

Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de *Aloe vera*

Karla A. Petit¹, José L. Colina¹, Francisco E. Yegres², Hector G. Moran³, Nicole Richard-Yegres²

1 Departamento de Química, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM), Venezuela.

2 Laboratorio de Investigación y Apoyo Docente Santa Ana (LIADSA), UNEFM, Venezuela.

3 Centro de Investigación de Ciencias Básicas (CICBa), UNEFM, Venezuela.

Recibido:

Recibido en: 13/11/2013

| Aceptado:

Aceptado en: 26/11/2013

Contacto: Karla A. Petit - kpetit@correo.unefm.edu.ve

Resumen

Se evaluó la capacidad de cepas fúngicas aisladas de ambientes contaminados con petróleo, podredumbre blanca de árboles, ambientes cerrados y acíbar de *Aloe vera* para crecer y degradar antraceno, fluoranteno y pireno. Las cepas se seleccionaron inicialmente por su habilidad para crecer en placas con Czapek complementadas con diesel como única fuente de carbono y energía, se identificaron hongos pertenecientes a los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicilium* y *Trichoderma*, seguidamente las cepas fueron sometidas a ensayos de crecimiento en placas con medio Czapek complementado con los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) como única fuente de carbono, a partir de este ensayo se seleccionaron tres cepas que presentaron mayor crecimiento en los HPA, todas del género *Aspergillus*, con las cuales se determinó la degradación de HPA en cultivos líquidos en 20 días de incubación. La cuantificación de los HPA se realizó por cromatografía de gases. La cepa U2010-27A (*Aspergillus versicolor*) mostró la mayor tasa de biotransformación de los HPA, entre 15 y 20 %, por lo que se seleccionó para ensayos de biorremediación en un suelo contaminado con HPA, las tasas de degradación en 60 días de incubación resultaron 23,6% pireno, 10,6% fluoranteno y 5,0% antraceno. Estos resultados sitúan a la cepa U2010-27A como un hongo con potencial para biorremediar suelos contaminados con HPA.

Palabras clave: Biodegradación, Hidrocarburos aromáticos policíclicos, hongos

Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungi isolated from water contaminated with oil, white rot and aloe from *Aloe vera*

Abstract

We evaluated the ability of fungal strains isolated from oil-contaminated environments, white rot of trees, aloes indoors and *Aloe vera* to grow and degraded anthracene, fluoranthene and pyrene. The strains were initially selected for their ability to grow on plates with Czapek Medium (Cz) supplemented with diesel as the sole source of carbon and energy. Several isolates were identified as fungi belonging to the genera *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* and *Trichoderma*. The three strains selected by their best growth with PAHs belonged to the *Aspergillus* genus. The degradation of PAHs was determined in liquid cultures during 20 days of incubation, quantifying PAHs by gas chromatography. The strain U2010-27A (*Aspergillus versicolor*) showed the highest yield of biotransformation of PAHs, between 15 and 20%, so it was chosen for testing bioremediation in contaminated soil. The degradation yields at 60 days incubation were 23.6 % pyrene, 10.6 % fluoranthene and 5.0 % anthracene. These results indicated that the strain U2010-27A could be a potential candidate for bioremediation of contaminated soils.

Keywords: Biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons, fungi

Introducción

El petróleo tiene una gran importancia en la sociedad moderna, sin embargo, éste muestra varios aspectos negativos, siendo los problemas ambientales derivados de su explotación y uso los más importantes. Su sola presencia en el ambiente implica una serie de problemas relacionados con la contaminación, la disminución de la calidad del agua, el suelo y de la vida de muchas plantas y animales; pudiendo afectar finalmente, la calidad de vida de los seres humanos, que interactúan con los ecosistemas y cadenas alimenticias afectadas [1].

Entre los numerosos compuestos que contiene el petróleo, están los hidrocarburos aromáticos, los cuales varían en estructura, tamaño y complejidad; desde compuestos monocíclicos hasta estructuras de cadenas largas y complejas constituidas por anillos aromáticos [2]. De éstos compuestos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) han sido los más estudiados debido a que forman parte de una amplia variedad de productos de importancia biológica, química e industrial [3].

Los HPA se encuentran entre los contaminantes de mayor impacto biológico debido a los efectos cancerígenos y mutagénicos que provocan en los sistemas vivos [4]. Este efecto biológico varía en función de la estructura del HPA, la agencia para la protección ambiental americana (EPA) seleccionó 16 de los HPA, llamados prioritarios debido a su alta toxicidad, entre los que se encuentran antraceno, fluoranteno y pireno [5].

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de biotecnologías destinadas a recuperar

ambientes contaminados con petróleo o sus derivados, que complementen los métodos químicos y físicos tradicionales. Aparece así la biorremediación, una técnica basada en el uso de microorganismos para degradar los hidrocarburos presentes en el petróleo y otros combustibles que representa uno de los principales mecanismos por los cuales estos contaminantes pueden ser eliminados del ambiente y generalmente resulta más económica que otras alternativas de restauración [6].

Gran parte de los estudios de biorremediación, se han centrado en las bacterias, por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes; sin embargo la capacidad de los hongos, para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta compuestos más simples, ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes [7].

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar cepas fúngicas de diferentes fuentes con potencial para biodegradar antraceno, fluoranteno y pireno, tres HPA de alto impacto debido a su frecuencia y recalcitrancia en ambientes impactados por actividades petroleras, con lo cual se pretende hacer un aporte biotecnológico al saneamiento de ambientes contaminados con estos compuestos.

Materiales y Métodos

Aislamiento de cepas fúngicas

Muestras de corteza de árboles (aprox.10 g) con podredumbre blanca [3,8], acíbar de Aloe vera (aprox. 5 g) con crecimiento fúngico [9,10], agua contaminada con petróleo crudo (10 mL) [11], ambientes cerrados fueron suspendidas en 100 mL de medio líquido Czapek (Cz) [13]. Luego de 24 h de incubación, a partir de estas soluciones se aislaron cepas fúngicas con la capacidad para crecer en medio Cz [14] complementado con una emulsión de diésel comercial 5% (CzD) como única fuente de carbono y energía [15]. Las colonias se incubaron a 32°C durante 7 días. Los cultivos de hongos puros se obtuvieron mediante posteriores transferencias a placas de agar fresco.

La identificación de las especies fúngicas se realizó mediante estudios macro y microscópicos de características morfológicas (hifas, conidios, células conidiógenas y conidióforos), la información fue compilada y comparada con claves taxonómicas descritas en bibliografía especializada [16, 17, 18,19, 20].

Habilidad de las cepas fúngicas para crecer en HPA

Las cepas fúngicas con capacidad para crecer en CzD se seleccionaron por su habilidad para crecer en medio Cz complementado con antraceno, fluoranteno o pireno 0,5 mg/mL como única fuente de carbono y energía [20]. Se utilizó un control positivo de medio Cz sacarosa y negativo de Cz sin ninguna fuente de carbono. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 32 °C. Para evaluar el crecimiento de las cepas se estableció una escala basada en el tamaño de la colonia: (++) Buen crecimiento; (+) Moderado crecimiento; (-/+) Escaso crecimiento; (-) No se observó crecimiento.

Preparación del inóculo

Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos puros colocados en recipientes inclinados con medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) estos se incubaron a 32 °C. Luego de 7 días el cultivo fue lavado con 10 mL de agua desionizada estéril con lo cual se obtuvo una suspensión de esporas, eliminando los fragmentos de micelio de la suspensión por filtración con lana de vidrio estéril [21]. La concentración de esporas en el inóculo se estimó con una cámara de Neubauer.

Ensayo de degradación de HPA en cultivos líquidos

Las cepas seleccionadas se sometieron a ensayos de degradación en Erlenmeyers de 125 mL que contenían 20 mL de medio Cz líquido, complementado con antraceno, fluoranteno o pireno (CzH) (como única fuente de carbono) disueltos en acetona hasta una concentración de 0,5 mg/mL. Evaporado totalmente el solvente, los medios se esterilizaron a 121°C y 15 psia por 20 min. Los recipientes se inocularon con una suspensión de esporas de cada una de las cepas hasta una concentración de 105 esporas/mL [21]. Adicionalmente se inoculó Cz líquido complementado con 0,5 mg/mL de sacarosa (Control [+]), medio Cz sin fuente de carbono (Control [-]) y medio CzH sin inóculo (Controles [0]), con la finalidad de establecer comparaciones. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los cultivos fueron incubados a 32°C y 130 rpm en un agitador de mesa (Innova 2100). Se tomaron cultivos transcurridos 5, 10, 15 y 20 días de incubación, se determinó el peso seco de la masa fúngica y cantidad de antraceno, fluoranteno, pireno o sacarosa residual en los medios.

Tratamiento de la muestra de suelo

La muestra de suelo utilizada para los microcosmos (aprox. 2 Kg) fue colectada de una parcela de cultivo de la Unidad de Apoyo Académico Ing. José Landaeta (UNEFM) localizada en Coro, Venezuela. El suelo presento pH 6.5, Nitrógeno total 2,8 g/Kg, Potasio 2,3 g/Kg, Fósforo 0,8 g/Kg, CE 0,52 dS/m. El suelo fue secado al aire y tamizado a 2 mm, luego almacenado en la oscuridad a 4 °C hasta su uso [22].

Ensayo de degradación en un microcosmos contaminado con HPA

Los microcosmos se instalaron en Erlenmeyer (2 L) que contenían 250 g de suelo contaminado con antraceno, fluoranteno y pireno (MH), los cuales se agregaron disueltos en acetona, evaporado el solvente en su totalidad. El sistema fue agitado durante 1 h [23]. La concentración final de los hidrocarburos en el suelo fue 500 mg/kg de suelo. Cada MH fue inoculado con una suspensión de 105 esporas/g de suelo, disponiendo de MH control no inoculados (MC). El contenido de humedad en los microcosmos se mantuvo alrededor de 70% de la capacidad de retención de agua del suelo, con agua destilada estéril [21]. Los Erlenmeyers fueron tapados con algodón y fibra de lana estéril la cual se sustituyó cada 20 días y colocados a temperatura ambiente (aprox. 32°C), realizando un duplicado para cada recipiente. Se tomó un MH y MC cada 15, 30, 45 y 60 días para determinar la cantidad de antraceno, fluoranteno y pireno residual en las muestras de suelo.

Procedimiento analítico

La extracción de los HPA de los cultivos líquidos se realizó con diclorometano (DCM), los extractos se hicieron pasar por cámara de sulfato de sodio anhidrido y aforados a 10 mL. Los HPA de las muestras de suelo fueron extraídos con DCM por 16 h usando un dispositivo Soxhlet [21]. La cuantificación de los HPA se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies modelo 6890N, Network GC) acoplado a un

detector de ionización de llama. Usando una columna capilar 19091-j913, HP-5% Fenil-Metil Siloxano (30.0 m x 320 µm x 0.25 µm, Agilent Technologies). Se programó una temperatura inicial de 150°C por 30 seg y un incremento lineal de 20°C/min hasta 230 °C. La temperatura del detector e inyector se mantuvo en 280°C, el volumen de inyección fue de 1 µL. La cuantificación de los HPA en cultivos líquidos se realizó por medio de la relación del área del analito respecto al área del estándar interno con una curva de calibrado, usando fluoranteno o pireno como estándar interno. La cuantificación de HPA en las muestras de suelo se realizó estimando las áreas de los picos obtenidos y calculando la concentración del analito utilizando relación lineal con una curva patrón.

La biomasa fúngica producida se obtuvo filtrando al vacío el contenido de los cultivos con papel Whatman N°1. El filtrado se lavó dos veces con 10 mL de acetona y agua destilada estéril y el material fue secado en estufa a 60 °C hasta peso constante. El peso se determinó en una balanza analítica (Ohaus Adventur). La cantidad de sacarosa residual en los cultivos se determinó mediante método espectrofotométrico [24] a 490 nm utilizando un espectrofotómetro (Genesys, UV/VIS).

Análisis estadístico

La significancia de los resultados se comprobó por análisis de varianza, ANOVA y sistemas de comparación múltiples utilizando el test de Duncan, para resultados con 95% de confianza, empleando el software Infostat.

Resultados

Capacidad de las cepas fúngicas para crecer en HPA

Se estudió la habilidad de hongos de diferentes fuentes para crecer en medios de cultivo complementados con diesel obteniéndose 10 diferentes aislados (resultados similares han sido reportados por Bento et al.[15] y Hettige et al.[25]) los cuales fueron purificados e identificados, seguidamente las cepas fúngicas se ensayaron por su capacidad para crecer en medios de cultivo con antraceno, fluoranteno o pireno como única fuente de carbono. Las cepas aisladas (Tabla 1) pertenecen principalmente al género *Aspergillus*, el cual ha sido ampliamente descrito por su capacidad para metabolizar HPA [26,27,28]. El resto de las cepas aisladas pertenecen a los géneros *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicilium* y *Trichoderma*, todos reportados por su capacidad hidrocarbonoclástica [20,28,29]. Estas cepas fueron almacenadas en el cepario de hongos y levaduras del LIADSA-UNEFM. Los ensayos de crecimiento de las cepas en cultivos con HPA muestran que los hongos aislados de ambientes contaminados con petróleo crecieron en todos los HPA de prueba, característica que ha sido descrita por Okerentugba et al. [11] y Naranjo et al. [20]. Las cepas aisladas de podredumbre blanca de árbol crecieron en medios con antraceno y pireno (resultados similares obtenidos por Van Hamme et al.[3,31]; Acevedo et al.[30]; Gianfreda et al.[32]), aunque solo la cepa U2010-26C fue capaz de utilizar fluoranteno como sustrato. Los hongos aislados de los espacios cerrados del Laboratorio de Análisis Químico (LAQ) no evidenciaron crecimiento aparente sobre los HPA durante este ensayo. La cepa U2010-1A aislada a partir de una muestra de acíbar de *A. vera* mostró crecimiento en todos los medio con HPA, siendo este el primer informe de crecimiento de un hongo aislado de esta fuente sobre HPA. Estos resultados permitieron seleccionar las cepas U2010-27A, U2010-1A y U2010-26C para próximos ensayos en cultivos líquidos.

Tabla 1.

Crecimiento de las cepas fúngicas en los sustratos de prueba

Cepa	Género	Especie	Fuente	Medio	
				Sacarosa	Control
U 2010-2C	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	Agua a	++	-
U 2011-2A	<i>Penicilium</i>	<i>sp</i>	Ambiente b	++	-
U 2010-27A	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Agua a	++	-
U 2010-26C	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Madera c	++	-/+
U 2011-5A	<i>Acremonium</i>	<i>sp</i>	Maderac	++	-
U 2010-2E	<i>Trichoderma</i>	<i>sp</i>	Agua a	+	-
U 2010-1A	<i>Aspergillus</i>	<i>nidulans</i>	Acíbar d	++	-
U 2011-1A	<i>Fusarium</i>	<i>solana</i>	Ambiente b	+	-
U 2010-1B	<i>Paecilomyces</i>	<i>variotti</i>	Agua a	++	-
U 2011-3A	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Maderac	++	-

Aislamiento a partir: a Aguas de servicio petrolero, Refinería Amuay; b Ambientes cerrados, LAQ-UNEFM; c Podredumbre blanca de árboles; d Acíbar de *A. vera*

.(++) Buen crecimiento; (+) Moderado crecimiento; (-/+) Escaso crecimiento; (-) No se observó crecimiento.

Degradación de HPA en cultivos líquidos

Se determinó la habilidad para degradar antraceno, fluoranteno o pireno en cultivos líquidos de 20 días de incubación de tres cepas seleccionadas del ensayo de crecimiento en HPA. La figura 1 muestra el patrón cinético de consumo de HPA y la biomasa fúngica producida durante el ensayo. Las cepas cumplieron con una fase adaptativa, en la cual el hongo ajusta su aparato enzimático para metabolizar el sustrato, observándose degradación a partir de los días 5 a 10 del ensayo, evidenciado por la disminución de la cantidad del HPA residual y el aumento de la biomasa producida por el hongo. Luego de la fase de adaptación cada una de las cepas ensayadas mostró un comportamiento específico de metabolización de los HPA y crecimiento, aunque ninguna de ellas logró agotar completamente el sustrato. Las cepas U2010-26C y U2010-1A reportaron porcentajes de degradación entre 5 y 15 % hasta el día 20 del ensayo (figuras 1A y 1C), demostrando que la cepa aislada del acíbar de *A. vera* es capaz biodegradar antraceno, fluoranteno y pireno a las concentraciones de estos ensayos. Este resultado evidencia que la capacidad para metabolizar algunos HPA no es exclusiva de hongos aislados de ambientes contaminados con hidrocarburos o podredumbre blanca de árboles. Aunque son muchos los informes publicados de bioconversión de HPA por hongos del género *Aspergillus* [26,27,28], esta es la primera evidencia de degradación de HPA por un hongo aislado de *A. vera*. Antraceno fue el HPA degradado en mayor cantidad, seguido de fluoranteno y pireno,

esto debido a que durante la degradación microbiana de compuestos aromáticos los HPA de menor peso molecular se degradan con mayor rapidez [33]. U2010-27A fue el hongo que reportó las mayores porcentajes de consumo de HPA, entre 15 y 20 %, en contradicción con lo esperado esta cepa presentó un mayor consumo de pireno 19,9% seguido de fluoranteno 15,5% y antraceno 11,5%. Estos resultados, aunque contrastan con lo expuesto anteriormente, han sido también reportados por Viñas et al.[34]. Esta característica de la cepa para degradar preferiblemente pireno -un HPA de mayor número de anillos aromáticos y peso molecular que fluoranteno o antraceno- probablemente se deba a una marcada selectividad en el complejo enzimático de este hongo. Característica que lo hace recomendable para procesos de biorremediación en suelos contaminados con HPA de alto peso molecular (4 o más anillos aromáticos).

Presentation1.jpg

Degradación de HPA en un suelo contaminado

La capacidad para biorremediar un suelo contaminado con HPA se evaluó utilizando la cepa U2010-27A, la cual mostró la mejor asimilación de HPA en cultivos líquidos. Los resultados de agotamiento de antraceno, fluoranteno y pireno en 60 días de ensayo (figura 2) muestran un comportamiento similar al presentado por el hongo en cultivos líquidos (figura 1B), con porcentajes de degradación entre 5 y 10% para antraceno y fluoranteno respectivamente. La pendiente de las curvas indica que la degradación de estos dos HPA se realizó en mayor medida durante los primeros 15 días de ensayo, luego de este periodo la degradación disminuyó con una cinética constante hasta el final del ensayo. Pireno fue el HPA que desapareció en mayor cantidad, agotándose 23,6% al día 60 del ensayo, presentando mayor degradación de este compuesto entre los días 15 y 30 La asimilación sostenida de los HPA sugiere que la cepa U2010-27A mantuvo la producción de esporas durante el ensayo, lo que demuestra que este hongo es capaz de colonizar ambientes distintos al autóctono, ofreciendo versatilidad de hábitat para futuros procesos de biorremediación. Aunque no se analizaron intermediarios metabólicos durante este ensayo [33,35], las concentraciones en los MC (en los cuales no se detectó cambios significativos en las concentraciones de los HPA) confirman la biodegradación de los HPA por la cepa.

Discusión

Se estableció un ensayo preliminar de crecimiento de cepas en diesel comercial previo a los ensayos de crecimiento en HPA, se seleccionó diesel comercial como sustrato selectivo ya que se han reportado informes de crecimiento de hongos en este combustible con potencial para degradar otros hidrocarburos [15]. De acuerdo con Pino et al.[36], el diesel es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene principalmente alcanos, alquenos e hidrocarburos aromáticos, por lo que este ensayo permitió el aislamiento de 10 cepas con la habilidad para crecer en diesel y posiblemente usarlo como fuente de carbono. Las mismas fueron clasificadas e identificadas, obteniéndose 6 géneros diferentes, todos reportados por su capacidad para biodegradar HPA y otros hidrocarburos [29]. Los resultados de crecimiento de estos hongos en los HPA muestran que las cepas aisladas de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca y acíbar de *A. vera* poseen el potencial para crecer en medios de cultivo complementados con antraceno,

fluoranteno y pireno, característica que para las dos primeras fuentes ha sido reportada por Van Hamme et al.[3,31]; Naranjo et al.[20], Acevedo et al.[30]. Sin embargo no se encontraron informes de hongos aislados de acíbar de *A. vera* con capacidad para crecer en HPA, constituyendo este el primer reporte de un hongo aislado de esta fuente con habilidad para crecer en antraceno, fluoranteno y pireno.

Los experimentos anteriores permitieron la selección de tres cepas con la habilidad de crecer y degradar cada uno de los HPA. El ascenso en la cantidad de biomasa proporcional al agotamiento de los hidrocarburos indica que efectivamente los hongos seleccionados son capaces de utilizar los HPA como fuente de carbono y energía, aunque durante las determinaciones cromatograficas no se detectaron picos con áreas relevantes que permitieran afirmar la presencia de compuestos intermedios de la degradación de alguno de los HPA. La cepa U2010-26C *A. oryzae*, un hongo aislado a partir de podredumbre blanca de árbol, mostró porcentajes de degradación entre 5 y 15%. La capacidad de estos hongos lignolíticos para degradar HPA ha sido descrita recientemente por Dashtban et al.[37]; Acevedo et al.[30]; Lladó et al. [38]. De acuerdo con Asgher et al. [39] y Rubilar et al.[40], los hongos aislados de esta fuente son los principalmente utilizados debido a la producción de enzimas oxidativas de importancia en procesos de biorremediación. Aunque esta investigación no abarcó la determinación de enzimas extracelulares asociadas a la degradación de HPA, se sabe que la degradación por hongos lignolítico se produce en dos pasos, primeramente por la acción del sistema hidrolítico que produce hidrolasas responsable de la transformación de macromoléculas y posteriormente por el sistema oxidativo lignolítico, responsable de la degradación de varios contaminantes, entre ellos los HPA [41]. La ventaja de este mecanismo radica en la estructura irregular de la molécula de lignina, que hace que los hongos adaptados a su asimilación produzcan enzimas con muy baja especificidad de sustrato que los hace adecuados para la degradación de diferentes compuestos [42]. Los porcentajes de degradación para U2010-27A *A. versicolor*, muestran que este hongo presentó el mayor crecimiento y degradación de HPA (15-20%) de las cepas evaluadas. Hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo han sido también reportados por Okerentungba et al.[11], el cual aisló e identificó cepas de *Aspergillus* sp de aguas contaminadas con petróleo de los ríos Omuihuechi y New Calabar en Nigeria. La capacidad de *A. versicolor* para degradar HPA ha sido reportada por Uzoamaka et al.[26], el cual describe su alta capacidad para degradar HPA. El mecanismo enzimático para la degradación de HPA para hongos aislados de ambientes contaminados con petróleo ha sido estudiado por Naranjo et al.[20,43] en cuyos informes se reporta evidencias de producción de enzimas lignolíticas, principalmente lacasa y lignina peroxidasa. La degradación de HPA por la cepa U2010-1A *A. nidulans* un hongo aislado de acíbar de la planta de *A. vera* estuvo entre 5 y 15%, reportes de degradación de HPA por hongos aislados de esta fuente no se encontraron, aunque se sospecha que el mecanismo que le permitió a esta cepa metabolizar HPA, podría ser similar al de los hongos lignolítico ya que los componentes principales del acíbar son aloína y emodina, dos antraquinonas complejas que poseen varios anillos aromáticos en su estructura [44].

El ensayo de biorremediación con la cepa U2010-27A de *A. versicolor*, mostró que esta cepa es capaz de disminuir los niveles HPA en un suelo contaminado con 60 días de incubación (tiempos similares de incubación en microcosmos han sido reportados por Potin et al. [21]. La degradación en el MH se comparó con la cantidad de HPA en el MC, se utilizó un control de suelo no estéril con la finalidad de evaluar una posible degradación de HPA por poblaciones indígenas presentes en el suelo [21]. Los resultados evidencian que estas poblaciones no mostraron habilidad para metabolizar ninguno de los HPA, ya que no se detectaron variaciones significativas en la concentración de ninguno de los hidrocarburos. Los niveles de agotamiento de HPA en MH muestran que la cepa U2010-27A, degrada entre el 5 y 25% los HPA presentes en el suelo;

aunque han sido reportados niveles de degradación para *A. versicolor* de hasta 99% de una amplia variedad de HPA entre ellos antraceno, fluoranteno y pireno [26]. Los niveles de transformación y asimilación de HPA en suelos suelen ser bajos comparados con los estudios realizados en cultivos líquidos [45]. Además la degradación presentada por U2010-27A en estos ensayos es frecuente para hongos del género *Aspergillus*, el cual de acuerdo con Pernía et al. [29], son hongos de mínima degradación, con porcentajes que alcanzan el 22%. Comparativamente, la degradación de cada uno de los HPA en el suelo indica que la cepa mantiene su capacidad para degradar preferiblemente compuestos con mayor peso molecular. Este comportamiento es especialmente importante ya que se sabe que la persistencia de los HPA en el medio ambiente aumenta con el tamaño de la molécula, además la toxicidad de estos compuestos se incrementa con el peso molecular y carácter lipofílico [46]. La degradación ascendente y cultivos en placas con PDA tomados de MH demuestran que U2010-27A además de tener la habilidad para colonizar un medio distinto el autóctono, fue capaz sobrevivir durante todo el ensayo. Esta cualidad para de colonizar ambientes distintos a su hábitat, sobrevivir a condiciones de baja disponibilidad de nutrientes y competir con poblaciones indígenas, le confiere a la cepa U2010-27A especiales atributos para la biorremediación de suelos contaminados con HPA.

Conclusión

Este estudio permitió el aislamiento de cepas fúngicas con potencial para degradar antraceno, fluoranteno y pireno. Sucesivos ensayos de degradación en cultivos líquidos con tres cepas seleccionadas mostraron efectiva degradación de los HPA en 20 días de incubación. De estos hongos hidrocarbonoclasticos se seleccionó la cepa U2010-27A de *A. versicolor* para ensayos de biorremediación en un suelo contaminado con los HPA, logrando una disminución en los niveles de los contaminantes, especialmente los de mayor peso molecular. Estos resultados demuestran la capacidad de esta cepa para la biorremediación de suelos contaminados con HPA, por lo que el próximo paso a seguir en la investigación será la evaluación de mayores tiempos de incubación en suelos contaminados y la determinación e identificación de las principales enzimas extracelulares producidas por el hongo.

Presentation2.jpg

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Iván Leál Granadillo (Departamento de Química, UNEFM) por facilitar los estándares utilizados en los análisis de CG. Así mismo, se agradece a los laboratorios de Química General, Análisis Químico y LIADSA de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda por su apoyo al desarrollo de esta investigación.

Referencias

- [1] San Sebastian M, Hurtig A (2004) Oil exploitation in the Amazon basin of Ecuador: a public health emergency. Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health, 15(3):109-116.
- [2] Tisot B, Welte D (1984) Petroleum formation and occurrence, Springer-Verlag. New York. pp 699.
- [3] Van Hamme J, Singh A, Ward O (2003a) Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev 67:503-549.

- [4] Cuadras A, Ramírez N, Rovira E, Marcé R, Borrull F (2012) Evaluación del riesgo asociado a la exposición de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la salud de la población residente alrededor del complejo químico de Tarragona. *Rev. salud ambient*, 12(1):14-25
- [5] Peltonen K, Kuljukka T (1995) Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr*, 710: 93-108.
- [6] Riojas H, Torres L, Moncada I, Balderas J, Gortáres P (2010) Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*, 3(9):120-145.
- [7] Hammel K (1995) Mechanisms for polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Degradation by ligninolytic fungi. *Environmental Health perspectives*, 103:508-512.
- [8] Conesa A, Punt P, Van den Hondel C (2002) Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications. *J Biotechnol*, 193:143-158.
- [9] Tschaplinsk T, González M, Gebre G, Páez A (2000) Soluble carbohydrates, and aloin concentration of Aloe vera plants exposed to three irradiance levels. *Environmen Experimental Botany* 2000; 44: 133-139. *Environmen Experimental Botany*, 44: 133-139.
- [10] Jiménez J (1997) Aislamiento y caracterización de un hongo del género *Aspergillus* que contamina y consume el Acíbar de Aloe vera. *Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1):26-27.
- [11] Okerentugba P y Ezeronye O (2003) Petroleum degrading potentials of single microbial cultures isolated from rivers and effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2(9): 288-292.
- [12] Márquez M, Navas P, López E, Yegres J (2013) Capacidad degradadora de hongos aerógenos aislados en la campana de extracción del laboratorio de VASSA, S.A. sobre desechos del ensayo del punto de anilina para aceites minerales. *Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(1):111-115.
- [13] Prenafeta-Boldú F, Kuhn A, Luykx M, Anke H, Van Groenestijn J, De Bont J (2001) Isolation and characterization of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycol Res*, 105:477-484.
- [14] Pelaéz F, Martinez M, Martinez A (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes evolved in lignin degradation. *Mycol Res*, 99:37-42.
- [15] Bento F, Gaylarde C (2001) Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47: 107–112.
- [16] Abarca M (2000) Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17: 79-84.
- [17] Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- [18] Kohlmeyer J, Volkmann B (1991) Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. *Botanica Marina*, 34: 1-61.
- [19] De Hoog G (2000) *Atlas of Clinical Fungi*, Second Edition, Amer Society for Microbiology, pp1126.

- [20] Naranjo L, Urbina H, De Sisto A, León V (2007) Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25: 1- 9.
- [21] Potin O, Rafin C, Veignie E (2004) Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int. Biodet. Biodegrad*, 54:45-52.
- [22] Yucheng W, Yongming L, Dexun Z, Jinzhi N, Wuxin L, Ying T, Zhengao L (2007) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. *Biodegradation*, 19:247-257.
- [23] Andersson B, Henrysson T (1996) Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 46: 647-652.
- [24] Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*, 28(3):350-356
- [25] Hettige G. y Sheridan J (1984) Mycoflora of stored diesel fuel in New Zealand. *International biodeterioration* 20: 225-227.
- [26] Uzoamaka G, Floretta T, Florence M (2009) Hydrocarbon Degradation Potentials of Indigenous Fungal Isolates from Petroleum Contaminated Soils. *Journal of Physical and Natural Sciences*, 31: 1-6.
- [27] Oudot J, Dupont J, Haloui S, Roquebert M (1993) Biodegradation potential of hydrocarbon-degrading fungi in tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 1167- 1173.
- [28] Chaîneau C, Morel J, Dupont J, Bury E, Oudot J (1999) Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 227: 237–247.
- [29] Pernía B, Demey J, Inojosa Y, Naranjo L (2012) Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3(1):1-40.
- [30] Acevedo F, Pizzul L, Castillo M, González M, Cea M, Gianfreda L, Diez M (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from *Anthracyllum discolor*. *Chemosphere* 80(3): 271-8.
- [31] Van Hamme J, Wong E, Dettman H, Gray M, Pickard M (2003b) Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. *Appl Environ Microbiol*, 69:1320-1324.
- [32] Gianfreda L, Rao M (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme Microb Technol*, 35:339-354.
- [33] Cerniglia C (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3: 351-368.
- [34] Viñas M, Sabaté J, Espuny M, Solanas M (2005) Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Appl Environ Microbiol*, 71: 7008-7018.
- [35] Vila J, Lopez Z, Sabate J, Minguiñon C, Solanas A, Grifoll M (2001) Identification of a novel

metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, 67: 5497–5505.

[36] Pino N, Carvajal S, Gallo A, Peñuela G (2012) Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Rev Producción+Limpia*, 7(1): 101-108.

[37] Dashtban M, Schraft H, Syed T, Qin W (2010) Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol*, 1(1): 36–50.

[38] Lladó S, Gràcia E, Solanas A, Viñas M (2013) Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil. *J. Soil Biology and Biochemistry*, 67:114-123.

[39] Asgher M, Nawaz B, Ashraf M, Legge R (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 19:771-783.

[40] Rubilar O, Diez M, Gianfreda L (2008) Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*, 38: 227-268.

[41] Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv*, 27: 185-194.

[42] Gianfreda L, Rao M, Scelza R, Scotti R (2010) Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *J. soil sci. plant nutr*, 10 (3): 333- 353.

[43] Naranjo L, Pernía B, Guerra M, Demey J, De Sisto A, Inojosa Y, González M, Fusella E, Freitas M, Yegres F (2013) Potential role of oxidative exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extra-heavy crude oil. *Microbial Biotechnology*, 6(6):720–730.

[44] Palanikumar L, Panneerselvam N (2010) Aloin: Medicinal Properties and Future perspectives. *Journal of Pharmacy Research*, 3(11): 2682-2685

[45] Pointing S (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57(1-2):20-33.

[46] Sienra M, Préndez M, Romero R (2002) Metodología para la extracción, fraccionamiento y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en material particulado urbano. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química. Appl Microbiol Biotechnol*, 47(4):

Química Viva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva

Volumen 12, Número 3, Diciembre de 2013

ID artículo: F0181

DOI: no disponible

[Versión online](#)