

Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado

Efficiency of biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi isolated from contaminated soil

*Hans Contreras¹, Carmen Carreño²

RESUMEN

La biodegradación disminuye el impacto ambiental negativo de los derrames de hidrocarburos de petróleo. El objetivo de esta investigación fue determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos de petróleo de diez cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos seleccionados. Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo presentaron concentración de hidrocarburos totales (HTP) ($25\ 987\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$), microorganismos totales ($>1,1 \times 10^7\ \text{NMP}\ \text{g}^{-1}$) y microorganismos hidrocarbonoclasticos ($1,1 \times 10^6\ \text{NMP}\ \text{g}^{-1}$) y un nivel de toxicidad severo en el índice de germinación de *Raphanus sativus* L. "rabanito". Los hongos filamentosos se aislaron en agar Bushnell Haas-petróleo 1%, obteniéndose 221 aislados, identificándose 14 géneros: *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Periconia*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Memnoniella* y *Helminthosporium*. Todos los géneros a excepción de *Helminthosporium* demostraron ser hidrocarbonoclasticos y se seleccionaron aquellos que alcanzaron los mayores valores de biomasa (1,00 a 1,95 g). En el suelo tratado con *Aspergillus* sp. HP-031 se alcanzó el mayor índice de germinación desde los 60 días, la disminución de la toxicidad a un nivel bajo a los 90 días y la mayor eficiencia (73%) en la degradación del HTP, demostrándose el potencial de este hongo para la biorremediación.

Palabras clave: Biodegradación, hongos filamentosos, hidrocarbonoclasticos, petróleo.

ABSTRACT

Biodegradation reduces the negative environmental impact of oil spills. The objective of this research was to determine the efficiency of the biodegradation of petroleum hydrocarbons by ten cultures of hydrocarbonoclastic filamentous fungi selected. Samples of soil contaminated with petroleum hydrocarbons had a content of HTP ($25\ 987\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$), total microorganisms ($> 1,1 \times 10^7\ \text{NMP}\ \text{g}^{-1}$) and hydrocarbonoclastic microorganisms ($1,1 \times 10^6\ \text{NMP}\ \text{g}^{-1}$) and a level of severe toxicity in the germination index of *Raphanus sativus* L. "rabanito". Filamentous fungi were isolated on agar Bushnell Haas-oil 1%, obtained 221 isolates, identified 14 genera: *Cunninghamella*, *Penicillium* y *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Periconia*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Memnoniella* y *Helminthosporium*. All genera with the exception of *Helminthosporium* were shown to be hydrocarbonoclastic and those that reached the highest values of biomass (1.00 to 1.95 g) were selected. In soil treated with *Aspergillus* sp. HP-031 achieved the highest germination index from 60 days, decreased toxicity at a low level in the 90 days and the highest efficiency (73%) in the degradation of HTP, demonstrating the potential of this fungus for the Bioremediation.

Keywords: Biodegradation, filamentous fungi, hydrocarbonoclastic, petroleum.

¹* Biólogo. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Correo electrónico: hans94cm@gmail.com

² Bióloga. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Correo electrónico: c.carrenof1@hotmail.com

I. INTRODUCCIÓN

La explotación, producción, refinación y transporte de petróleo y sus derivados conlleva ocasionalmente accidentes técnicos y operacionales que causan severo deterioro al ambiente y daños irreversibles a los ecosistemas, afectando la flora, fauna y la composición de las comunidades microbianas autóctonas (Pernía et al., 2012).

Debido al impacto ambiental negativo de los hidrocarburos de petróleo, se han desarrollado técnicas para su eliminación, entre los que se consideran la extracción de hidrocarburos por vacío, lavado del suelo contaminado con agua, incineración, recuperación electrocinética, entre otras. Con estas técnicas se consiguen resultados positivos; pero su elevado costo económico, es un obstáculo para su empleo. En este contexto, la biorremediación, es una alternativa viable para disminuir el deterioro de la calidad del suelo por el derrame de petróleo (Cabanillas y Pissani, 2015).

La biorremediación consiste en el uso de plantas y microorganismos naturales (Galindo & Llontop, 2015) o modificados genéticamente para neutralizar los contaminantes, disminuyendo o eliminando su toxicidad para los seres vivos. Entre los microorganismos, los hongos filamentosos son capaces de mineralizar los hidrocarburos de petróleo hasta dióxido de carbono y agua (Tapia, 2002); sin embargo, su proliferación y actividad puede ser afectada por la población muy baja. Por esta razón, se requiere aislar hongos filamentosos en zonas impactadas, para caracterizarlos, seleccionarlos, propagarlos y posteriormente reintroducirlos, asegurando al máximo su eficiencia en la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo y biorremediación de los suelos contaminados.

Los lugares contaminados con petróleo, en el distrito de Puerto Eten, región Lambayeque, tienen una diversidad biológica que no ha sido investigada (Llanos, 2012), para la búsqueda de hongos filamentosos degradadores de hidrocarburos de petróleo. Por lo que se planteó como objetivo determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos de petróleo por diez cultivos seleccionados de hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó en dos fases. En la primera fase (descriptiva) se determinaron las características químicas, microbiológicas y toxicidad del suelo experimental contaminado con

hidrocarburos de petróleo, se aislaron e identificaron hongos filamentosos y se seleccionaron los hongos hidrocarbonoclasticos. En la segunda fase (explicativa) se determinó la eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por diez cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos seleccionados. La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental "Sólo Después" y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández et al., 2014). Los tratamientos fueron 12, correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2: Testigo abiótico (formaldehído), T3 a T12: cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos.

En la fase descriptiva, la población estuvo constituida por el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en el distrito de Puerto Eten, región Lambayeque y se investigaron 54 muestras probabilísticas de suelo colectadas durante noviembre a diciembre de 2016. El número de muestras fue calculado (Hernández et al., 2014) tomando en cuenta una prevalencia de 90%, determinada mediante un muestreo piloto. En la fase explicativa, la población fueron los hongos hidrocarbonoclasticos aislados del suelo contaminado durante noviembre a diciembre de 2016 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por diez cultivos de hongos.

Las muestras de suelo contaminado, de aproximadamente 1 kg, se obtuvieron con una palana, eliminando los 2 cm superficiales y colectando el suelo a una profundidad de 10 cm (Llanos, 2012) en 54 puntos de muestreo ubicados aleatoriamente. El análisis químico, microbiológico y toxicidad del suelo contaminado se realizó en submuestras de 1 kg.

La concentración de hidrocarburos totales (HTP), se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un cromatógrafo de gases modelo 6890N (Net Work GC system) y un espectrómetro de masas modelo 5975 inert XL (Agilent Technologies).

En el análisis microbiológico de tres submuestras de suelo de 10 g cada una, se determinó el número de microorganismos totales y microorganismos hidrocarbonoclasticos, mediante la técnica del número más probable (Llanos, 2012). Los tubos se incubaron a 30°C por 10 días y la turbidez del medio de cultivo se consideró positivo a la presencia de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos, realizándose el cálculo

correspondiente según el método estándar.

La toxicidad de los contaminantes del suelo experimental se investigó por triplicado en submuestras de 10 g, utilizando semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito” a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación (Flores & Benites, 2015). En placas de Petri, se depositaron las submuestras de suelo, se humedecieron con 12 mL de agua destilada y en cada placa, con una pinza se depositaron 25 semillas de rabanito. Todas las placas se cubrieron con papel metálico durante 120 h, a 30°C y a las 120 h se contaron las semillas germinadas y se midió la longitud de las radículas emergidas, calculando (Llanos, 2012) el porcentaje relativo de germinación (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG):

$$PGR = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas en el suelo contaminado}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Long. promedio de radículas en el suelo contaminado}}{\text{Long. promedio de radículas en el testigo}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

La fitotoxicidad se determinó con el criterio de interpretación: $IG \geq 80\%$ indica que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración; $80\% > IG > 50\%$ se interpreta como presencia moderada de estas sustancias y un $IG \leq 50\%$ indica fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo (Purisaca & Quevedo, 2015).

Aislamiento, identificación y selección de hongos hidrocarbonoclasticos

Los hongos filamentosos cultivables de las muestras de suelo contaminado, se enriquecieron, depositando 10 g de cada muestra en 90 mL de caldo Bushnell Haas e incubando a 30°C, por 72 horas, con agitación manual diaria durante 10 minutos (Galindo & Llontop, 2015). Después de la incubación, se tomaron alícuotas de 0,1 mL y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría en agar Bushnell Haas con 1 mL (1%) de petróleo crudo, incubándose a 30°C hasta por 10 días. Las colonias de hongos desarrollados se agruparon según sus características macroscópicas y la identificación se realizó en cultivos monospóricos (Arias & Piñeros, 2008), con ayuda de las claves taxonómicas de Seifert (1996). Los hongos filamentosos se consideraron hidrocarbonoclasticos cuando

utilizaron el contaminante como fuente de carbono y energía (Llanos, 2012), desarrollando micelio observable, con y sin viraje del indicador. El inóculo de los hongos se obtuvo con cultivos de 10 días de crecimiento en PDA con 1% de petróleo a los que se les agregaron 10 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v) para obtener una suspensión de conidios, que se filtró en gasa esterilizada y su concentración se estandarizó a 10^4 conidios mL^{-1} mediante recuento de células en la cámara de Neubauer (Corrales et al., 2012).

El inóculo fue cultivado por triplicado en 5 mL de caldo Bushnell Haas con 1% de petróleo a 30°C, con agitación manual diaria por 10 min, registrándose los días requeridos para la observación del micelio y viraje del indicador. Transcurridos 10 días el medio de cultivo, se llevó al autoclave (121°C, 15 lbs, 20'), se filtró y la biomasa obtenida se deshidrató en estufa a 70°C, hasta alcanzar peso constante (Tapia, 2002), que fue determinado en una balanza de precisión (EXCELL, 0,01-150 g), seleccionándose los diez cultivos de hongos con los mayores valores.

Biodegradación de hidrocarburos de petróleo

El suelo experimental contaminado con petróleo se distribuyó en 36 bandejas de polipropileno a razón de 1,20 kg por cada una de ellas. A continuación, siguiendo el procedimiento descrito por Corrales et al. (2012), se depositaron 120 mL del inóculo del hongo correspondiente por bandeja, al testigo absoluto se agregó agua destilada y al testigo abiótico formaldehído al 5%. Inmediatamente después de la inoculación se tomaron submuestras de 10 g para el análisis microbiológico (Llanos, 2012) y el ensayo de toxicidad en rabanito (Purisaca & Quevedo, 2015). Las bandejas se mantuvieron en el invernadero a temperatura ambiental, removiéndolas con una palana de mano durante 5 min y regándolas con agua declorada según el requerimiento. Cada 30 días, hasta por 90 días, se tomaron submuestras para el análisis microbiológico y ensayo de toxicidad respectivo. A los 90 días, se seleccionó el suelo del tratamiento con el que se alcanzó el mayor índice de germinación de rabanito, correspondiente a la menor toxicidad, se determinó la concentración de HTP y se calculó la eficiencia de la biodegradación (Llanos, 2012) de petróleo mediante la siguiente fórmula:

$$E = \frac{Si - Sf}{Si} \times 100$$

Donde:

E= Eficiencia de biodegradación de petróleo (%)

Si= Concentración inicial de TPH

Sf= Concentración final de TPH

Análisis estadístico de los datos

Se realizó el análisis de varianza de los valores del índice de germinación y la superioridad entre los tratamientos se determinó mediante la prueba múltiple de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 (Hernández et al., 2014), utilizando los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

III. RESULTADOS

El suelo contaminado presentó HTP de 25 987 mg kg⁻¹. La carga microbiana fue >1,1x10⁷ NMP g⁻¹, población que superó a la hidrocarbonoclastica de 1,1x10⁶ NMP g⁻¹. En cuanto al nivel de toxicidad fue severo en el índice de germinación de rabanito.

En todas las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo se aislaron hongos filamentosos, obteniéndose 221 aislados. Se identificaron 14 géneros, siendo los más frecuentes, *Aspergillus* (20,8%), *Cunninghamella* (12,6%) *Penicillium* y *Paecilomyces* (10,8%), seguidos de *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Periconia*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Monilia* y *Cladosporium* (8,5 a 2,7%). Los géneros menos frecuentes fueron *Gliocladium*, *Memnoniella* y *Helminthosporium* (2,2%).

El 98% de los hongos filamentosos aislados e identificados se consideraron hidrocarbonoclasticos porque utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía observándose micelio con o sin viraje del indicador al amarillo. El 2% de los hongos filamentosos del género *Helminthosporium* no demostraron ser hidrocarbonoclasticos.

Los hidrocarbonoclasticos desarrollaron micelio observable en el caldo Bushnell Haas con petróleo como fuente de carbono y energía durante 48 a 168 h, correspondiendo el mayor porcentaje (35%) a 96 h y el menor porcentaje (7%) a 144 h. En el 58% del caldo Bushnell Haas con petróleo cultivado se observó viraje del indicador púrpura de bromocresol al amarillo en un tiempo que osciló entre 24 a 96 h y el peso de la biomasa formada fue de 1,00 a 1,95 g.

Los hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos seleccionados fueron los que alcanzaron la mayor biomasa después de 10 días de incubación, correspondiendo a *Aspergillus* sp. 024 (1,95 g), *Penicillium* sp. 029 (1,91 g), *Bipolaris* sp. 016 (1,84 g), *Aspergillus* sp. 031 (1,83 g), *Aspergillus* sp. 015 (1,82 g), *Cunninghamella* sp. 018 (1,81 g), *Cunninghamella* sp. 025 (1,80 g), *Periconia* sp. 030 (1,79 g), *Aspergillus* sp. 017 (1,78 g) y *Paecilomyces* sp. 023 (1,78 g).

En el proceso de biodegradación los microorganismos se incrementaron, alcanzando la máxima población de heterótrofos totales a los 30 días (Tabla 1) y de hidrocarbonoclasticos a los 60 días (Tabla 2). En los testigos abiótico y absoluto, las máximas poblaciones se alcanzaron a los 60 días. En todos los tratamientos los microorganismos disminuyeron a los 90 días.

Tabla 1. Población de microorganismos totales (NMP g⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en suelo contaminado

Tratamientos	NMP g ⁻¹ /días			
	0	30	60	90
T1 <i>Aspergillus</i> sp. HP-015	1,1 X10 ⁷	>1,1 X10 ⁷	1,1 X10 ⁷	1,1 X10 ⁷
T2 <i>Bipolaris</i> sp. HP-016	2,1 X10 ⁵	1,1 X10 ⁷	2,4 X10 ⁷	2,4 X10 ⁶
T3 <i>Aspergillus</i> sp. HP-017	2,1 X10 ⁶	>1,1 X10 ⁷	1,1 X10 ⁷	2,4 X10 ⁶
T4 <i>Cunninghamella</i> sp. HP-018	1,1 X10 ⁷	>1,1 X10 ⁷	4,6 X10 ⁶	2,1 X10 ⁶
T5 <i>Paecilomyces</i> sp. HP-023	1,5 X10 ⁶	>1,1 X10 ⁷	1,1 X10 ⁷	4,6 X10 ⁶
T6 <i>Aspergillus</i> sp. HP-024	1,1 X10 ⁷	>1,1 X10 ⁷	4,6 X10 ⁶	2,1 X10 ⁶
T7 <i>Cunninghamella</i> sp. HP-0125	1,1 X10 ⁷	>1,1 X10 ⁷	2,1 X10 ⁶	2,4 X10 ⁶
T8 <i>penicillium</i> sp. HP-029	1,1 X10 ⁷	>1,1 X10 ⁷	4,6 X10 ⁶	2,1 X10 ⁶
T9 <i>Periconia</i> sp. HP-030	2,9 X10 ⁶	1,1 X10 ⁷	1,5 X10 ⁶	4,3 X10 ⁵
T10 <i>Aspergillus</i> sp. HP-031	1,1 X10 ⁷	>1,1 X10 ⁷	1,1 X10 ⁷	4,6 X10 ⁶
T11 Testigo Absoluto	3,5 X10 ⁵	2,3 X10 ⁵	9,3 X10 ⁵	2,3 X10 ⁵
T12 Testigo Abiótico	7,3 X10 ⁴	1,5 X10 ⁵	3,9 X10 ⁵	2,8 X10 ⁵

Los índices de germinación de rabanito en el suelo biodegradado y con los testigos se incrementaron conforme transcurrió el tiempo y por el contrario, los niveles de toxicidad disminuyeron. A los 90 días, los mayores valores en el índice de germinación significativamente iguales correspondieron a *Aspergillus spp.* HP-031 y 017 (Tabla 3).

HP-031 se alcanzó el mayor índice de germinación desde los 30 días, la disminución de la toxicidad a un nivel bajo a los 90 días y una eficiencia de 73% en la degradación del HTP (Figura 1, Tabla 4).

Tabla 2. Población de microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP g⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en suelo contaminado

Tratamientos	NMP g ⁻¹ /días			
	0	30	60	90
T1 Aspergillus sp. HP-015	2,4 X10 ⁵	4,6 X10 ⁵	>1,1 X10 ⁶	4,6 X10 ⁵
T2 Bipolaris sp. HP-016	5,3 X10 ⁴	6,4 X10 ⁴	>1,1 X10 ⁶	2,4 X10 ⁵
T3 Aspergillus sp. HP-017	2,9 X10 ⁵	4,6 X10 ⁵	>1,1 X10 ⁶	2,9 X10 ⁵
T4 Cunninghamella sp. HP-018	2,4 X10 ⁵	1,1 X10 ⁶	>1,1 X10 ⁶	2,1 X10 ⁵
T5 Paecilomyces sp. HP-023	3,5 X10 ⁴	2,9 X10 ⁵	>1,1 X10 ⁶	2,1 X10 ⁵
T6 Aspergillus sp. HP-024	2,4 X10 ⁵	1,1 X10 ⁶	>1,1 X10 ⁶	4,3 X10 ⁴
T7 Cunninghamella sp. HP-0125	2,4 X10 ⁵	4,6 X10 ⁵	>1,1 X10 ⁶	3,5 X10 ⁴
T8 penicillium sp. HP-029	2,9 X10 ⁵	4,6 X10 ⁵	>1,1 X10 ⁶	4,3 X10 ⁴
T9 Periconia sp. HP-030	2,4 X10 ⁵	1,1 X10 ⁶	>1,1 X10 ⁶	4,3 X10 ⁵
T10 Aspergillus sp. HP-031	2,4 X10 ⁵	4,6 X10 ⁵	>1,1 X10 ⁶	2,9 X10 ⁵
T11 Testigo Absoluto	3,5 X10 ⁴	5,3 X10 ⁴	2,1 X10 ⁵	2,3 X10 ⁴
T12 Testigo Abiótico	2,0 X10 ⁴	2,7 X10 ⁴	1,2 X10 ⁵	2,1 X10 ⁴

Tabla 3: Índice de germinación de *Raphanus sativus* L. durante la biodegradación en el suelo biodegradado con *Aspergillus* sp.

Tratamientos	NMP g ⁻¹ /días				Sig. (α = 0,05)
	0	30	60	90	
T1 Aspergillus sp. HP-015	2-S	12-S	64-M	73-M	b
T2 Bipolaris sp. HP-016	3-S	10-S	42-S	66-M	c
T3 Aspergillus sp. HP-017	2-S	11-S	60-M	79-M	a
T4 Cunninghamella sp. HP-018	4-S	8-S	48-S	72-M	b
T5 Paecilomyces sp. HP-023	3-S	8-S	40-S	55-M	cd
T6 Aspergillus sp. HP-024	3-S	9-S	50-S	68-M	bc
T7 Cunninghamella sp. HP-0125	3-S	7-S	48-S	70-M	bc
T8 penicillium sp. HP-029	2-S	11-S	49-S	72-M	b
T9 Periconia sp. HP-030	2-S	9-S	500-S	73-M	b
T10 Aspergillus sp. HP-031	3-S	15-S	75-M	82-B	a
T11 Testigo Absoluto	3-S	5-S	32-S	45-S	e
T12 Testigo Abiótico	0-S	2-S	20-S	31-S	f

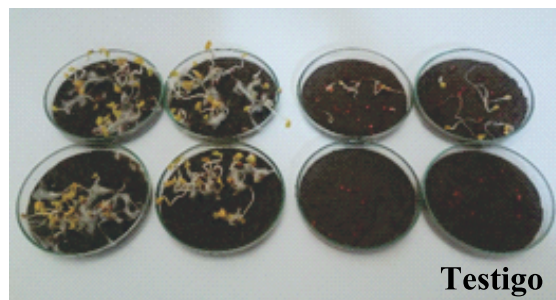


Figura 1. Ensayo de toxicidad en *Raphanus sativus* L., de suelo biodegradado con *Aspergillus* sp. HP-031

Tabla 4. Características del suelo biodegradado por 90 días con *Aspergillus* sp. HP-031

Características	Días			
	0	30	60	90
Microorganismos totales (NMP g ⁻¹)	1,1x10 ⁷	>1,1x10 ⁷	1,1x10 ⁷	4,6x10 ⁶
Microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP g ⁻¹)	2,4x10 ⁵	4,6x10 ⁵	>1,1x10 ⁶	2,9x10 ⁵
Índice de germinación (%)	3	15	75	82
Nivel de toxicidad	Severo	Severo	Moderado	Bajo
HTP (mg gk ⁻¹)	25 987	_____	_____	7 016
Eficiencia de biorremediación (%)	_____	_____	_____	73

IV. DISCUSIÓN

La concentración de TPH del suelo investigado fue superior al rango de 19 000–25 000 mg kg⁻¹ registrado por Hernández et al. (2003) y Purisaca & Quevedo (2015). La fracción TPH se define como aquellos hidrocarburos del extracto orgánico total pertenecientes a las fracciones saturada y aromática (Llanos, 2012), cuya concentración sirve como indicador del tipo de contaminación. Al respecto, Buendía (2012) mencionó que para biorremediar un suelo, el TPH debe ser menor de 50 000 mg kg⁻¹.

Los hongos aislados en el suelo contaminado son considerados heterótrofos tolerantes a los hidrocarburos de petróleo (Rivera et al., 2002), entre los que se encuentran los degradadores o hidrocarbonoclasticos.

Los hongos aislados se identificaron fenotípicamente tomando en cuenta la morfología de la colonia, micelio y estructuras reproductivas, coincidiendo con Vanishree et al. (2014), Chaudhry et al. (2012) y Hasan et al. (2016). En los géneros de hongos aislados del suelo contaminado predominaron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* y

Cunninghamella, considerados por Pernía et al. (2012) como representativos en sustratos contaminados con crudo y derivados.

La capacidad para formar micelio observable en el caldo Bushnell Haas con petróleo como única fuente de carbono y energía fue el criterio determinante para considerar a un hongo hidrocarbonoclástico, coincidiendo con Rivera et al. (2002). El viraje del indicador al amarillo por la acidez generada también se utilizó como criterio para calificar a los hongos hidrocarbonoclásticos. El indicador es reducido por los productos resultantes de la oxidación de los hidrocarburos de petróleo (Chaudhry et al., 2012).

Los géneros de hongos caracterizados como hidrocarbonoclásticos fueron reconocidos previamente por Arias & Piñeros (2008) (*Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Penicillium*); Chaudhry et al. (2012) (*Fusarium*, *Cladosporium*), Pernía et al. (2012) (*Cunninghamella*, *Gliocladium*, *Monilia Syncephalastrum*), Sandhu et al., (2016) (*Periconia*); Tapia (2002) (*Memmoniella*) y Deli (2014) (*Bipolaris*).

Los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Bipolaris*, *Paecilomyces* y *Penicillium* fueron seleccionados por la mayor biomasa. La capacidad de estos géneros para la degradación eficiente de hidrocarburos de petróleo y derivados también fue reportada por Chaudhry et al. (2012) (*Aspergillus*, *Penicillium*) y Rivera et al. (2002) (*Paecilomyces*). Por su parte, Pernía et al. (2012) consideran entre otros a *Aspergillus* en el grupo de hongos con mayor capacidad (52%) para reducir los niveles de TPH, *Penicillium* y *Paecilomyces* en el grupo de capacidad intermedia (27%) y *Cunninghamella* en el grupo con menor capacidad degradativa (13%).

El incremento de los microorganismos en el proceso de biodegradación, se atribuye a que el hidrocarburo como fuente de carbono puede sostener la población microbiana (Hernández et al., 2003). El mayor índice de germinación y menor toxicidad alcanzados con *Aspergillus* sp. HP-031 se relacionaron con el 73% de degradación en el HTP. Este género es considerado en el grupo de los hongos con mayor capacidad para reducir los niveles de TPH (Pernía et al., 2012) y su eficiencia fue demostrada previamente por Lotfinasabasl et al. (2012), Hasan (2014) y Hasan et al. (2016).

V. CONCLUSIONES

En un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo (TPH = 25 987 mg kg⁻¹) se aislaron hongos hidrocarbonoclásticos, destacando *Aspergillus* sp. HP-031 por la mayor eficiencia en la biodegradación,

demostrada por la menor toxicidad del suelo tratado y la disminución (73%) de la concentración de HTP.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, E. y Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Huasca y Cruz Verde*. (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Buendía, H. (2012) *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Cabanillas, J., y Pissani, V. (2015). *Efecto de la bioaumentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Chaudhry, S., Luhach, J., Sharma, V., y Sharma, C. (2012). Assessment of diesel degrading potential of fungal isoñates from sludge contaminated soil of petroleum refinery, Haryana. *Research Journal of Microbiology*, 7(3), 182-190.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, J., y Márquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(17), 64-82.
- Deli, H. (2014). Assessment of the ability of fungi isolates *Bipolaris hawaiiensis* and *Emericella nidulans* isolated from soils containing petroleum waste in the analysis of crude oil. *Al- Mustansiriyah Journal of Science*, 25(3), 7-12.
- Flores, S., y Benites, J. (2015). *Efecto del estiércol de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de diésel en terrarios*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Galindo, C., y Llontop, D. (2015). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura*. (Tesis de

- licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Hasan, I. (2014). Ability of some soil fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(2), 46-52.
- Hasan, I., Mhail, N., y Ali, S. (2016). Evaluation the quality of the oil waste to Al-Nasiriya refinery and possibility of treatment by some filamentous fungi. *Advances in Environmental Biology*, 10(4), 34-43.
- Hernández, E., Ferrera, R., Gutiérrez, M., Rodríguez, R., Rubiños, J., y Fernández, L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493-502.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6^{ta} ed.). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Llanos, C. (2012). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel, departamento de Lambayeque, 2011*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Lotfinasabasl, S., Gunale, S., y Rajurkar, N. (2012). Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by fungi. *Bioscience Discovery*, 3(2), 186-192.
- Pernía, B., Demey, R., Inojosa, Y., y Naranjo-Briseño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(1), 1-40.
- Purisaca, D., y Quevedo, D. (2015). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por Actinobacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodriguez, R., y Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra*, 20, 423-434.
- Sandhu, S., Shakya, M., Deshmukh., L, Aharwal, R., y Kumar, S. (2016). Determination of hydrocarbon degrading potentiality of indigenous fungal isolates. *International Journal of Environmental Sciences*, 6(6), 1163-1172.
- Seifert, K. (1996). *Fuskey: Fusarium interactive key*. Agriculture and agri-food. Canadá.
- Tapia, I. (2002). *Capacidad degradativa del petróleo de hongos aislados de agua de mar - litoral del Puerto Eten. Enero-Mayo, 2002*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Vanishree, M., Thatheyus, A., y Ramya, D. (2014). Biodegradation of petrol using *Aspergillus* sp. *Annual Research & Review in Biology*, 4(6), 914-923.