fuente de carbono de queroseno. El porcentaje de degradación total de 70.5% considerando las pérdidas por

evaporación como se observa la disminución de picos y áreas del tiempo 0 h a 120 h como se muestra en la Figura 1.

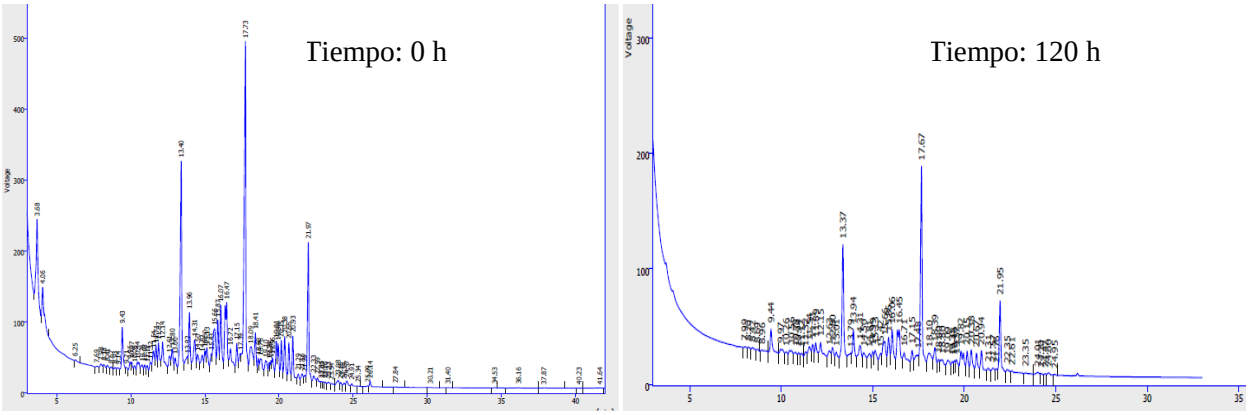

Figura 1. Degradación de queroseno por *Penicillum*: comparación de cromatogramas del tiempo 0 h y 120 h.

El hongo H2 de acuerdo a la morfología colonial presenta colonias tipo filamentosa de aspecto sectorial con desarrollo moderado, micelio aéreo de color rosa pálido que a mayor tiempo cambia a violeta, consistencia seca de aspecto superficial aterciopelado. La morfología celular presenta hifas cenocíticas con microconidios que forman clamidosporas grandes de aspecto redondo y liso perteneciente al generó *Fusarium.*(Herrera y Ulloa, 1998; Rivero s*et al*., 2001).

Con un porcentaje de crecimiento total promedio de 7.28% calculado por diferencia entre el crecimiento en una fuente de carbono de maltosa y el crecimiento en una fuente de carbono de queroseno, presentando un porcentaje de degradación total 50.83% considerando las pérdidas por evaporación como se observa la disminución de picos y áreas del tiempo 0 h a 120 h como se muestra en la Figura 2.

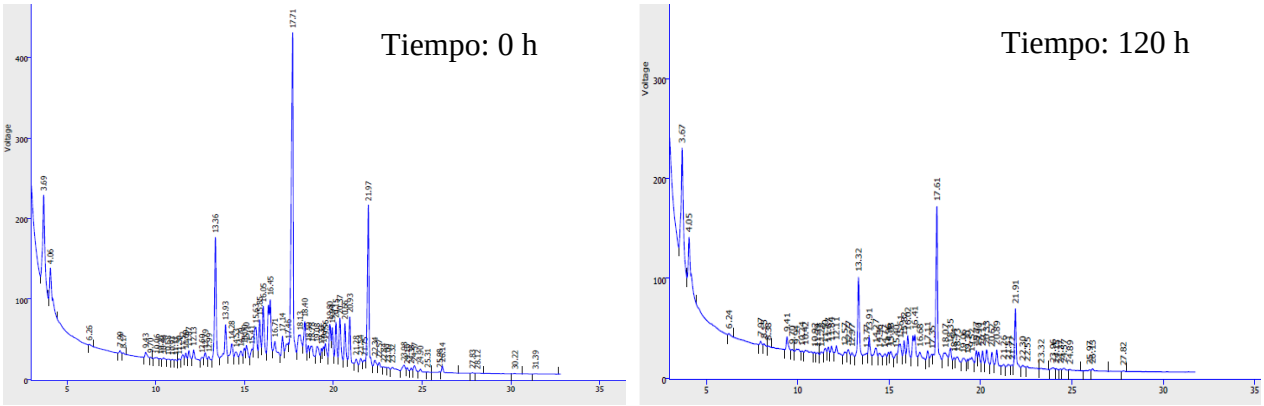

Figura 2. Degradación de queroseno por H2 *Fusarium*: comparación de cromatogramas de tiempo 0 h y 120 h.

El hongo H4 presenta una morfología colonial diferente al hongo H2, el H4 presenta colonias tipo filamentosa de aspecto sectorial con desarrollo moderado, micelio aéreo de blanco con el

paso del tiempo cambia a rosa pálido, consistencia seca de aspectos superficial aterciopelado cerebriforme perteneciente al generó *Fusarium* (Herrera y Ulloa, 1998; Rivero s*et al*., 2001)con una morfología celular muy similar al hongo H2 con hifas septadas, microconidios cortos que forman clamidosporas.

Con un porcentaje de crecimiento total promedio de 10.1% calculado por diferencia entre el crecimiento en una fuente de carbono de maltosa y el crecimiento en una fuente de carbono de queroseno, presentando un porcentaje de degradación total 50.83% considerando las pérdidas por evaporación como se observa la disminución de picos y áreas del tiempo 0 h a 120 h como se muestra en la Figura 3.

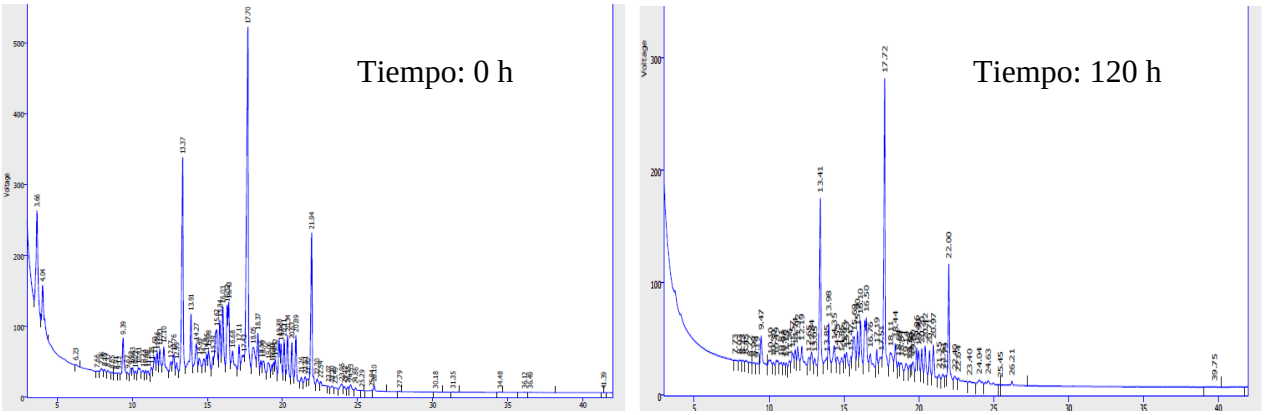

Figura 3. Degradación de queroseno por H4 *Fusarium*: comparación de cromatogramas de tiempo 0 h y 120 h.

El hongo H9 de acuerdo a la morfología colonial presenta colonias tipo filamentosas de aspecto homogéneo con desarrollo abundante de micelio aéreo de color verde grisáceo, consistencia seca de aspecto aterciopelado. La morfología celular presenta hifa septadas con conidióforo en forma de vesícula en la cual nacen los fiálides que producen fialosporas de sucesión basipétida pequeñas de aspecto liso y esférico perteneciente al generó *Aspergillus* (Herrera y Ulloa, 1998).Un porcentaje de crecimiento total de 4.3%calculado por diferencia entre el crecimiento en una fuente de carbono de maltosa y el crecimiento en una fuente de carbono de queroseno, presentando un porcentaje de degradación total de 73.5% considerando las pérdidas por evaporación como se observa la disminución de picos y áreas del tiempo 0 h a 120 h como se muestra en la Figura 4.

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se cumple el objetivo de aislar y caracterizar cuatro cepas de hongos hidrocarbonoclastas, estos fueron definidos como *Aspergillus, Penicillium y Fusarium*. Covino *et al*. (2014) reporta diferentes hongos filamentosos con capacidad de degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos. Entre los géneros mencionados están *Fusarium, Metarhizium*.

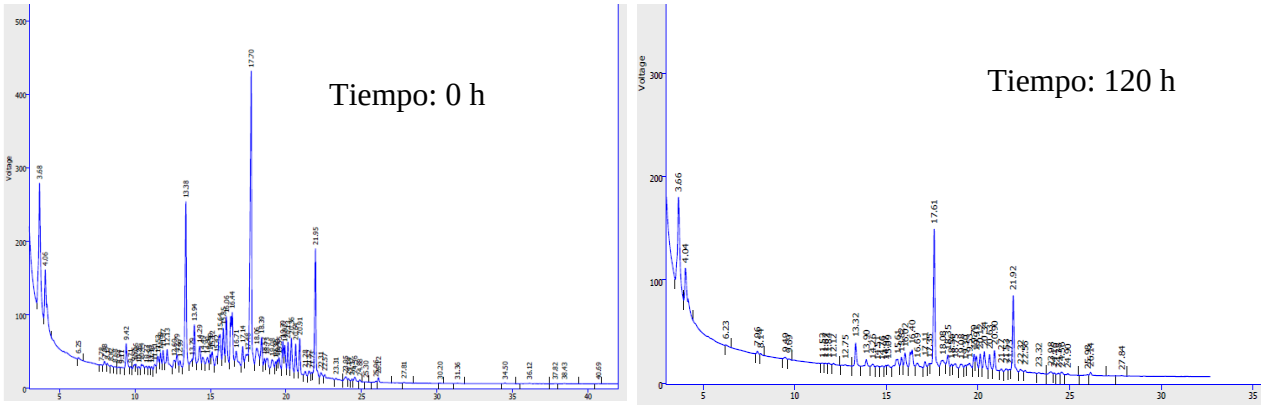

Figura 4. Degradación de queroseno por *Aspergillus*: comparación de cromatogramas de tiempo 0 h y 120 h.

Los hongos se presentan como mejores degradadores de hidrocarburos de cadena larga que las bacterias de acuerdo con Martínez-Vázquez *et al.* (2011) quienes mencionan a *Aspergillus y Penicillium* como los géneros que se encuentran en mayor proporción en suelos contaminados con hidrocarburos, utilizándolos para estudios de biorremediación de petróleo crudo y sus derivados, así como la mineralización de aromáticos policíclicos.

April *et al*. (2000) mencionan en sus estudios el aislamiento de hongos de muestras de suelos contaminados en Canadá en donde aislaron una gran variedad de hongos de los géneros *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Rizhopus* como degradadores utilizando preferentemente como fuente de carbono las fracciones de petróleo de cadenas entre *n*-C_{12} a *n*-C_{26}.

CONCLUSIONES

Del estudio de la microflora nativa de muestras del suelo de la ex refinería 18 de marzo se aislaron 4 cepas puras identificadas en los géneros: *Penicillium, Fusarium y Aspergillus* de acuerdo a la morfología colonial y celular presentada experimentalmente y verificada en la bibliografía con capacidad de degradar hidrocarburos. Los 4 hongos identificados demostraron tener capacidad hidrocarbonoclasta al desarrollar crecimiento en medio mineral con queroseno como única fuente de carbono, presentando porcentajes de degradación aceptables con respecto a la concentración inicial. Encontrando que el hongo aislado H9 identificado en el género *Aspergillus* tiene la mayor capacidad de degradación con 73,5%, por lo que se convierte en el mejor candidato para emplearse en procesos de biorremediación de queroseno.

AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento al Ing. Gustavo Medina Mendoza por el apoyo técnico en la parte analítica y al Ing. Favio Germán Yáñez Arroyo por el apoyo técnico en la parte de aislamiento de los microorganismos.

LITERATURA CITADA

April, T. M., J. M. Foght y R. S. Currah.2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. Canadian Journal of Microbiology 46(1):38-49.

Covino, S., A. D'Annibale, S. R. Stazi, T. Cajthaml,M. Čvančarová, T. Stella and M. Petruccioli. 2014. Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. Science of the Total Environment 505: 545-554.

Herrera, T. y M. Ulloa 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 2ª. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 143-196.

Martínez-Vázquez, J. G., M. A. Hernández-Rivera, M. E. Ojeda-Morales, y M. J. García-Marín. 2011. Condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para el desarrollo del microorganismo hidrocarbonoclasta *Penicillium* sp. *in vitro*. Akadémeia 9: 97-112.

Medina-Mendoza, G., A. Sánchez-Farías,C. Cruz-Mondragón, T. Rodríguez-Casasola, E. Ríos-Leal Elvira y F.J. Esparza-García.2014. Identificación fisiológica de una *Nocardia* spp, de acuerdo a su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico y degradación de hidrocarburos derivados del petróleo. Environmental Biotechnology and Engineering 3: 1228-1235.

Riveros, B., G. Muñoz, L. González, P. Rojas, A. Álvarez y R. Hinrichsen. 2001. Comparación entre análisis morfológicos y de ADN para la identificación de especies de *Fusarium* aislados de melón (*Cucumis melo* L.).Agricultura Técnica 61(3): 281-293.

Ramírez-Gama, R. M., M. B. Luna, C. A. Mejía, M. O. Velázquez, R. G. Tsuzuki, G. L. Vierna e I. Muggenburg. 2011. Manual de prácticas de microbiología general. Séptima edición. Facultad de Química, UNAM. México, DF. pp. 92-104.

Rodríguez, D. T. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Revista Ecosistemas 12(2): 350-355.

Smith, G. 1981. Smith's introduction to industrial mycology- 7th ed. Halsted Press a Division of John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 99-269.