REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

TEMA:

ESTUDIO *in vitro* DE LAS PROPIEDADES BIODEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS, POR PARTE DE HONGOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

AUTOR: María Cristina Montero Mora

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Manuel L. Pérez Quintana

PUYO - PASTAZA - ECUADOR

07 de Diciembre, 2015

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del informe de investigación sobre el tema: **"ESTUDIO *in vitro* DE LAS PROPIEDADES BIODEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS, POR PARTE DE HONGOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO".** El autor, María Cristina Montero Mora, estudiante de la Carrera de Ingeniería Ambiental, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por Ing. Ricardo Abril, Ing. Leo Rodríguez y la Ing. Angélica Tasambay.

Puyo, 07 de diciembre de 2015

DIRECTOR

……..

Dr. Manuel L. Pérez Quintana

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

MSc. Ricardo Abril

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MSc. Leo Rodríguez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MSc. Angélica Tasambay

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Con cariño expreso mis sinceros agradecimientos:

Mi agradecimiento a Dios por darme fortaleza, bendición y sabiduría para seguir adelante en el camino correcto, a pesar de las adversidades de la vida.

A la Universidad Estatal Amazónica, por brindarme la oportunidad de adquirir todos los conocimientos durante la etapa de mi vida estudiantil para llegar a ser un gran profesional, con la ayuda de todos mis maestros quienes impartieron el esfuerzo, apoyo, consejos y el anhelo de superación en mi ser.

Un especial agradecimiento al Dr. Manuel Pérez, director de tesis, por su esfuerzo, paciencia y dedicación, quien me ha guiado en la redacción del trabajo de investigación de tesis compartiendo sin celo sus saberes, a la Dra. Laura Scalvenzi y el Dr. Naga Raju Maddela quienes con su experiencia, conocimiento y motivación hicieron posible la elaboración del proyecto y el trabajo experimental de tesis, los cuales han sido un ejemplo de superación.

A la Ing. del Laboratorio de Química y Suelos, Deysy Changoluisa, Ing. Responsable del Laboratorio Móvil Leo Rodríguez, Dr. David Sancho, a mi amiga Andreina Valle por sus aportes en la realización de este trabajo.

A mis padres Mario Montero, Amparito Mora, a mi hermano Luis Montero, por su sacrificio, su apoyo, su aliento y por estar en todo momento a mi lado

A Ud. Fernando Montero, quien ha sido mi apoyo incondicional durante toda mi carrera.

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

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis va dedicado a mi padre Mario Montero, a mi madre Amparito Mora, a mi hermano Luis Montero y mis demás familiares, quienes me han demostrado que con paciencia, amor, valentía, sabiduría, dedicación, inteligencia y esfuerzo se puede lograr con éxito mi meta anhelada.

Cristina M.

RESPONSABILIDAD

María Cristina Montero Mora declara bajo juramento que el contenido de esta Tesis de Grado con el tema: **"ESTUDIO *in vitro* DE LAS PROPIEDADES BIODEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS, POR PARTE DE HONGOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO",** es de su autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y que ha consultado y anotado las referencias bibliográficas que se incluyen en el documento, acorde a las normas establecidas en la "Revista Científica Ciencia y Tecnología" de la UEA.

Puyo, 07 de diciembre del 2015

AUTOR

……..

María Cristina Montero Mora

DERECHOS DE AUTOR

El autor cede sus derechos, para que la Institución pueda hacer uso en lo que estime conveniente, siempre y cuando sea para fines investigativos o de consulta.

Puyo, 07 de diciembre del 2015

AUTOR

……..

María Cristina Montero Mora

APÉNDICE

No.	Contenidos	Pág.
1.	**INTRODUCCIÓN……**	13
1.1.	**OBJETIVOS……**	15
1.1.1.	Objetivo general……	15
1.1.2.	Objetivos específicos…….	15
1.2.	Hipótesis general……..	15
2.	**REVISIÓN DE LITERATURA……**	16
3.	**MATERIALES Y MÉTODOS……**	26
3.1.	Localización y duración del experimento……	26
3.2.	Condiciones meteorológicas..……	26
3.2.1	Provincia de Pastaza……..……..	26
3.2.2	Provincia Sucumbíos..……..	26
3.3.	Factores de estudio…….	27
3.4.	Diseño experimental…….	29
3.5.	Mediciones experimentales…….	31
3.6.	Manejo del experimento……	31
3.6.1.	Evaluación de nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio)……..	33
3.6.2.	Evaluación a diferentes niveles de pH……..	34
3.6.3.	Evaluación a diferentes niveles de temperatura……	36
3.6.4.	Evaluación de diferentes concentraciones de contaminantes……	36
3.6.5	Conteo de esporas…….	38
3.7.	Análisis Económico……..	38
4.	**RESULTADOS……**	39
4.1.	Efecto de concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio en la degradación de petróleo crudo y diesel por hongos……..	39
4.2.	Efecto del pH en la degradación de petróleo crudo por hongo……	44
4.3.	Efecto de temperatura en la degradación de petróleo crudo por hongos….	49
4.4.	Efecto de concentración del contaminante en la degradación de petróleo crudo y diésel por hongos……..	54
5.	**DISCUSIÓN……**	59
6.	**CONCLUSIONES……**	65
7.	**RECOMENDACIONES……**	66
8.	**RESUMEN……**	67
9.	**SUMMARY……**	68
10.	**BIBLIOGRAFÍA……**	69
11	**ANEXOS……**	75

INDICE DE TABLAS

No.	Contenido	Pág.
Tabla 1	Efecto de la concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en la degradación de petróleo……	40
Tabla 2	Análisis de varianza para nitrógeno, fósforo y potasio en la degradación de petróleo……	41
Tabla 3	Efecto de concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en la degradación de diésel……	42
Tabla 4	Análisis de varianza para nitrógeno, fósforo y potasio en la degradación de diésel……	43
Tabla 5	Efecto del pH en la biodegradación de petróleo crudo por los hongos en estudio……..	45
Tabla 6	Análisis de varianza para pH en la degradación de petróleo…….	46
Tabla 7	Efecto del pH en la biodegradación de diésel por los hongos en estudio……..	47
Tabla 8	Análisis de varianza para pH en la degradación de diésel…….	48
Tabla 9	Efecto de la temperatura en la biodegradación de petróleo crudo por los hongos en estudio……	50
Tabla 10	Análisis de varianza para la temperatura en la degradación de petróleo crudo……	51
Tabla 11	Efecto de la temperatura en la biodegradación de diésel por los hongos en estudio……	52
Tabla 12	Análisis de varianza para la temperatura en la degradación de diésel…….	53

Tabla 13 Efecto de la concentración de contaminantes en la biodegradación de petróleo crudo por los hongos en estudio……. 55

Tabla 14 Análisis de varianza para la concentración de contaminantes en la degradación de petróleo crudo……. 56

Tabla 15 Efecto de la concentración de contaminantes en la biodegradación de diésel por los hongos en estudio……... 57

Tabla 16 Análisis de varianza para la concentración de contaminantes en la degradación de diésel…… 58

Tabla 17 Número de repeticiones y tratamientos…….. 75

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Contenido	Pág.
Figura 1	Ubicación geográfica de las provincias de Sucumbíos y Pastaza……	27
Figura 2	Fotografía con diferentes factores factores de estudio tales como pH, concentración de sustrato, temperatura y concentración del contaminante……..	32
Figura 3	Fotografía de cultivo de hongo con capacidad de biodegradar petróleo y diésel…….	34
Figura 4	Fotografía de siembra de cultivo de hongos……..	35
Figura 5	Crecimiento fúngico para los distintos hongos en medio mínimo con 1% de diésel después de dos semanas de incubación……	37
Figura 6	Crecimiento fúngico para los distintos hongos en medio mínimo con 1% de petróleo crudo después de dos semanas de incubación……..	37
Figura 7	Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para nitrógeno, fósforo y potasio en la biodegradación de petróleo crudo por hongos……..	41
Figura 8	Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para nitrógeno, fósforo y potasio en la biodegradación de diesel por hongos……	43
Figura 9	Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para concentración de contaminantes en la biodegradación de petróleo crudo por hongos……..	46

Figura 10	Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para pH en la biodegradación de diesel por hongos…….	48
Figura 11	Valor medio e intervalo de confianza al 95% de probabilidad para temperatura en la biodegradación de petróleo crudo…….	51
Figura 12	Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para temperatura en la biodegradación de diesel por hongos……..	53
Figura 13	Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para concentración de contaminante en la biodegradación de petróleo crudo por hongos…….	56
Figura 14	Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para concentración de contaminante en la biodegradación de diesel por hongos…….	58
Figura 15	Cultivo puro de hongos aislados de suelos contaminados con petróleo crudo de la cuidad de Lago Agrio……	77
Figura 16	Fotografía de los elementos que se usó para el estudio…….	77
Figura 17	Fotografía del micelio de los hongos en estudio tomado en cámara de Neubauer…….	78

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la historia de la humanidad, el petróleo ha tenido una trascendental importancia, de hecho ya se conocía y se utilizaba desde el Neolítico. El petróleo es un compuesto químico natural formado por una mezcla homogénea de sustancias orgánicas, en su mayoría hidrocarburos insolubles en el agua. Se forma a partir de residuos de animales, plantas y plancton, y por efecto de la presión ejercida por los sedimentos (Santamaria *et al.* 2009). En la antigüedad el hombre usaba el petróleo como combustible, sellante, adhesivo y también como solvente para otras sustancias. En Mesopotamia se utilizaba el bitumen como sellante de los ladrillos, los fenicios lo empleaban para impermeabilizar el interior de las naves, los egipcios lo utilizaban como sellante de los sarcófagos y en el Oriente ya se consumía como combustible (Ciccio 2013). Hasta 1800 se extraía de forma muy artesanal, encontrándolo disponible de diferentes maneras: afloramientos sobre la superficie terrestre, emanaciones de gas natural, pequeños pozos, etc.

En la Edad Media se usó también como medicamento ya que aliviaba el escorbuto, limpiaba las heridas, coadyuvaba el dolor de dientes, entre otros (Guerrero *et al*. 2013). La demanda de petróleo seguía creciendo debido a su largo uso. En menos de medio siglo esa “mezcla de hidrocarburos” empezó a sustituir al carbón que, hasta aquel entonces, representaba la más común fuente de energía (Pinedo Vega 2005).

Por lo tanto el petróleo toma gran importancia, en la sociedad moderna, desde 1870 y en la actualidad es la fuente de energía más utilizada en el mundo (Santos Silva 2008). Las mayores economías del mundo, fundamentan su desarrollo socio-económico en el uso de ese recurso, empleándolo para la producción de energía eléctrica y mecánica, para usos domésticos e industriales. Esta situación, conjuntamente con el crecimiento de la población mundial, ha llevado al aumento constante de la demanda de petróleo, lo cual ha fomentado la creación de numerosas empresas nacionales e internacionales dedicadas a la búsqueda y

extracción de este apreciado recurso. La explotación del crudo en el Ecuador se inició hace 50 años y ha sido determinante en la economía del país, pues su influencia se estima en un 55-60% del presupuesto general del Estado. Ecuador forma parte de la OPEC (Organization of the Petroleum Exporting Countries). Entró en 1973, posteriormente suspendió su membrecía desde 1992 hasta 2007, y ahora es nuevamente parte de dicha organización.

Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas prácticas y económicas ofrecidas por el petróleo, su extracción y uso ocasionan altos niveles de contaminación al ambiente y problemas de salud para en el hombre (Prendez y Calderon 2013 Conde 2013).

Para reducir los efectos de dicha contaminación, se suele recurrir a la biorremediación. "Bio-remediar" significa utilizar organismos vivos para resolver problemas ambientales como la contaminación del suelo. En un medio no contaminado, las bacterias, los hongos y los otros microorganismos están constantemente degradando la materia orgánica. Si unos compuestos contaminantes, como el petróleo, se vierten intencionalmente o accidentalmente en el ambiente, la mayoría de microorganismos mueren. Sin embargo es muy probable que algunos logren sobrevivir en las nuevas condiciones del entorno en el cual se encuentran, ya que habrán desarrollado la capacidad de degradar los compuestos contaminantes. En otras palabras, se dice que los microorganismos tienen capacidad de "biodegradar" compuestos contaminantes. Sobre estos microorganismos se enfocan los estudios de biorremediación. Habitualmente se realizan estudios preliminares en laboratorio (*ex situ*) y de acuerdo a los resultados obtenidos, se pasa a la fase de campo (*in situ*) (Atlas y Bartha 2002, Ferreira *et al*. 2013).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Estudiar las propiedades de biodegradación de hidrocarburos *in vitro* por parte de hongos aislados de suelos contaminados por hidrocarburos, de la Amazonía ecuatoriana.

1.1.2 Objetivos específicos

OE1.- Aislar hongos con capacidad degradadora de los hidrocarburos de suelos contaminados por petróleo.

OE2.- Comprobar la capacidad de biodegradar hidrocarburos por parte de los hongos aislados de suelos contaminados.

OE3.- Estudiar las condiciones óptimas de crecimiento in vitro de los hongos biodegradadores.

1.2 Hipótesis general

Hongos aislados de suelos contaminados por petróleo tienen la capacidad de biodegradar hidrocarburos *in vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

La contaminación por hidrocarburos es un grave problema alrededor del planeta Tierra, esto se debe especialmente a las actividades de extracción y transporte del petróleo y sus derivados, desde el pozo hasta los lugares de almacenamiento y transformación. Durante el transporte se dan muchas pérdidas de crudo debido a fugas desde los tanques y las tuberías, lo cual provoca grandes problemas de contaminación a nivel de suelo superficial y subsuelo. Esto lleva como consecuencia a problemas de salud pública, ya que el petróleo llega a extenderse hasta el manto freático y por ende pone en riesgo la inocuidad del agua (Mastandrea *et al*. 2013). Adicionalmente, los derrames de petróleo alteran la estructura y fertilidad del suelo llevando a serios problemas de productividad. Varios estudios se han realizado sobre biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos volátiles de gasolina. En Perú se llevó a cabo una investigación sobre la capacidad biodegradadora de la microflora de dos tipos de suelo, uno procedente de lugares de almacenamiento de combustible (M) y otro de un oleoducto (T). La microflora edáfica de las dos muestras demostró capacidad de degradar los hidrocarburos, en proporción del 82.74% para el suelo M y el 76.38% para el suelo T (Deyta y Saval 1998, Acosta *et al*. 2011).

Los derrames de hidrocarburos de petróleo son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas ya que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos. Este tipo de contingencias ambientales origina efectos directos sobre la biota, ya que el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a plantas, animales y humanos pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos, los cuales representan parte importante del ecosistema y son claves para los procesos biogeoquímicos (Vasudevan y Rajaram 2001, Zamora *et al.* 2012).

Se han realizado estudios para la biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos como una función de factores externos, como el tipo y la concentración de fuentes de nitrógeno, de fósforo, el pH y la presencia de

surfactantes (Venosa y Zhu 2003, Das *et al*. 2008, González *et al*. 2013). Por otra parte, se encuentran pocos estudios sobre el efecto del intemperismo de los residuos empetrolados en los suelos, en especial en suelos de clima tropical y de la concentración de estos residuos intemperizados sobre la biorremediación (Trindade *et al.* 2005). Esto aún a sabiendas que este es un problema contemporáneo para los países en desarrollo, considerando el número de áreas contaminadas abandonadas y los aspectos de sostenibilidad, salud y ambientales (Zambrano 2012).

La estructura funcional de las comunidades microbianas ha sido ampliamente utilizada como indicador biológico, debido a la sensibilidad a los cambios y a su capacidad de proveer información que integre diversos factores ambientales. De esta manera, la identificación de grupos funcionales en un determinado ecosistema permite hacer una evaluación precisa de sus propiedades, tales como capacidad de recuperación y regeneración, resistencia a cambios ambientales y potencial degradativo (Alkorta *et al*. 2003).

De acuerdo con el análisis funcional, cada cepa individual que difiere de las demás representa un grupo funcional (GF) distinto dentro de la comunidad. Esta metodología aborda inicialmente la delimitación y cuantificación de GF utilizando la técnica multivariada de agrupamiento (clúster). Este procedimiento permite obtener gráficamente, mediante un dendrograma, las coincidencias en cuanto a la ausencia o presencia de utilización de sustratos de cada cepa, y por tanto, provee una estimación de la similitud total entre las cepas que conforman los grupos. A partir de esta información se puede calcular entonces el índice de diversidad funcional (IDF) donde el valor 1 representa el máximo de diversidad. También se utiliza como criterio de comparación la distancia máxima de agrupamiento (DMA) que separa los grupos funcionales y representa la mayor disimilitud o mayor diversidad funcional (Zamora 2006).

Cabe recalcar que el suelo es un recurso natural no renovable porque requiere de 50 a 100 años para alcanzar un estado de óptima fertilidad. Por ello es importante, frente a estos problemas de derrame de crudo, utilizar tecnologías eficientes y

capacitaciones ambientales para lograr que las compañías petroleras controlen cada proceso que se lleva a cabo, a fin de disminuir los derrames de crudo (Volke y Velasco 2003).

En el sureste de México hay grandes extensiones de suelos contaminados por petróleo, lo cual ha llevado a contaminar también los ecosistemas marinos aledaños. En el año 2009 en México, un tanquero que llevaba 9000 galones de diésel, con destino a la provincia de Cumaná, tuvo un accidente vial debido a las pésimas condiciones del camino y se volcó, vertiendo el diésel que transportaba y causando contaminación de los suelos del talud. Una forma de evitar estos accidentes es que las empresas petroleras cuenten con planes de contingencia, para poder prevenir y aplicar enseguida dichos planes (Rodríguez 2009).

También en la Amazonía ecuatoriana se ha conocido que en el sector de Villano Paparawa (Pastaza) han existido derrames de combustible, lo cual ha afectado las comunidades cercanas del sector, provocando enfermedades de la piel, problemas de fertilidad y productividad del suelo. Esta información se ha recopilada durante las prácticas pre-profesionales de la autora del presente estudio, estudiante de la carrera de Ingeniería Ambiental de la UEA. Muchas veces los más perjudicados no reciben ayuda de inmediato, por lo cual existen hasta casos de muertes en las comunidades, generando grandes molestias e inconformidad en los moradores. En ciertos casos los habitantes demandan a las compañías petroleras por el daño causado tanto al ambiente como a los habitantes de las comunidades.

Los contaminantes ambientales se acumulan en los invertebrados marinos, peces y mariscos y amenazan la salud humana, ya sea directa o indirectamente a través de la cadena alimentaria (Dixon *et al*. 2002). Dentro de este grupo de contaminantes se encuentran el petróleo y sus derivados, que constituyen una de las fuentes de introducción de hidrocarburos al ambiente, al ser componentes del mismo y contener la fracción más tóxica, la cual agrupa a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Nair *et al.* 2008).

Los HAP pueden afectar significativamente a los ecosistemas, influenciando a las comunidades marinas planctónicas y bentónicas, así como a organismos superiores como peces y mamíferos (Pane *et al*. 2005); son reconocidos como potenciales carcinógenos, mutágenos y teratógenos para los seres vivos (Boscolo *et al*. 2007), lo que hace importante el desarrollo de estudios que evalúen su comportamiento en el ambiente.

Para realizar estudios de seguimiento a este tipo de contaminantes se ha recurrido al uso de bivalvos como organismos biomonitores, pues a través del proceso de filtración se favorece la bioacumulación de los diferentes xenobióticos presentes en el ambiente, siendo importantes en evaluaciones de las condiciones del medio que habitan (Page *et al*. 2005, Chec *et al*. 2008).

En algunos países del Pacífico americano la especie *Anadara tuberculosa* (Zambrano, 2012) ha sido empleada como organismo biomonitor en diversos estudios de contaminación marina (Herrero *et al*. 1999), siendo utilizada para predecir exposición, efectos y susceptibilidad ante la presencia de sustancias antropogénicas (Sericano *et al*. 1995). Esta especie ha sido seleccionada en monitoreos tendientes a evaluar contaminantes como metales pesados, plaguicidas e hidrocarburos en el Pacífico colombiano (Sericano *et al*. 1995, Calero & Zambrano 1997) donde además, se destaca como el molusco de mayor interés comercial, llegando a constituir el 96% de la producción total de bivalvos del país (Incoder 2007).

Otro estudio se dio en la zona de explotación de la cuenca de Falcón en Venezuela, en Yaracal, en la cual existen quince pozos abandonados de viejas explotaciones petroleras, donde todavía sigue brotando crudo de forma natural. Dichas afloraciones afectan el ecosistema. Al momento se están realizando estudios acerca de los parámetros tanto físicos como biológicos del suelo, por ello se está determinando la presencia de metales que se encuentran en el suelo contaminado, para comprobar si se hallan dentro de los valores permisibles de las normativas ambientales (Noguera y Armado 2010).

Varios estudios se están realizando sobre la biodegradación de suelos contaminados por derrames de petróleo, es decir la degradación de hidrocarburos mediante el uso de microorganismos presentes en el mismo suelo. La biorremediación aligera los métodos para mitigar la contaminación ambiental, ya que los microorganismos crecen y se desarrollan a condiciones de temperatura, pH y atmósfera normales del ambiente.

La biodegradación es muy eficaz, conveniente y amigable con el medio ambiente. Es eficaz ya que los microorganismos, con capacidad de degradar hidrocarburos, realizan dicha actividad de una forma efectiva, debido a su propio metabolismo, y permiten la transformación de los hidrocarburos dañinos en compuesto químicamente más simples y, por lo general, de menor toxicidad. La biodegradación es conveniente y amigable con el medio ambiente ya que los microorganismos actuando a condiciones de temperatura, presión y pH propios del entorno natural, no necesitan de condiciones extremas de los mismos factores. Esto disminuye los costos y permite llevar procesos que tienen bajo impacto ambiental. Esta alternativa contribuirá a reducir los inconvenientes presentados en las industrias petroleras (Volke y Velasco 2003).

El sector del petróleo y del gas natural genera varios residuos peligrosos, entre estos, los residuos empetrolados que pueden presentar compuestos tóxicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y ser inflamables. Estos residuos empetrolados son generados en las operaciones normales de las unidades, en las paradas para mantenimiento y en los casos de emergencia ambiental, incrementando su cantidad. La gestión ambiental de los residuos con miras a minimizar los efectos adversos de los eventos de contaminación ambiental por residuos aceitosos, el desarrollo sostenible y los costos relacionados con las operaciones de almacenamiento, transporte y tratamiento de los residuos son preocupaciones actuales, tanto del sector industrial, como del sector académico (Ferreira *et al*. 2013).

Existen dos etapas de biodegradación de suelos contaminados: La fase *ex situ* y la fase *in situ*.

La fase de biodegradación *ex situ* consiste en el estudio de las capacidades biodegradadoras fuera del lugar en el cual se encuentran los microorganismos. Por lo general se refiere a condiciones de laboratorio. La muestra es tomada desde el medio ambiente y posteriormente trasladada al lugar de estudio. La ventaja del estudio *ex situ* es que se pueden controlar las condiciones de trabajo como temperatura de crecimiento, medio de cultivo, pH, humedad, entre otras.

La fase de biodegradación *in situ* consiste en aplicar en campo los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio. La experimentación *in situ* requiere de cuidados especiales a fin de que los microorganismos, que han dado rendimiento en laboratorio, puedan trabajar de la mejor manera en campo con condiciones más adversas, comparado con aquellas de laboratorio (Atlas y Bartha 2002).

Para que disminuyan los problemas de contaminación en el medio ambiente, es necesario investigar mejores métodos de extracción y a la vez buscar tecnologías que puedan biorremediar los sitios contaminados con derrames de petróleo. Martínez (2011) evaluó el proceso de biorremediación aeróbica de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo empleando lodos residuales (biosólidos), provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) domésticas, como fuente alterna de macro y micronutrientes. La contaminación del suelo fue resultado de derrames accidentales de diesel, aceite y grasas en la unidad minera San Antonio perteneciente al grupo Goldcorp México, ubicada en el municipio de San Dimas, en Tayoltita, Durango. Se realizaron experimentos a escala laboratorio y piloto, ajustados a capacidad de campo y a una relación carbono: nitrógeno (C: N) = 10:1, en los cuales se evaluaron el efecto de la adición de nutrientes, la densidad del material a remediar y la influencia del tamaño de la partícula en el proceso de degradación. Se demostró que los lodos residuales propiciaron la estimulación de los microorganismos nativos del suelo y estos últimos, a su vez, fueron los responsables de degradar los hidrocarburos. Los hidrocarburos fueron empleados como fuente de carbono y donadores de electrones, acoplando la reacción de óxido–reducción con el oxígeno que fungió como aceptor de electrones.

Barrios (2011) señala que en las últimas décadas, paralela al desarrollo de la industria petrolera, ha aumentado la contaminación en los diferentes ecosistemas extractivos. Plantea que el vertimiento de petróleo crudo y sus derivados provocan efectos negativos a corto, mediano y largo plazo. La eliminación natural de estos contaminantes puede tardar años, e incluso no ocurrir. Para acelerar este proceso y garantizar la reparación del ecosistema dañado, se emplean técnicas de biorremediación. Esta variante emergente de la biotecnología ambiental, se basa en el empleo de la actividad metabólica microbiana (bacterias, hongos, levaduras y algas) para degradar los hidrocarburos del petróleo. Su aplicación tiene dos propósitos esenciales: la bioestimulación de la población autóctona viable, y la bioaumentación (introducción de poblaciones microbianas viables). Su selección requiere el análisis de factores abióticos y bióticos, que influyen en el proceso de biodegradación. Los primeros incluyen los relacionados con el contaminante y las condiciones medioambientales; y los bióticos, lo referente a la población microbiana. En el desarrollo de esta tecnología, se han formulado varios productos comercializables para la limpieza de desastres: fertilizantes construidos por nutrientes con funciones bioestimuladoras; bioproductos conformados por microorganismos; y productos químicos con la función de aumentar o estimular la población microbiana que interviene en el proceso de biodegradación.

De acuerdo a Andrade *et al*. (2010) dada la eficiencia comprobada de la biorremediación en la degradación de compuestos tóxicos para seres humanos tales como benceno, tolueno, etilbenceno e xilenos, diversas empresas, principalmente relacionadas con consultorías y remediación ambiental han despertado gran interés por la implementación de técnicas de biorremediación para tratar áreas contaminadas. En países desarrollados como Estados Unidos, Canadá y varios países de Europa, las técnicas bioquímicas de remediación son muy usadas para el tratamiento de suelos contaminados por residuos de petróleo. En países como Brasil y otros en Latinoamérica los proyectos de biorremediación están en el campo de la teoría con pocos casos prácticos.

Gómez *et al.* (2009) hicieron la biorremediación de un suelo contaminado con la mezcla de combustibles gasolina-diesel a escala de laboratorio, para evaluar la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación. La reducción en la concentración de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en un periodo de tres meses fue del 52.79 % para el tratamiento por atenuación natural, 60.45 % para el tratamiento por bioestimulación y del 64.92 % para el tratamiento por bioaumentación. Para la inoculación del tratamiento por bioaumentación se aisló una bacteria con capacidad para degradar hidrocarburos, la cual fue identificada como *Bacillus* sp.

Cuna *et al*. (2010) caracterizaron una muestra de suelo proveniente de un sistema de biorremediación en actividad y determinaron la capacidad de la comunidad bacteriana de biodegradar petróleo y sus destilados e identificar los principales microorganismos involucrados en el proceso. Para esto se tomaron una muestra de suelo por la técnica de *lanfarming* y caracterizaron sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas; así como el tipo de hidrocarburos que contenía por extracción con Soxhlet y cromatografía en columna de sílica gel. A partir de la muestra extrajeron la comunidad bacteriana, y determinaron su potencial para biodegradar petróleo, sus diferentes fracciones y los destilados comerciales que se obtienen a partir de él. Utilizaron métodos indirectos de medición del crecimiento bacteriano por conteo de microorganismos y medición de densidad óptica. A partir de estos sistemas aislaron 41 cepas.

Los principales resultados, obtenidos por estos autores, indicaron que la comunidad bacteriana del suelo posee la capacidad de biodegradar los hidrocarburos existentes en el mismo, principalmente la fracción alifática, así como los destilados gasoil, kerosén y aceite lubricante, siendo la fracción aromática, la polar y el destilado nafta no degradados. Está comunidad estaba constituida principalmente por *Rhodococcus erythropolis, Achromobacter xylosoxidans y Brevundimonas* diminuta, mostrando la mayor biodiversidad cuando los hidrocarburos utilizados como fuente de carbono pertenecen al grupo de los alifáticos. A partir de los resultados encontrados por estos investigadores

concluyen que las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo indicaron que es factible que se realice una biorremediación eficiente de los hidrocarburos presentes.

Cuna (2012) optimizó los parámetros de humedad, temperatura y relación de nutrientes para estimar la posibilidad de aplicar la técnica de biorremediación en un suelo contaminado con hidrocarburos. Para esto realizaron una caracterización inicial del suelo contaminado en función de sus características físicas y químicas, su cantidad de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos. También estudiaron la concentración del contaminante por método gravimétrico y por cromatografía gaseosa. Para optimizar humedad y temperatura trabajaron en microcosmos con humedades de 3%, 10%, 15% y 20% y temperaturas de 5°C, 15°C, 28°C y 37°C, con un seguimiento de la mineralización de los hidrocarburos midiendo el CO_2 producido. Para optimizar la relación de nutrientes diseñaron microcosmos diferentes que fueron monitoreados por consumo de oxígeno y por determinación de hidrocarburos por cromatografía gaseosa. Las relaciones C: N: P que estudiaron fueron 100:20:2, 100:10:1, 100:5:0,5 y 100:1:0,1. Los resultados que obtuvieron indican que la mineralización de hidrocarburos fue óptima para humedades de 10% a 20% y a temperaturas entre 25°C a 37°C con valores de producción de CO^2 de 3000 a 4500 mg CO2.kg–1. La relación óptima C:N:P fue de 100:1:0,1 donde observaron el mayor consumo de oxígeno y la remoción de 83% de los hidrocarburos totales determinados por cromatografía gaseosa, con 78% y 89% de eliminación de los hidrocarburos n–alcanos y poliaromáticos, respectivamente.

Paza (2013) evaluó la actividad ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) de 90 cepas fúngicas las cuales fueron divididas en dos grupos: 85 cepas de hongos filamentosos que fueron obtenidas del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia y 5 cepas de levaduras aisladas de tierras contaminadas con petróleo. Tres métodos de screening para CHMO fueron empleados: (i) por medio de la evaluación cualitativa por cambio de

pH (viraje de color del indicador), se identificaron 3 cepas con potencial actividad enzimática, de las cuales se observó que la cepa 177 QD presentó un consumo de 41 mm al lapso de 30 horas, (ii) mediante ensayo colorimétrico para determinación de cetonas cíclicas; posteriormente se midió la actividad enzimática (iii) mediante la monitorización espectrofotométrica de la depleción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), la cual dio una actividad de 90 UI/L. Se procedió a identificar la cepa más activa mediante sus características macroscópicas y microscópicas, que la relacionan con *Aspergillus flavus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización y duración del experimento

El trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Biología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en la provincia de Pastaza, cantón Pastaza, parroquia Puyo, en el Km 2 1/2 vía a Napo. Los hongos objeto de estudio son aislados de muestras de suelos contaminados por petróleo, recolectadas en la Provincia de Sucumbíos, Cantón Lago Agrio.

3.2 Condiciones meteorológicas

3.2.1 Provincia de Pastaza

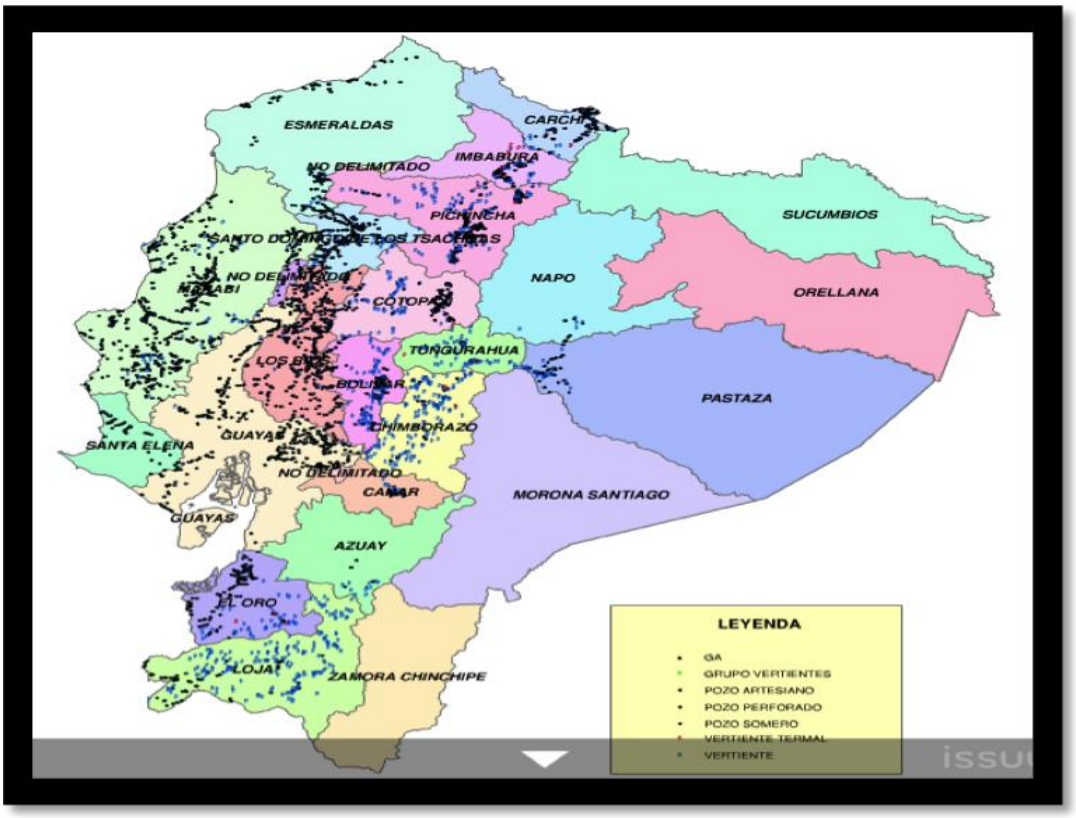
Puyo es la capital de la Provincia de Pastaza y se encuentra ubicada en la Amazonía Ecuatoriana. Está situada a 950 msnm, a una latitud de 01º30' y una longitud de 77º56'. La extensión de la provincia es de 29520 Km^2, los límites al Norte son con la Provincia de Napo y Orellana, al Sur con Morona Santiago, al este con Perú y al oeste con Tungurahua. El clima es cálido-húmedo con una temperatura entre los 18 ºC y 23 ºC y las precipitaciones son alrededor de 4500 mm por año (INAMHI, 2012).

3.2.2 Provincia Sucumbíos

El cantón Lago Agrio se encuentra en la provincia de Sucumbíos, ubicada al Noroeste de la Región Amazónica del Ecuador, cuenta con un clima tropical húmedo y una temperatura entre 37 ºC y 39 ºC y las precipitación son alrededor de 1998.45 mm por año (INAMHI, 2012).

En el cantón Lago Agrio se tomaron las muestras de suelo contaminado con petróleo. En la figura 1 se muestra el mapa de la Provincia de Sucumbíos, cantón Lago Agrio y de la Provincia de Pastaza.

Figura 1. Ubicación geográfica de la Provincia de Sucumbíos y la Provincia de Pastaza



Fuente: (INAMHI, 2012).

3.3 Factores en estudio

Las variables independientes:

- **Capacidad de biodegradación:** Es la propiedad de cada una de las cepas de hongos para degradar los hidrocarburos utilizados

- **pH:** Es la concentración de iones hidrógeno, a la vez es la medida de acidez y alcalinidad presentes en determinadas disoluciones.

- **Temperatura (grados Celsius):** Es la unidad termométrica con una escala de 0 a 100. La escala de Celsius es muy utilizada para expresar las temperaturas de uso cotidiano desde la temperatura del aire, suelos seres vivos.

- **Concentración de sustrato (porcentaje de petróleo):** Son compuestos orgánicos presentes en el petróleo crudo con acción contaminante, sobre lo que actúan los cultivos de hongos para degradarlos.

- Concentración de nutrientes (N, P, K): Son las moléculas orgánicas e inorgánicas constituyentes de los diferentes organismos, se consideran nutrientes azucares, grasas, proteínas, vitaminas y minerales. En el presente trabajo e utilizaron N, P, K para el aislamientos de hongos filamentosos.

La variable dependiente:

- Número de esporas al final: Son estructuras reproductoras de los hongos que permite su reproducción. Las esporas pueden ser sexuales y asexuales, las esporas son también importantes en el ciclo de plantas, permite entender la capacidad de crecimiento de un hongo.

- Degradación de diesel y petróleo crudo: Es a capacidad que tienen algunos hongos para degradar los compuestos de difícil trasformación que están presentes en el diesel y en el petróleo crudo.

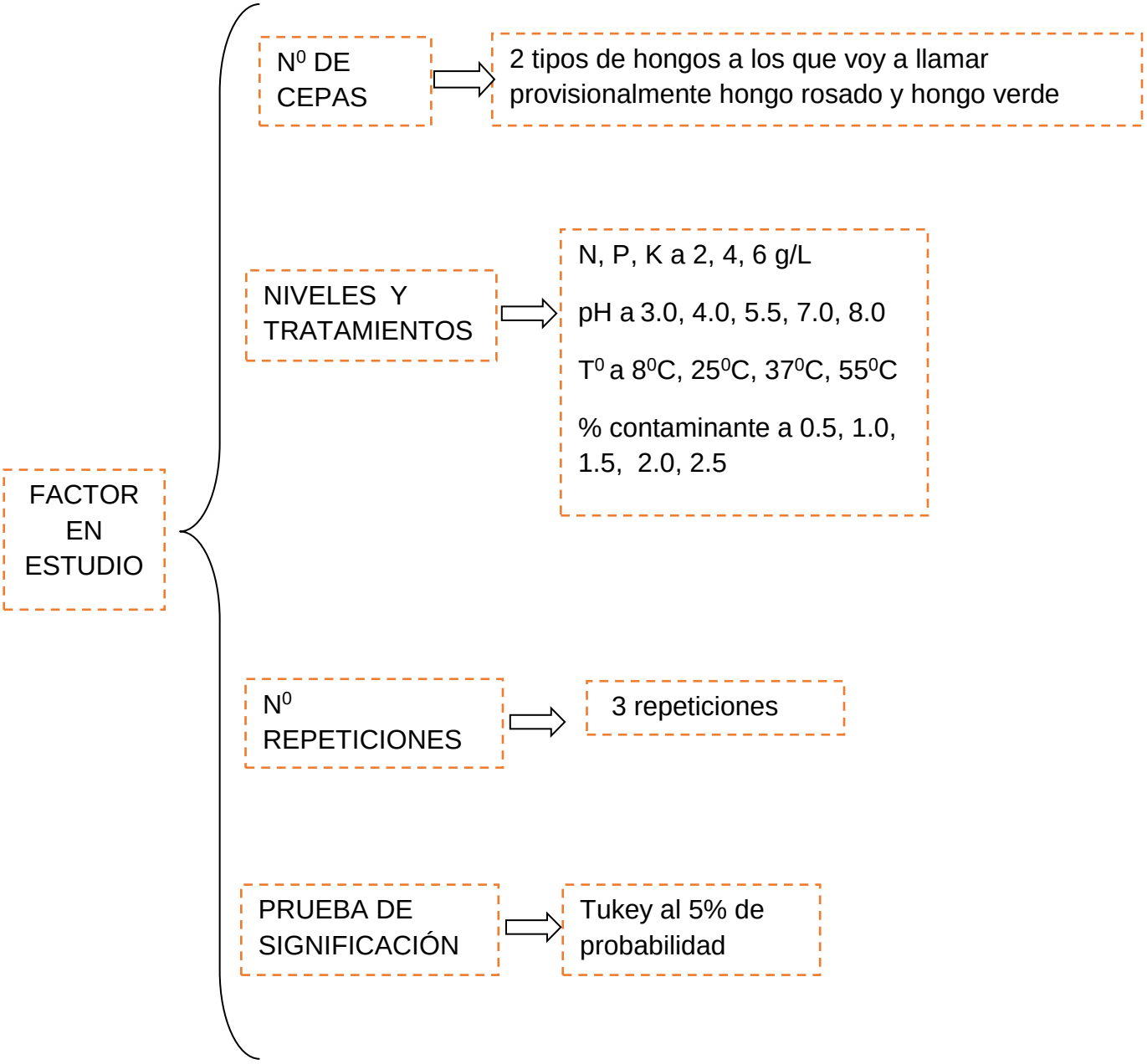
- Crecimiento del hongo: Es la producción de largos filamentos llamados hifas lo que son muy importantes para el supervivencia y producción. Las hifas se reúnen para formar el micelio o cuerpo de hongo.

3.4 Diseño experimental

Los hongos objeto de estudio se cultivaron en medios de cultivos específicos bajo diferentes valores de pH, temperatura, concentración de sustrato y de nutrientes. Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizados. Se estudió el comportamiento de los hongos frente a seis diferentes valores de pH, tres valores de temperatura, cuatro valores de concentración de sustrato y tres valores de concentración de los 3 nutrientes. Cada ensayo fue realizado por triplicado. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (factor de concentración vs. cepas o hongo).

El análisis post-ANOVA que se empleó, fue la prueba de significación Tukey (1977) en un diseño completamente aleatorizado.

Esquema de los factores en estudio



Elaborado por: Cristina Montero

3.5 Mediciones experimentales

Las mediciones experimentales de las variables consideradas se describen a continuación:

- Propiedad del hongo de biodegradar hidrocarburos: la propiedad se evaluó mediante observación directa de la presencia o ausencia del hidrocarburo puesto en el medio de cultivo. La desaparición del hidrocarburo significó que el hongo tiene propiedades biodegradadoras.

- pH, temperatura, concentración de sustrato, concentración de nutrientes: la medición de dichas variables se evaluó el crecimiento del micelio del hongo en los diferentes ensayos, mediante filtración y posterior pesaje del micelio fúngico

3.6 Manejo del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la UEA, en fases sucesivas correspondientes a los 3 objetivos específicos planteados:

OE 1. (Aislar hongos con capacidad degradadora hacia los hidrocarburos de suelos contaminados por petróleo). Se aplicó el método de las diluciones sucesivas y sub cultivo con agua peptonada, PDA (potato dextrose agar), cajas Petri, tubos de ensayo, microscopio, pipetas graduadas, vaso de precipitación, tubos de ensayo, probetas, matraces Erlenmeyer, varilla de agitación, asa de inoculación y otros.

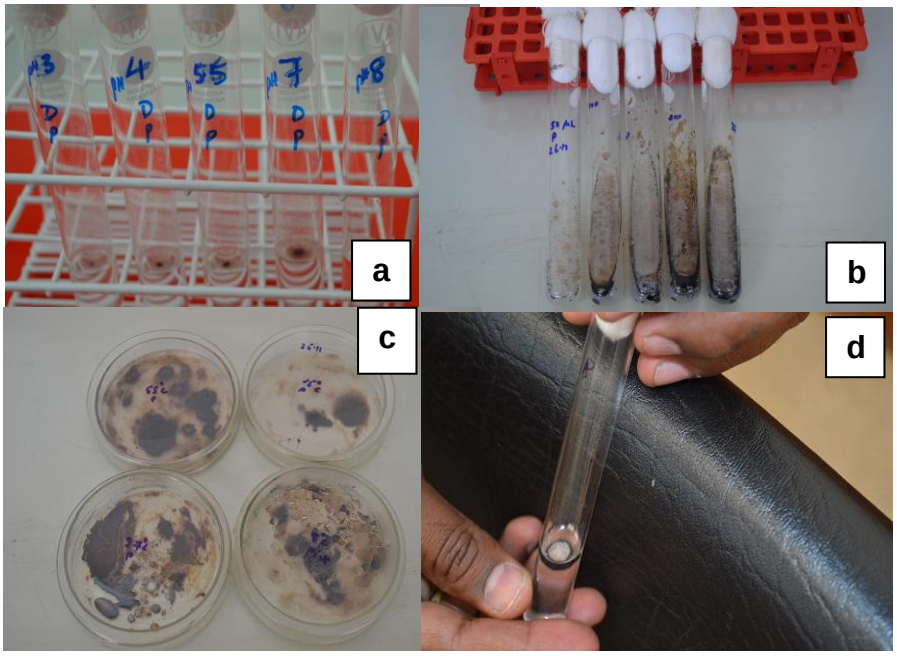
Desde suelos contaminados con hidrocarburos se aislaron hongos edáficos, mediante el método de las diluciones sucesivas utilizando medio de cultivo PDA (Potato-Dextrose-Agar). Se obtuvieron cultivos mixtos de hongos. Sucesivamente se procedió a aislar los hongos a fin de obtener cultivos puros de los mismos. Estos se utilizaron para comprobar la presencia o ausencia de la propiedad degradadora de hidrocarburos.

OE2. (Comprobar la capacidad de biodegradar hidrocarburos por parte de los hongos aislados de suelos contaminados). Los hongos se cultivaron en medios líquidos y sólidos, individuales y en consorcio. Se usó dos tipos de hongos (rosado y verde claro). Para este tratamiento se utilizó cajas Petri, pipetas, plato agitador, matraces Erlenmeyer, vasos de precipitación, asa de inoculación, varilla de agitación, HPLC Y GLC entre otros.

Los hongos puros se cultivaron en medio líquido MSM (*Minimum Salt Medium*), previamente inoculado con diferentes concentraciones de hidrocarburos como única fuente de carbono. Posteriormente se evalúo el crecimiento del micelio fúngico en presencia del hidrocarburo. La desaparición del hidrocarburo fue índice de que el hongo ha degradado el compuesto, caso contrario el microorganismo no tiene dicha propiedad y por lo tanto se observó la presencia de hidrocarburos en el medio de cultivo líquido.

OE3. (Estudiar las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos biodegradadores). Se cultivaron los hongos en medio líquido (MSM) a diferentes condiciones como el pH, la temperatura (ºC), la concentración de sustrato (petróleo y diesel) y la concentración de nutrientes (N, P, K) a fin de determinar las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos objeto de estudio, se observó las esporas de hongos en la cámara de Neubaur y el microscopio.

Figura 2. Fotografía con los diferentes factores de estudio tales como:



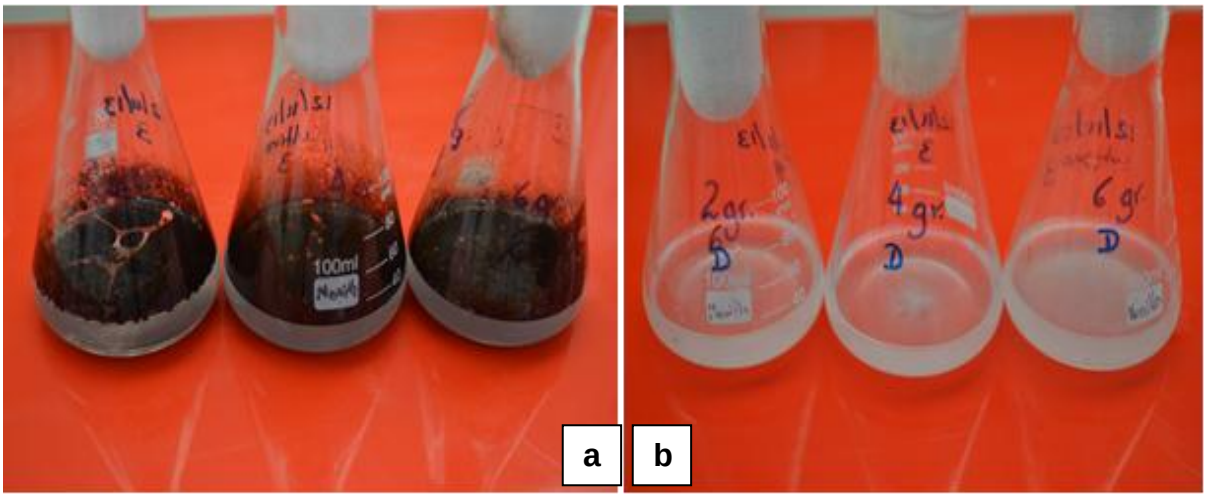
a) pH, b) concentración de sustrato, c) temperatura, d) concentración del contaminante.

3.6.1 Evaluación de nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) en la degradación de petróleo crudo y diesel por hongos.

Se suplementó a 50 ml de MSM (medio mínimo sales) con 5 ml de diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio (2, 4 y 6 g/L) más 45 ml de agua destilada, en tres tubos de ensayo. El pH del medio se ajustó a 5.5 para cada tubo con ácido clorhídrico 1 N. Se añadió Agar a 20 g/L a cada tubo, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Se añadieron 150 µL de petróleo crudo al 1% a cada tubo. Se mezcló cada tubo con agar fundido MSM y se mantuvieron en una posición inclinada. Posteriormente, cada tubo se inoculó con 50 µL de la suspensión de esporas con una concentración conocida de esporas de hongos de color rosa o verde. Todos los tubos se cultivaron a temperatura ambiente y se mantuvieron incubado durante 14 días.

Finalmente, se añadió un volumen conocido de agua destilada estéril (5 mL) a cada tubo para separar las esporas que constituyeron la suspensión de esporas. El número de esporas en la suspensión se determinó mediante el uso de cámara de Neubaur. Se registró la cantidad inicial y final de esporas de cada tratamiento.

Figura 3. Fotografía de cultivo con capacidad de biodegradar



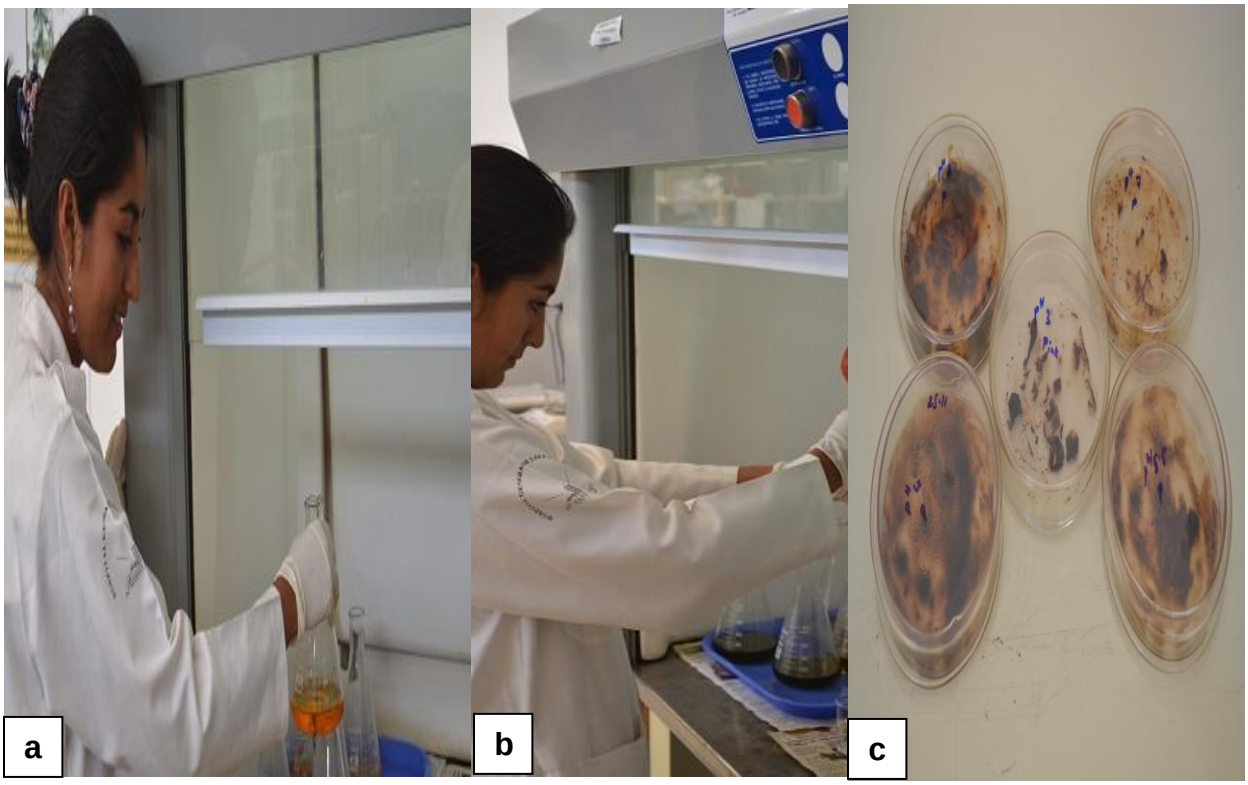
a) Petróleo crudo, b) diesel con diferentes concentraciones (2, 4, 6 gr) de N, P, K.

3.6.2 Evaluación a diferentes niveles de pH en la degradación de petróleo crudo y diesel por hongos.

Se prepararon 45 ml de MSM (medio mínimo de sales) de agar para cada muestra en Erlenmeyer de 100 ml. Se ajustaron por separado con diferentes valores de pH (3, 4, 5.5, 7, 8) y se dispensaron a placas petri esterilizadas a 121 °C durante 15 minutos. Para cada valor de pH se utilizó dos cultivos de hongos (rosado y verde claro) por separado. Se inocularon 150 µL de petróleo crudo y diesel (concentración final 1%) en cada placa Petri. La incubación se realizó en incubadora por un tiempo de 14 días a 25 °C .Seguidamente, se prepararon tubos de ensayo con 15 ml de agar fundido MSM a cada tubo. Para su correcta solidificación se mantuvieron los tubos en una posición inclinada en la cámara de

flujo laminar. A continuación se inocularon con 50 µL de esporas de hongos tanto de color rosado como claro. Todos los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron durante 14 días a 25 °C. Finalmente, se añadió un volumen conocido de agua destilada estéril (5mL) a cada tubo, todas las esporas se tomaron en el agua con la cual se preparó una suspensión de esporas. El número de esporas se determinó utilizando cámara de Neubaur para el conteo y registro de las colonias de hongos.

Figura 4. Fotografía de siembra de cultivo de microorganismos con diversas Temperaturas



a) Erlenmeyer b) cámara de flujo lamina c) cajas Petri con 5 temperaturas.

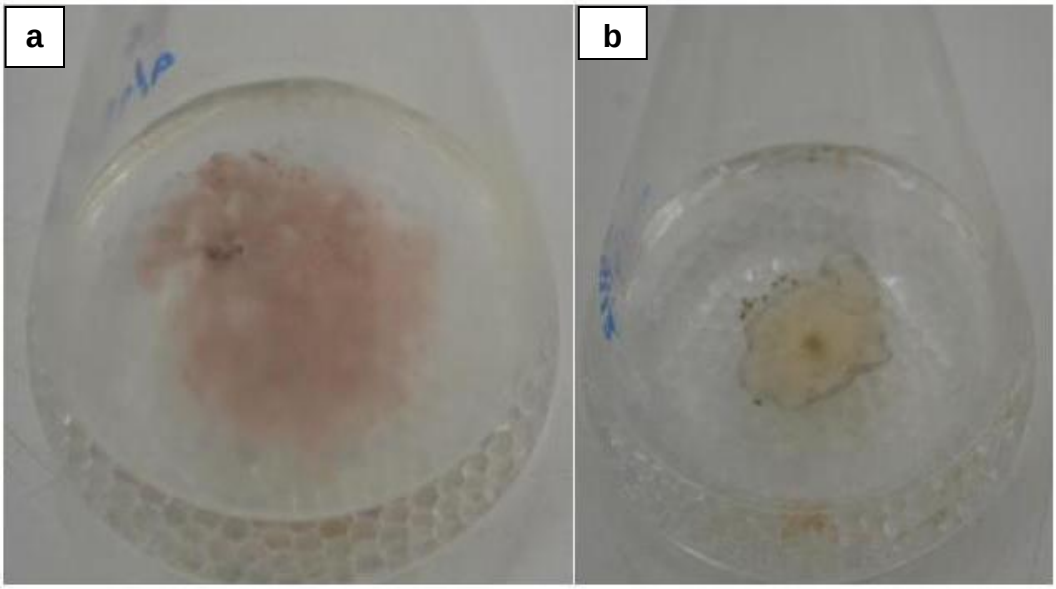
3.6.3 Evaluación a diferentes niveles de temperatura en la degradación de petróleo crudo y diesel por hongos.

Se prepararon 80 ml de MSM (medio mínimo de sales) de agar en erlenmeyer de 100 ml a pH 5.5. Seguidamente, el medio se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Se prepararon 8 tubos con 10 ml de medio estéril cada uno. En cada tubo de ensayo se colocaron 100 µL de petróleo crudo y diesel y se dejó que solidifique. Posteriormente, se incuban a diferentes temperaturas (8, 25, 37 y 55 °C) con 3 repeticiones. Por último, se añadió un volumen conocido de agua destilada estéril (5 mL) a cada tubo para desprender las esporas y preparar una suspensión de esporas. El número de esporas se determinó utilizando cámara de Neubaur.

3.6.4 Evaluación de diferentes concentraciones de contaminantes en la degradación de petróleo crudo y diesel por hongos.

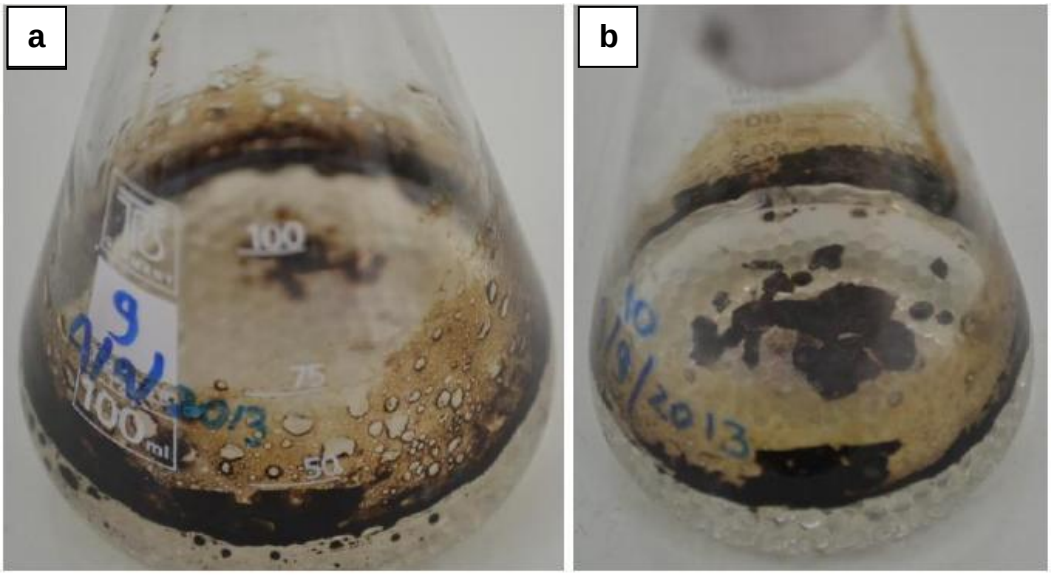
Se prepararon 100 ml de MSM (medio mínimo de sales) de agar al 2% en erlenmeyer de 150 ml a pH 5.5. Seguidamente, el medio se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Se prepararon 10 tubos con 10 ml de medio estéril cada uno. En cada se colocaron (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5%) de contaminante, se utilizan 3 repeticiones. En cada tubo se colocan 100 µL de petróleo crudo y diesel y se dejó que solidifique. Posteriormente, se incubaron a una temperatura de 25 °C. Por último, se añadió un volumen conocido de agua destilada estéril (5 mL) a cada tubo para desprender las esporas y preparar una suspensión de esporas. El número de esporas se determinó utilizando cámara de Neubaur.

Figura 5. El crecimiento fúngico con diesel



a) Hongo rosado b) Hongo verde claro en el medio mínimo de sales líquido que contiene 1% de diesel después de 2 semanas de período de incubación.

Figura 6. El crecimiento fúngico con petróleo



a) Hongo Verde claro b) Hongo Rosado en medio mínimo de sales líquido que contiene el petróleo crudo al 1% después de 2 semanas de período de incubación**.**

3.6.5 Conteo de esporas.

El conteo de esporas, para todos los tratamientos, se llevó a cabo, primero añadiendo 5 mL de agua destilada en cada placa para desprender los hongos (rosado y verde claro). Posteriormente, se colocó en la cámara de Neubaur y se contaron las esporas en el microscopio. En la cámara se realizó el conteo de tres cuadrantes escogidos al azar. Se registró los datos obtenidos en una tabla para el hongo rosado y hongo verde.

3.7 Análisis Económico

El costo de la investigación se atribuyó al proyecto Prometeo, dirigido por el Dr. Naga Raju Maddela y la Dra. Laura Scalvenzi. Se envió muestras para analizar al laboratorio CESTA LAB de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo para determinar las características de los del hongo en estudio.

4 RESULTADOS

4.1 Efecto de concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio en la degradación de petróleo crudo y diesel por hongos.

En las tablas 1 y 3 se muestran los resultados relacionados con el efecto de la concentración de nitrógeno, fósforo y potasio (N,P,K) en la biodegradación de petróleo crudo y diésel por hongos filamentosos aislados de muestras de suelos de diferentes regiones de Lago Agrio (comunidad de Sarayaku E 974576.881. N10001527.083) de la provincia de Sucumbíos en Ecuador que estaban contaminados con petróleo.

En el análisis de varianza y prueba de significación mostrados en la tabla 2 y 4 se observan diferencias ($P \leq 0.05$) entre los dos hongos que crecieron en presencia de petróleo crudo en cuanto al conteo de esporas, sin embargo no existen diferencias entre los niveles de N, P, K. Cuando los hongos crecieron en presencia de diesel no se observan diferencias ni en los niveles de N, P, K ni entre tipos de hongos. Por tanto para la degradación de petróleo crudo el mejor comportamiento se demuestra con el hongo verde claro. Los valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad se presentan en la figura7 y 8 donde se puede ver que la varianza es significativa.

Tabla 1. Efecto de la concentración de nitrógeno, fósforo y potasio (N, P, K) en la biodegradación de petróleo crudo por hongos, según el número total de esporas.

Concentración de N,P,K en g/L de petróleo	Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)	Repeticiones			Media
		1	2	3	
HONGO ROSADO Número de esporas					
2.0	1.69×10^6 (50 µL of 3.4×10^7/mL)	1.1×10^7	2.4×10^6	5.4×10^6	6.3×10^6
4.0		1.3×10^7	6.2×10^6	5.6×10^6	8.3×10^6
6.0		7.6×10^6	8.8×10^6	5.0×10^6	7.1×10^6
HONGOS VERDE CLARO					
2.0	5.75×10^5 (50 µL of 1.2×10^7/mL)	8.8×10^6	8.4×10^6	7.4×10^6	8.2×10^6
4.0		8.2×10^6	7.8×10^6	8.6×10^6	8.2×10^6
6.0		1.0×10^7	8.4×10^6	9.6×10^6	9.4×10^6

Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Diferencia entre los dos cultivos de hongos para P≤0.05 (Tukey, 1977)

Tabla 2. Análisis de varianza ANOVA para N, P, K. (petróleo crudo)

N,P,K	cepas o tipo de hongo	Medias	n	E.E.	Columna6	Columna7
6	2	15,35	3	0,77670005	A	
4	2	13,2633333	3	0,77670005	A	
2	2	13,26	3	0,77670005	A	
2	1	5,23333333	3	0,77670005		B
4	1	2,43333333	3	0,77670005		B
6	1	2,15666667	3	0,77670005		B

Figura 7. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para nitrógeno, fósforo y potasio en la biodegradación de petróleo crudo por hongos

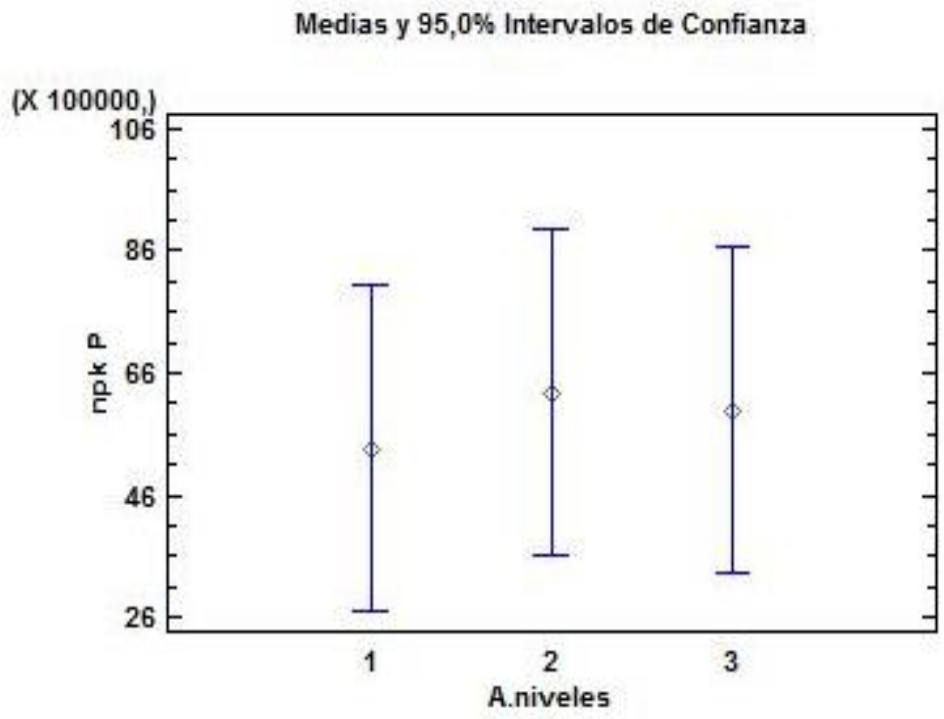


Tabla 3. Efecto de concentración de N, P, K en la degradación de diésel por hongos expresado en el número total de esporas.

Concentración de NPK en g/L	**Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)**	**Repeticiones**			**Media**
		1	**2**	**3**	
ROSADO					
2.0	3.46×10^5 (50 µL of 6.92×10^6/mL)	1.04×10^7	1.6×10^7	0.88×10^7	1.17×10^7
4.0		0.56×10^7	0.48×10^7	1.6×10^7	0.88×10^7
6.0		1.04×10^7	1.52×10^7	2.4×10^7	1.65×10^7
HONGO VERDE CLARO					
2.0	4.26×10^5 (50 µL of 8.52×10^6/mL)	1.28×10^7	0.56×10^7	0.4×10^7	0.7×10^7
4.0		0.72×10^7	3.2×10^7	2.08×10^7	2×10^7
6.0		0.96×10^7	0.72×10^7	0.48×10^7	0.72×10^7

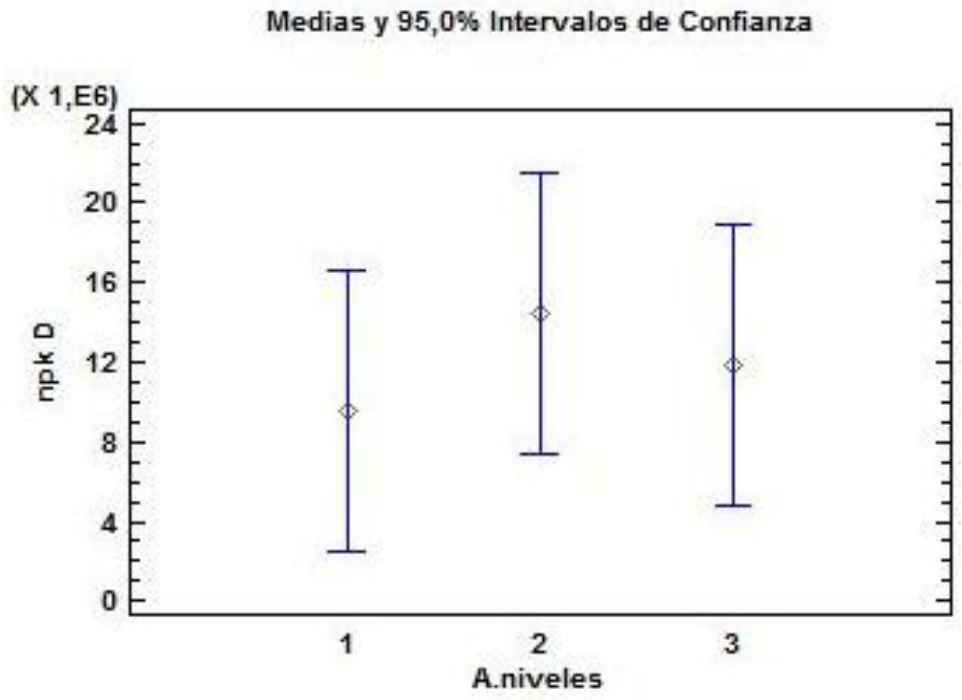
Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA para N, P, K. (diesel)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	**2864,05638**	**5**	**572,811275555556**	**1,8621358091633**	**0,175093779284125**
N,P, K	**336,572578**	**2**	**168,286288888889**	**0,547077088221191**	**0,592410537794988**
cepas o tipo de hongo	**331,2738**	**1**	**331,273799999999**	**1,07692853116292**	**0,319845146530999**
N,P, K*cepas o tipo de hongo	**2196,21**	**2**	**1098,105**	**3,5697981691056**	**0,0607422439621325**
Error	**3691,31793**	**12**	**307,609827777778**		
Total	**6555,37431**	**17**			

CV 57.66

Figura 8. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para nitrógeno, fósforo y potasio en la biodegradación de diesel por hongos**.**



4.2 Efecto del pH en la degradación de petróleo crudo por hongos.

En la tabla 5 y 7 se muestran los resultados relacionados con el pH en la biodegradación de petróleo crudo y diesel por hongos aislados de muestras de suelos contaminados con crudo, localizado en la provincia de Sucumbíos.

En el análisis de varianza y prueba de significación expuestos en la tabla 6 y 8 se observan diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los dos hongos (rosado y verde claro) en cuanto al conteo de esporas, tanto para el petróleo crudo como para el diesel.

No existen diferencias ($P \leq 0.05$) entre los niveles de pH ni en diesel ni en petróleo crudo. Los mayores valores de degradación de petróleo se encontraron en el hongo verde claro, mientras que para la degradación de diesel el hongo rosado tuvo los mayores valores, en cuanto a conteo de esporas. Los valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad se presentan en la figura 9 y 10 donde se puede ver que la varianza es mínima.

Tabla 5. Efecto del pH en la biodegradación de petróleo crudo por hongos expresado en el número total de esporas.

pH	Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)	Repeticiones			Media
		1	2	3	
ROSADO					
3.0	1,17 × 10^6 (50 µL of 2.3×10^7/mL)	1 × 10^6	1 × 10^6	4.3 × 10^6	2.1 × 10^6
4.0		5.15 × 10^6	4.5 × 10^6	5 × 10^6	4.88 × 10^6
5.5		1.75 × 10^6	2.7 × 10^6	2.8 × 10^6	2.42 × 10^6
7.0		2.5 × 10^6	2.75 × 10^6	1.8 × 10^6	2.35 × 10^6
8.0		1.4 × 10^6	1.85 × 10^6	3.8 × 10^6	2.35 × 10^6
HONGO VERDE CLARO					
3.0	1,17 × 10^6 (50 µL of 2.3×10^7/mL)	6.8 × 10^6	12.8 × 10^6	3.2 × 10^6	7.6 × 10^6
4.0		9.2 × 10^6	7.4 × 10^6	7.0 × 10^6	7.9 × 10^6
5.5		5.4 × 10^6	8.4 × 10^6	5.8 × 10^6	6.5 × 10^6
7.0		7.2 × 10^6	12.8 × 10^6	13.2 × 10^6	11.1 × 10^6
8.0		5.8 × 10^6	5.8 × 10^6	5.4 × 10^6	5.7 × 10^6

Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA para pH (petróleo)

pH	Media s	n	E.E.	Columna5
7	4,73333333	6	0,73856655	A
4	4,44666667	6	0,73856655	A
3	3,145	6	0,73856655	A
5,5	2,82666667	6	0,73856655	A
8	2,42833333	6	0,73856655	A

Figura 9. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para pH en la biodegradación de petróleo crudo por hongos.

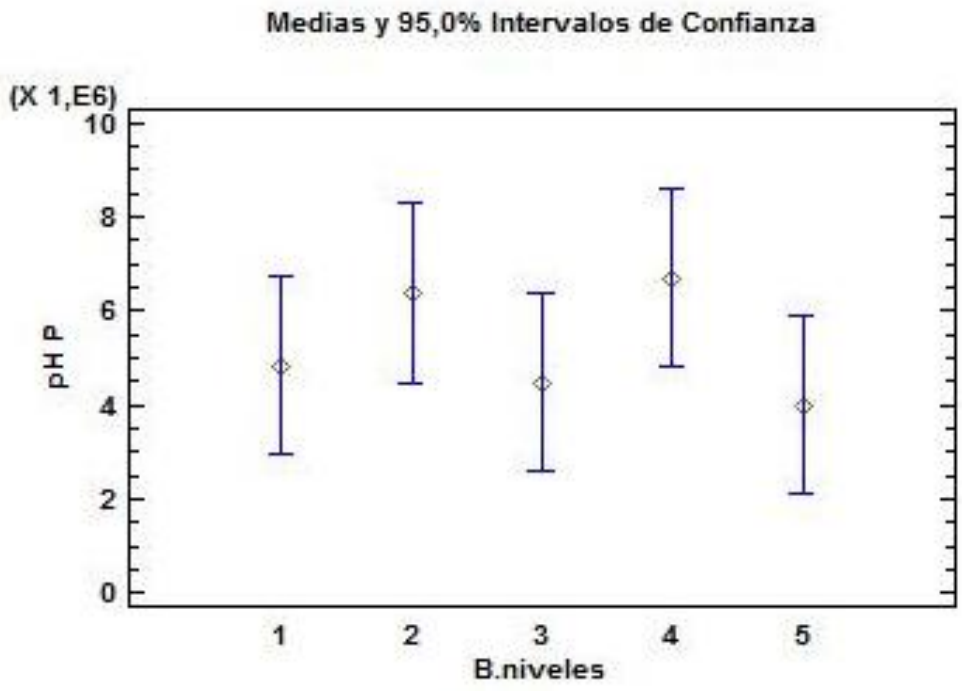


Tabla 7. Efecto del pH en la degradación de diésel por hongos expresado en el número total de esporas.

pH	Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)	Repeticiones			Media
		1	2	3	
ROSADO					
3.0	3.46×10^5 (50 µL of 6.92×10^6/mL)	1.08×10^8	6.4×10^7	3.2×10^7	6.8×10^7
4.0		1.04×10^8	7.2×10^7	4×10^7	7.2×10^7
5.5		4×10^7	6.4×10^7	7.2×10^7	5.9×10^7
7.0		1.12×10^8	8×10^7	2.4×10^7	21.6×10^7
8.0		5.33×10^7	4×10^7	4.4×10^7	4.6×10^7
HONGO VERDE CLARO					
3.0	4.26×10^5 (50 µL of 8.52×10^6/mL)	6.64×10^7	3.36×10^7	2.72×10^7	4.24×10^7
4.0		1.28×10^7	1.2×10^7	1.04×10^7	1.17×10^7
5.5		3.04×10^7	1.76×10^7	6.72×10^7	3.84×10^7
7.0		1.92×10^7	1.6×10^7	1.6×10^7	1.71×10^7
8.0		1.52×10^7	0.96×10^7	1.36×10^7	1.28×10^7

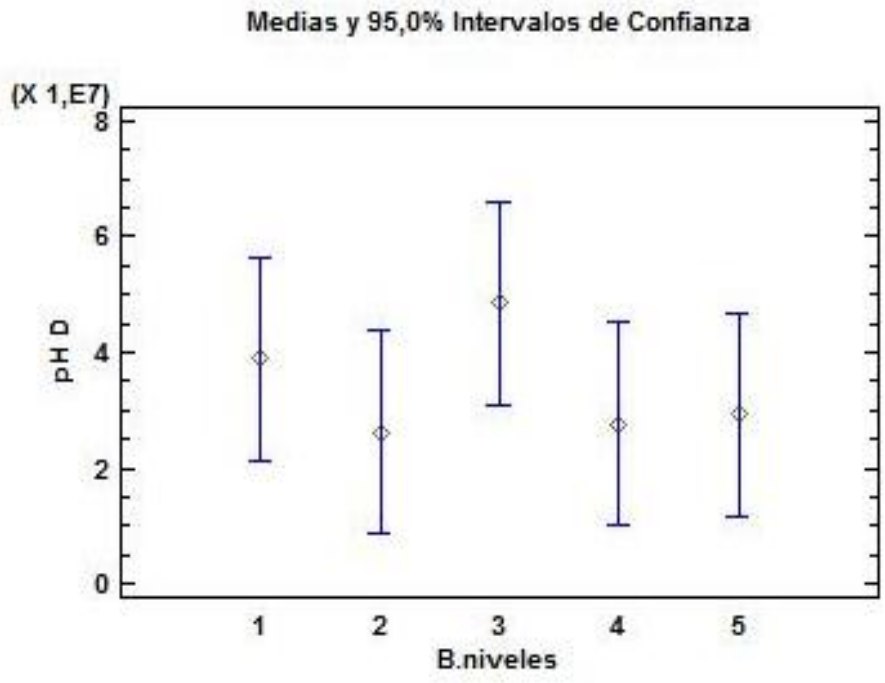
Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Tabla 8. Análisis de varianza ANOVA para pH (diesel)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	**4682,5801**	**9**	**520,286677407407**	**1,60118414156039**	**0,181963555176082**
pH	**1566,28625**	**4**	**391,571561666667**	**1,20506290484112**	**0,339539471158822**
cepas o tipo de hongo	**2054,9308**	**1**	**2054,93080333333**	**6,3240570192898**	**0,020573791506413**
pH*cepas o tipo de hongo	**1061,36305**	**4**	**265,340761666667**	**0,816587158847309**	**0,529581673470381**
Error	**6498,7738**	**20**	**324,93869**		
Total	**11181,3539**	**29**			

CV 63,92

Figura 10. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para pH en la biodegradación de diesel por hongos.



4.3 Efecto de temperatura en la degradación de petróleo crudo y diésel por hongos.

En la tabla 9 y 11 se muestran los resultados relacionados con el efecto de la temperatura en la biodegradación de petróleo crudo y diésel por hongos aislados de muestras de suelos traídas de la ciudad de Lago Agrio.

El análisis de varianza ANOVA y prueba de significación realizada con el programa InfoStat, se presenta en las tablas 10 y 12 donde se demuestra que existen diferencias ($P \leq 0.05$) entre los dos hongos (rosado y verde claro) en cuanto al conteo de esporas con valores estadísticamente significativo en el tratamiento con petróleo crudo.

Entre los niveles experimentales no existen diferencias en el conteo de esporas en las diferentes temperaturas estudiadas. Sin embargo, con el diésel si hay diferencias significativas entre niveles en estudio, pero no entre los tipos de hongo. Los valores medios e intervalos de confianza se presentan al 95% de probabilidad. Se puede observar en la figura 11 y 12 que la varianza es pequeña.

Tabla 9. Efecto de temperatura en la biodegradación de petróleo crudo por hongos expresado en el número total de esporas.

Temperatura °C	Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)	Repeticiones			Media
		1	2	3	
ROSADO					
8	1,17 × 10^6 (50 µL of 2.3×10^7/mL)	6 × 10^5	9 × 10^5	7.5 × 10^5	7.5 × 10^5
25		2.4 × 10^6	2.35 × 10^6	2.05 × 10^6	2.26 × 10^6
37		13.5 × 10^5	9 × 10^5	7 × 10^5	9.83 × 10^5
55		20 × 10^5	6.5 × 10^5	9.5 × 10^5	1.2 × 10^6
HONGO VERDE CLARO					
8	1,17 × 10^6 (50 µL of 2.3×10^7/mL)	9.2 × 10^6	9.0 × 10^6	11.8 × 10^6	1.0 × 10^7
25		1.4 × 10^7	2.22 × 10^7	1.4 × 10^7	1.7 × 10^7
37		1.2 × 10^7	6.2 × 10^6	4.0 × 10^6	7.4 × 10^6
55		2.0 × 10^7	1.7 × 10^7	1.6 × 10^7	1.8 × 10^7

Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Tabla 10. Análisis de varianza ANOVA para Temperatura en (petróleo crudo)

Temperatura	Medias	n	E.E.	Columna5	Columna6
55	9,14333333	6	1,14690071	A	
25	7,12	6	1,14690071	A	B
8	4,965	6	1,14690071	A	B
37	3,095	6	1,14690071		B

Figura 11. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para temperatura en la biodegradación de petróleo crudo por hongos.

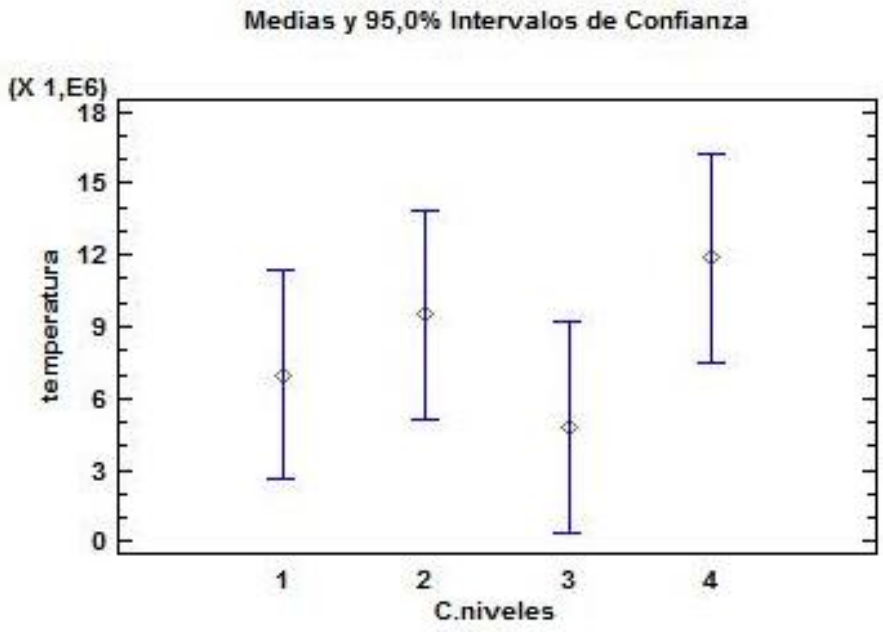


Tabla 11. Efecto de temperatura en la degradación de diésel por hongos expresado en el número total de esporas.

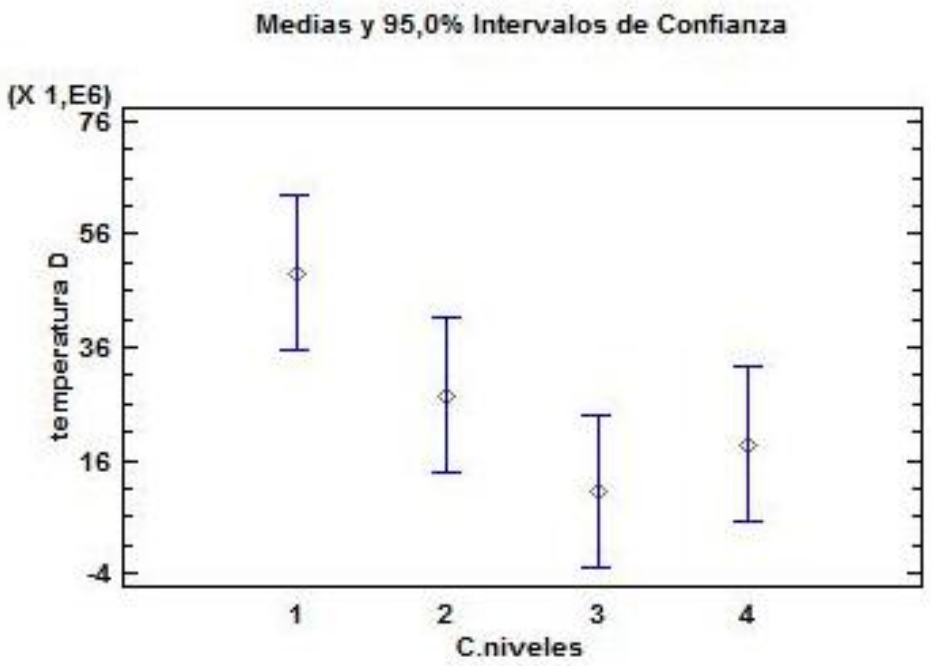
Temperatura °C	Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)	Repeticiones			Media
		1	2	3	
ROSADO					
8	3.46×10^5 (50 µL of 6.92×10^6/mL)	9.36×10^7	8.16×10^7	3.2×10^7	6.9×10^7
25		2.16×10^7	2.56×10^7	2.48×10^7	2.4×10^7
37		0.72×10^7	0.88×10^7	2.32×10^7	1.3×10^7
55		2.4×10^7	2×10^7	3.12×10^7	2.51×10^7
HONGO VERDE CLARO					
8	4.26×10^5 (50 µL of 8.52×10^6/mL)	4.08×10^7	1.52×10^7	3.12×10^7	2.91×10^7
25		1.92×10^7	4.32×10^7	3.12×10^7	3.12×10^7
37		0.64×10^7	0.96×10^7	0.8×10^7	0.8×10^7
55		0.88×10^7	1.44×10^7	1.52×10^7	1.28×10^7

Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Tabla 12. Análisis de varianza ANOVA para Temperatura en (diesel)

Temperatura	Medias	n	E.E.	Columna5	Columna6
8	132,923333	6	15,5851633	A	
25	70,3033333	6	15,5851633	A	B
55	50,245	6	15,5851633		B
37	27,2716667	6	15,5851633		B

Figura 12. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para temperatura en la biodegradación de diesel por hongos.



4.4 Efecto de concentración del contaminante en la degradación de petróleo crudo y diésel por hongos.

En las tablas 13 y 15 se presentan los resultados relacionados con la concentración de contaminante en la biodegradación de petróleo crudo y diésel por hongos aislados de muestras de suelos contaminados tal como se mencionó anteriormente.

El análisis de varianza ANOVA y prueba de significación realizadas con el programa InfoStat, se presenta en las tablas 14 y 16 se observa que no hubo diferencias ($P \leq 0.05$) entre los dos hongos (rosado y verde claro) ni en los niveles de concentración de petróleo y de diesel evaluados, expresados en el conteo de esporas. Los valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad se puede observar en la figura 13 y 14 donde se puede observar que la varianza es pequeña.

Según los resultados obtenidos en el tratamiento con petróleo crudo y diesel el hongo más efectivo es el hongo verde claro con un mayor valor en la media.

Tabla 13. Efecto de la concentración de contaminante en la biodegradación de petróleo crudo por hongos expresado en el número total de esporas.

Cantidad de contaminante %	Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)	Repeticiones			Media
		1	2	3	
ROSADO					
0.5	1.36×10^6 (50 µL of 2.7×10^7/mL)	1.54×10^7	1.52×10^7	1.76×10^7	1.6×10^7
1.0		2.2×10^6	3×10^6	1.8×10^6	2.6×10^6
1.5		5.4×10^6	7.6×10^6	11×10^6	8.0×10^6
2.0		4.4×10^6	7.4×10^6	8.2×10^6	6.7×10^6
2.5		8.4×10^6	5.8×10^6	5×10^6	6.4×10^6
HONGOS VERDE CLARO					
0.5	$1,17 \times 10^6$ (50 µL of 2.3×10^7/mL)	7.2×10^6	8.6×10^6	1.28×10^7	9.5×10^6
1.0		1.24×10^7	5.8×10^6	6.4×10^6	8.2×10^6
1.5		5.2×10^6	4.2×10^6	4.4×10^6	4.6×10^6
2.0		3.8×10^6	1.58×10^7	5.8×10^6	8.5×10^6
2.5		9.6×10^6	7×10^6	7×10^6	7.8×10^6

Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Tabla 14. Análisis de varianza ANOVA para Concentración de Contaminante % en (petróleo crudo)

Cantidad de contaminante	Medias	n	E.E.	Columna5
2,5	4,715	6	0,73003691	A
2	3,045	6	0,73003691	A
1,5	2,69333333	6	0,73003691	A
0,5	2,02166667	6	0,73003691	A
1	1,77333333	6	0,73003691	A

Figura 13. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para concentración del contaminante en la biodegradación de petróleo crudo por hongos

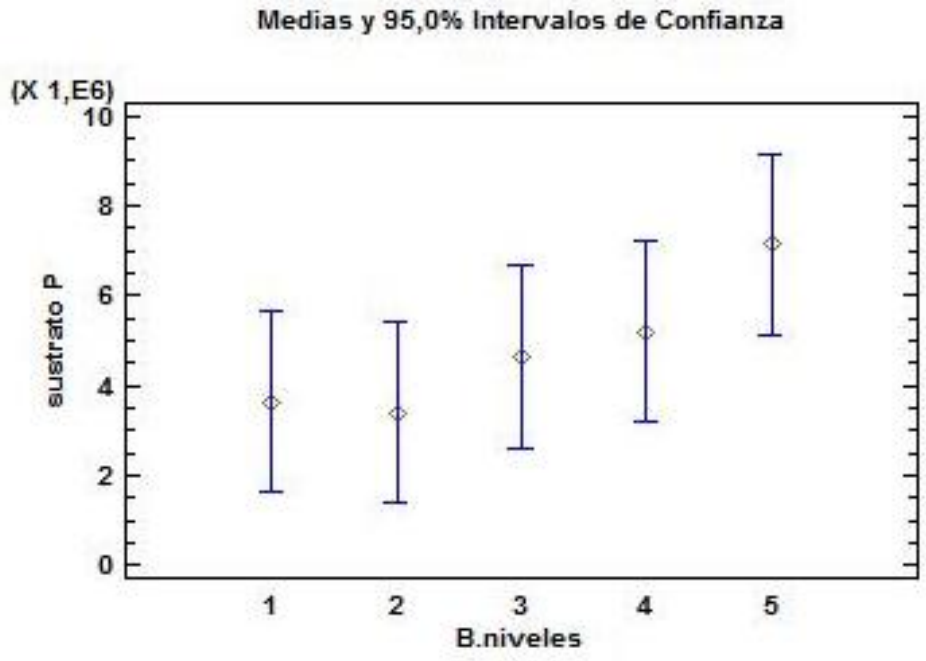


Tabla 15. Efecto de concentración de contaminante en la degradación de diésel por hongos expresado en el número total de esporas.

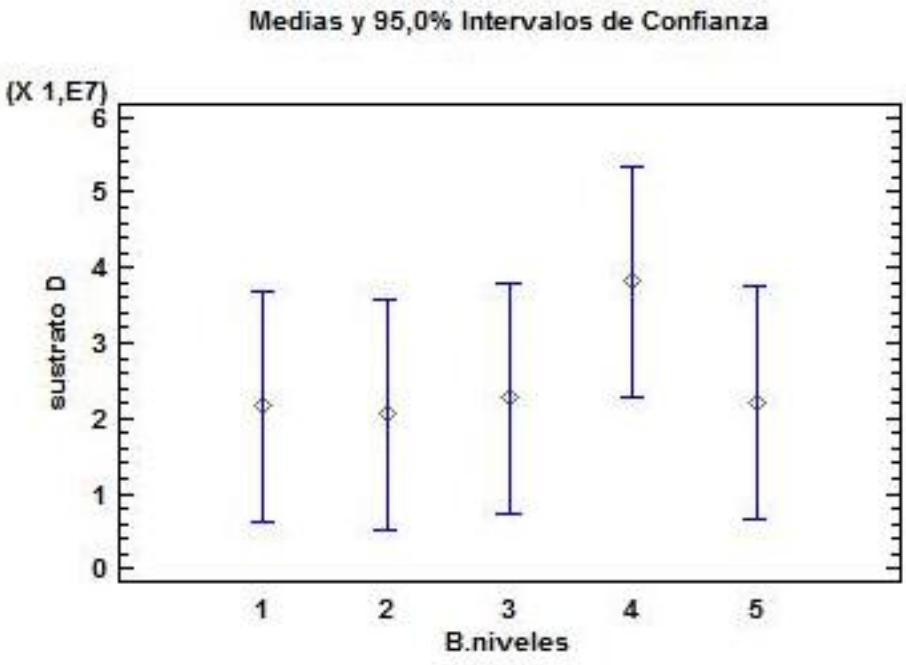
Cantidad de contaminante %	Cantidad de esporas en el comienzo del experimento (Promedio de triplicado)	Repeticiones			Media
		1	2	3	
ROSADO					
0.5	3.46×10^5 (50 µL of 6.92×10^6/mL)	2.64×10^7	1.6×10^7	2.32×10^7	2.19×10^7
1.0		2.64×10^7	1.6×10^7	1.28×10^7	1.84×10^7
1.5		2.16×10^7	1.66×10^7	2.56×10^7	2.16×10^7
2.0		1.76×10^7	1.68×10^7	1.76×10^7	1.73×10^7
2.5		2.4×10^7	1.84×10^7	1.68×10^7	1.97×10^7
HONGO VERDE CLARO					
0.5	4.26×10^5 (50 µL of 8.52×10^6/mL)	2.16×10^7	1.92×10^7	2.32×10^7	2.1×10^7
1.0		1.68×10^7	2.08×10^7	3.04×10^7	2.26×10^7
1.5		1.12×10^7	4.8×10^7	1.28×10^7	2.4×10^7
2.0		8.64×10^7	11.2×10^7	7.92×10^7	9.25×10^7
2.5		0.56×10^7	1.2×10^7	5.6×10^7	2.45×10^7

Fuente: (M. Nagga Raju *et al* Cristina Montero, 2014)

Tabla 16. Análisis de varianza ANOVA para Concentración de Contaminante % en (diesel)

% contaminante	Medias	n	E.E.	Columna5
2	93,22	6	16,9622368	A
1,5	57,9033333	6	16,9622368	A
2,5	56,3116667	6	16,9622368	A
0,5	55,6366667	6	16,9622368	A
1	52,1933333	6	16,9622368	A

Figura 14. Valores medios e intervalos de confianza al 95% de probabilidad para concentración del contaminante en la biodegradación de diesel por hongos.



Los hongos aislados según sus características tales como forma de micelio, tipo de estructura de esporas, pertenecen al género Penicillium.

5. DISCUSIÓN

La posibilidad de contar con cultivos de hongos que se desarrollen en un medio de cultivo mínimo en relación a las concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio y en presencia de petróleo permitiría la obtención de biopreparados con estos agentes biológicos, de utilidad en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos crudos. En tal sentido, este elemento podría ser un factor que contribuya al saneamiento ambiental en ecosistemas muy contaminados por derrames de hidrocarburos en diferentes regiones del Ecuador, con énfasis en la provincia de Sucumbíos. Estos hongos aislados de muestras de suelos contaminados por petróleo crudo son cultivos que se han adaptado o sobrevivido a niveles elevados de estos contaminantes, por ello su elevada capacidad para crecer en tales condiciones (Volke y Velasco 2003).

En trabajos precedentes se han realizado estudios para la biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos en función de factores externos, como el tipo y la concentración de fuentes de nitrógeno, de fósforo, el pH y la presencia de surfactantes (Venosa y Zhu 2003, Das *et al.* 2008, González *et al*. 2013). Los anteriores autores muestras resultados relacionados con la biorremediación similares a los encontrados en el presente trabajo.

Martínez (2011) evaluó el proceso de biorremediación aeróbica, que favoreció la actividad de hongos, de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo empleando lodos residuales (biosólidos), provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) domésticas, como fuente alterna de macro y micronutrientes. Estos experimentos se realizaron a escala de laboratorio y piloto, ajustados a capacidad de campo y a una relación carbono: nitrógeno (C:N) = 10:1, en los cuales se evaluaron el efecto de la adición de nutrientes, la densidad del material a remediar y la influencia del tamaño de partículas en el proceso de degradación. Se demostró que los lodos residuales propiciaron la

estimulación de los microorganismos nativos del suelo y estos últimos, a su vez, fueron los responsables de degradar los hidrocarburos. Es este trabajo los hidrocarburos fueron empleados como fuente de carbono y donadores de electrones, acoplando la reacción de óxido–reducción con el oxígeno que fungió como aceptor de electrones.

Según Infante *et al.* (2010) el nitrógeno y el fósforo juegan un papel importante en la biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, sin embargo, según estos autores poco conocen sobre el efecto del potasio (K). Ellos evaluaron el uso de tres relaciones carbono: potasio, con y sin adición de nitrógeno y fósforo, sobre la biorremediación de un suelo franco arenoso contaminado con un crudo mediano. En sus trabajos determinaron las tasas de degradación y biodegradación, expresadas como porcentaje del contenido inicial de crudo a los 0, 15, 45 y 60 días. Asimismo, midieron la producción de CO_2, y realizaron análisis cualitativos de las fracciones de hidrocarburos remanentes mediante cromatografía de gases con detector de ionización a la llama en los tratamientos con N, P y K. La tasa de degradación (que incluye las pérdidas por procesos abióticos) y la tasa de biodegradación (que no incluye las pérdidas por procesos abióticos) resultaron mayores (72-75 % en 60 días) en los tratamientos con N (C/N: 60) y P(C/P: 800) con cualquiera de las relaciones C/K evaluadas (C/K: 200 C/K: 400, C/K: 600). Adicionalmente, obtuvieron una mayor producción de CO_2 y registraron una disminución marcada de las parafinas lineales. Estos resultados demuestran que la utilización de K, en combinación con N y P, proporciona un incremento en la tasa de biodegradación. Este resultado pudiera considerase para reforzar el crecimiento de los hongos evaluados para investigaciones posteriores.

Por otro lado, la posibilidad de contar con cultivos de hongos que se desarrollen en un medio de cultivo mínimo en relación a los valores de pH (3, 4, 5.5, 7, 8) en

presencia de petróleo crudo y diesel brinda la posibilidad de usarlo como agentes descontaminantes en los suelos contaminados con hidrocarburos crudos. En tal sentido podría ser un factor que contribuya a la depuración del ambiente ya que en la actualidad existen varios lugares que son afectados por derrames excesivos de petróleo siendo los más perjudicados los seres vivos del planeta tierra. Dada la capacidad que tienen estos hongos de biodegradar tanto crudo como diesel en un amplio rango de pH es posible su empleo en la biorremediación de diferentes ambientes con grados de acidez variables.

Méndez *et al.* (2007), consideraron que la biodegradación del polietileno por microorganismos es una solución para la reducción de la contaminación por plásticos, productos obtenidos a partir de petróleo. En el trabajo ellos muestran los resultados del aislamiento y caracterización de cultivos de hongos capaces de degradar el polietileno, así como la determinación de las condiciones de pH y temperatura en las que se logran la mayor actividad. Los hongos fueron aislados de productos elaborados con polietileno obtenidos de relleno sanitario, la identificación taxonómica en base a características macroscópicas del crecimiento en placa petri y el estudio microscópico con el empleo de técnica de microcultivo en lámina. La actividad biodegradadora se determinó con la técnica de Kavelman y Kendrick, a temperaturas entre 20 y 30 °C y a pH 4.5 8.0. Veinte cepas de micromicetos fueron aisladas e identificadas, en 5 de ellas (25%) se evidenció la capacidad de biodegradar el polietileno a 20 °C, siendo el pH 6.5 el óptimo. La cepa de mayor rendimiento perteneció a la especie de *Aspergillus flavus*. A temperatura de 30 °C, 6 cultivos (30%) evidenciaron actividad degradadora, siendo pH 6.5 el óptimo.

En una investigación desarrollada por Fontúrbel (2004) se determina la variación en el tiempo de la biomasa microbiana, el pH y la actividad enzimática (para proteasas, ureasas y sacarasas), en suelos expuestos naturalmente a pequeñas

vertientes de hidrocarburos. Se estudiaron muestras de época seca y de época de lluvias. La biomasa presentó un descenso hasta llegar a 0 meqC/kg en época seca en la muestra tratada con hidrocarburos, las muestras de época de lluvias mostraron un comportamiento exponencial, en ambos casos. El análisis de pH mostró una tendencia a regularse en un rango de 5.50-5.60 a las dos semanas de exposición, para ambas épocas. Los análisis de actividad enzimática mostraron un comportamiento de tipo recíproco y polinomial de 2º grado para proteasas, sacarasas y ureasas, aunque se vio que las sacarasas no tienen sensibilidad a este tipo de contaminación. Los análisis de varianza efectuados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos con hidrocarburos y los testigos. Los análisis de correlación de Pearson mostraron una correlación regular entre pH-biomasa y biomasa-proteasas, y una alta correlación entre proteasas-ureasas. Este autor analizó los datos y determinó que la conjunción de estos parámetros puede ser utilizada como un indicador para evaluar la contaminación y la potencialidad de biodegradación natural e *in-situ* de hidrocarburos en suelos de la zona del lago Titikaka.

Es de suma importancia tomar en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo en relación a la influencia de la temperatura en el desarrollo de los hongos evaluados, este factor puede influenciar en el crecimiento durante la incubación como una condición adecuada para el desarrollo de los mismos. La obtención de un biopreparado a partir de las cepas estudiadas pudieran considerarse tratamientos adecuados para la correcta biodegradación de petróleo crudo y diésel. A partir de estos resultados se deben realizar otros estudios que ayudarán a optimizar las condiciones para que los hongos puedan remediar eficientemente suelos contaminados por hidrocarburos para lograr un ambiente más sano y sin pérdidas de la biodiversidad en zonas de explotación petrolera en el Ecuador.

Para Volke y Velasco (2003) la biodegradación es conveniente y amigable con el medio ambiente ya que los microorganismos actuando a condiciones de temperatura, presión y pH propios del entorno natural, no se ven afectados por

condiciones extremas de los mismos factores. Esto disminuye los costos y permite llevar procesos que tienen bajo impacto ambiental. Esta alternativa contribuirá a reducir los inconvenientes presentados en las industrias petroleras. Similar resultado se encontró en el presente trabajo donde los valores favorables de temperatura de crecimiento de los hongos no se encuentran en condiciones extremas, sino a la temperatura característica de los diferentes ambientes donde actuarán los hongos en el proceso de biorremediación.

Se han realizado muchos esfuerzos en el sentido de optimizar variables para la actividad biorremediadora de hongos y bacterias. En tal sentido, Cuna (2012) optimizó los parámetros de humedad, temperatura y relación de nutrientes para estimar la posibilidad de aplicar la técnica de biorremediación en un suelo contaminado con hidrocarburos. Este autor realizó una caracterización inicial del suelo contaminado en función de sus características físicas y químicas, así como la cantidad de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos. Por otra parte, estudió la concentración del contaminante por método gravimétrico y por cromatografía gaseosa, y logró optimizar humedad y temperatura. Evaluó diferentes humedades (3%, 10%, 15% y 20%) y temperaturas (5°C, 15°C, 28°C y 37°C), con un seguimiento de la mineralización de los hidrocarburos midiendo el CO_2 producido. Los resultados que obtuvo indican que la mineralización de hidrocarburos fue óptima para humedades de 10% a 20% y a temperaturas de 25°C a 37°C con valores de producción de CO_2 de 3000 a 4500 mg CO_2.kg–1.

De acuerdo a los resultados obtenidos e informados en la literatura cuando se enfrentan los diferentes hongos aislados con diferentes niveles de contaminantes se puede observar que en ningún caso los compuestos utilizados como contaminantes inhiben el crecimiento de los hongos, en todos los niveles estudiados hubo crecimiento del micelio a los 14 días de incubación. Si se considera la elevada actividad biorremediadora estos hongos en trabajos previos

ante la presencia de compuestos de similar composición a los contaminantes empleados en el presente trabajo, cabe esperar una elevada eficiencia en su actividad descontaminadora de ambientes de explotación petrolera con los hongos seleccionados en el presente trabajo.

Según Volke y Velasco (2003) la biodegradación es muy eficaz, conveniente y amigable con el medio ambiente. Es eficaz ya que los microorganismos, con capacidad de degradar hidrocarburos, realizan dicha actividad de una forma efectiva, debido a su propio metabolismo y permiten la transformación de los hidrocarburos tóxicos en compuesto químicamente más simples y, por lo general, de menor toxicidad. La biodegradación es conveniente y amigable con el medio ambiente ya que los microorganismos actuando a condiciones de temperatura, presión y pH propios del entorno natural, no necesitan de condiciones extremas de los mismos factores. Esto disminuye los costos y permite llevar procesos que tienen bajo impacto ambiental. Esta alternativa contribuirá a reducir los inconvenientes presentados en las industrias petroleras.

6. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento de hongos desde muestra de suelos contaminados por hidrocarburos del cantón Lago Agrio, provincia de Sucumbíos. Se presenta el crecimiento de los hongos aislados y seleccionados con su papel en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en condiciones de laboratorio. Hubo relación entre crecimiento del hongo y una mayor biodegradación de petróleo crudo y diésel como única fuente de carbono.

- Se obtuvieron 3 cepas de hongos de color rosado, verde claro y verde oscuro. Dos de las cepas se destacaron (hongo rosado y verde claro), por su capacidad de biodegradar hidrocarburos.

- Para la selección de los hongos se consideraron las condiciones óptimas de las concentraciones de nutrientes (N, P, K), pH, temperatura (ºC) y la concentración de sustrato (petróleo crudo y diesel), parámetros de importancia para determinar los rangos para una mejor biodegradación.

- El crecimiento de los hongos seleccionados fue mejor ante petróleo crudo a concentraciones de 4 gr/L para el hongo rosado y 6 gr/L par el hongo verde claro. Ante diésel a 6 gr/L para el hongo rosado y 4 gr/L para el hongo verde claro.

- Se caracterizó en forma preliminar que las cepas de hongos aislados aisladas corresponden al género Penicillum.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar el análisis de identificación de los hongos en género y especie, para posteriores usos en favor a la biorremediación de suelos contaminados.

- ❖ Desarrollar tratamientos *in situ* para comprobar el funcionamiento y desarrollo de los hongos fuera del laboratorio, ya que sus condiciones variarían en la fase de campo.

- ❖ Realizar otros estudios con estos hongos y desarrollar tecnologías para la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos y otros contaminantes donde el hongo pudiera actuar.

- ❖ Por las bondades de este tipo de técnicas, es recomendable que las empresas petroleras existentes en Ecuador, apliquen los resultados de esta investigación para así remediar suelos contaminados que son afectados en su mayoría por las emisiones y fugas de hidrocarburos por industrias petroleras, para así cuidar el medio ambiente dejando un lugar seguro a las futuras generaciones.

8. RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad el estudio *in vitro* de las propiedades de biodegradación de hidrocarburos por parte de hongos aislados de suelos contaminados por hidrocarburos de la Amazonía ecuatoriana. Las muestras de suelo fueron recolectadas de la cuidad de Lago Agrio, provincia de Sucumbíos, comunidad de Sarayaku. Las muestras fueron trasladas hasta el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica donde se hicieron diluciones seriadas y siembra en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las cajas Petri se incubaron durante 14 días, posteriormente se determinó el crecimiento en cámara de Neubaur mediante el conteo de esporas. Los hongos aislados en estado puro fueron cultivados en un medio de cultivo mínimo en sales (MSM), previamente preparado con diferentes concentraciones de hidrocarburos como única fuente de carbono para determinar su capacidad degradadora de hidrocarburos. Se estudiaron el pH, la temperatura, la concentración de contaminante y la concentración de nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) en proporciones de 12:11:18 en %. Los hongos seleccionados tenían colonias de rosado, verde claro y verde oscuro. Los de mayor crecimiento, en todos los casos, fueron los de color rosado y verde claro. En el análisis de varianza y prueba de significación se observaron diferencias ($P \leq 0.05$) entre los dos hongos que crecieron en presencia de petróleo crudo y diesel en cuanto al conteo de esporas. En relación con la temperatura se demostró que existen diferencias ($P \leq 0.05$) entre los dos hongos (rosado y verde claro) en cuanto al conteo de esporas con valores estadísticamente significativo en el tratamiento con petróleo crudo. Los resultados obtenidos indican aunque los hongos aislados corresponde al género Penicillum son degradadoras de hidrocarburos, a nivel de laboratorio. Se recomienda realizar la identificación de los hongos tanto en género como en especie, para posteriores usos en favor de la biorremediación de suelos contaminados, así como comprobar el funcionamiento y desarrollo de los hongos fuera del laboratorio.

9. SUMMARY

This thesis research was aimed at the *in vitro* study of the properties of hydrocarbon biodegradation by fungi isolated from oil contaminated soil of the Ecuadorian Amazon. Soil samples were collected from the city of Lago Agrio, Sucumbios province, at the Sarayaku comunity. The samples were moved to the laboratory of microbiology at the State University of Amazon where serial dilutions were made and plated on Petri dishes with culture medium potato dextrose agar (PDA). The Petri dishes were incubated for 14 days, then using a growth chamber Neubaur was determined determined the number of fungi spores by counting them. Pure fungi were grown on a minimal culture medium salts (MSM), previously prepared with different concentrations of hydrocarbons as sole carbon source to determine its hydrocarbon degrading capacity. pH, temperature, concentration of contaminant and the concentration of nutrients (nitrogen, phosphorus and potassium) in proportions of 12:11:18 % were analyzed. Selected fungal colonies were pink, light green and dark green. The fastest growing, in all cases, were pink and light green. In the analysis of variance and test of significance differences ($P \leq 0.05$) between the two fungi growing in the presence of crude oil and diesel in terms of counting spores were observed. Regarding the temperature showed differences ($P \leq 0.05$) between the two fungi (pink and light green) as to count spores with statistically significant treatment with crude oil values. The results indicate that the fungal strains isolated are degrading hydrocarbons at laboratory level. Eventhoug the fungi isolate were identification as Penicillum. It is recommended that the identification of fungi both in gender and in kind, for future use for bioremediation of contaminated soils and verify the operation and development of fungi outside the laboratory.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Rodriguez, Ismael; Moctezuma-Zarate, María G; Tovar-Oviedo, Juana y Cardenas-Gonzalez, Juan F. 2011. Aislamiento e Identificación de Bacterias y Levaduras Resistentes a Petróleo. *Inf. tecnol.* [online], 22, (6): 103-110.

Alkorta, I., A. Aizpurua, P. Riga, I. Albizu, I. Amezaga y C. Garbisu. 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. Review Environmental Health 18: 65-73.

Andrade, Juliano de Almeida; Augusto, Fabio and Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. 2010. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclet. Quím.* [online], 35, (3): 17-43.

Atlas, R.M. & Bartha, R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley, 4th edition

Barrios San Martin, Yaima. 2011. Bioremediation: A tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biotecnol. Apl.* [online], 28, (2): 69-76.

Boscolo, R., Cacciatore, F. & Giovanardi, O. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in transplanted Manila clams *(Tapes philippinarum)* from the Lagoon of Venice as assessed by PAHs/shell weight index: A preliminary study. Mar. Pollut. Bull. 55, 485-493.

Calero, L. & Zambrano, M. 1997. Bioacumulación de hidrocarburos aromáticos del petróleo en un molusco bivalvo *Anadara tuberculosa.* Bol. Cient. CCCP. 6: 131-137.

Ciccio, José F. 2013. La importancia de la química: Concepto de materia según los griegos de la época arcaica. Inter Sedes [online]. 14, (28): 167-191.

Chec, E., Podorgoska, B. & Wegrzyn, G. 2008. Comparison of the use of mussels and semipermeable membrane devices for monitoring and assessment of accumulation of mutagenic pollutants in marine environment in combination with a novel microbiological mutagenicity assay. Environ. Monit Assess. 140: 83-90.

Cuna, A.J. 2012. Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. *Ing. invest. y tecnol.* [online], 13, (1): 105-112.

Cuna, Adrián; Pucci, Graciela; Morales, María José y Pucci, Oscar. 2010. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [online], 30, (1): 29-36.

Das P., Mukherjee S. y Sen R. (2008). Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. Chemosphere 72, 1229-1234.

Deyta, A.L. & Saval, S. (1998). Biodegradación de hidrocarburos mono aromáticos volátiles (BTX) a nivel microcosmos en suelos contaminados con gasolina. En: Asociación Peruana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; AIDIS. Gestión ambiental en el siglo XXI. Lima, APIS, Pág., 1-9

Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R. & Jha, A.N. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. Mutagenesis 17, 495-507.

Ferreira Do Nascimento, Teresa Cristina; Santos Oliveira, Fernando Jorge y Pessoa De Franca, Francisca. 2013. Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Rev. Int. Contam. Ambient* [online], 29, (1): 21-28.

Fonturbel Rada, Francisco 2004. Uso de algunos parámetros indicadores microbiológicos y bioquímicos para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos y la biodegradación de los mismos, en la zona del lago Titikaka (San Pedro de Tiquina, Bolivia). *Ecol. apl.* [online].3, (1-2):172-179.

Guerrero Suarez, Fernando and Llano Camacho, Fernando. 2013. Gas natural en colombia - gas e.s.p. *Estud. gerenc.* [online]. 19, (87): 115-146.

Gómez, Wilmar; Gaviria, Jair and Cardona, Santiago. 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina - diesel. *Dyna rev. fac. nac. minas* [online], 76, (160): 83-93.

Gonzalez Sepulveda, Elizabeth; Loyola Sepúlveda, Rodrigo; Neira Hinojosa, José and Neira Gonzalez, Felipe. 2013. Contenido, distribución y origen de hidrocarburos en sedimentos de tres lagunas urbanas de Concepción - Chile. *Quím. Nova* [online], 36, (5): 669-674.

Herrero, L., Palacios, A., Hun, L. & Vega, F. 1999. Ausencia de detección de enterovirus en bivalvos *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) por contaminación química en el Pacífico de Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 47: 419-427.

Incoder. 2007. Sistema de información sectorial pesquero. En: Lovatelli, A., Farias, A. & Uriarte, I. (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. 115-128.

Infante Carmen, Ortega Carmen, Morales Fernando, Ehrmann Ursula, Hernández-Valencia Ismael y Pérez Roso. 2010. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Bioagro* [online]. 22, (2): 145-152.

Martínez-Prado, Adriana. 2011. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Rev. Int. Contam. Ambient* [online], 27, (3): 241-252.

Mastandrea Carlos, Chichizola Carlos, Ludueña Beatriz, Sánchez Héctor, Álvarez Horacio, Gutiérrez Andrea. 2013. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. Acta bioquím. Clín. Latinoam., 39, (1): 45-50.

Mendez, Carmen R; Vergaray, Germán; Bejar, Vilma R y Cardenas, Karina J. 2007. Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Rev. peru biol.* [online],13,(3):203-206.

Nair, D., Fernández-Acero, F.J., García-Luque, E., Riba, I. & Del Valls, T.A. 2008. Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain). Environ. Toxicol. 23: 576-582.

Noguera, S. & Armado, A. (2010). Evaluación de metales en suelos contaminados por derrames de crudo en Yaracal, estado Falcón, Venezuela. S. Noguera. Avances en Química, 5 (3), 167-175.

Page, D.S., Boehm, P.D., Brown, J.S., Neff, J.M., Burns, W.A. & Bence, A.E. 2005. Mussels document loss of bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and the return to baseline conditions for oiled shorelines in Prince William Sound, Alaska. Mar. Environ. Res. 60, 422 -236.

Pane, L., Boccardo, S., Bonfiglioli, F., Mariottini, G.L., Priano, F. & CONIO, O. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, seston and copepods in a harbor area in the Western Mediterranean (Ligurian Sea). Mar. Ecol. 26: 89-99.

Paza, Juan P. 2013. Evaluación de la actividad ciclohexanona monooxigenasa en cepas de hongos filamentosos y levaduras. *Rev. Bol. Quim* [online], 30, (1): 50-59.

Prendez, Margarita y Calderon, Víctor. 2013. Análisis de Contaminantes en la Cuenca del Río Aconcagua en Chile: Evaluación de Riesgo Humano y Ambiental. *Inf. tecnol.* [online]. 24, (1): 3-14.

Pinedo Vega, J.L. (2005). El Petróleo en oro y negro. Libros en Red.

Rodríguez, M. (2009). Mitigación y biorremediación de suelos contaminados por el derrame de combustible diésel 2 en la Quebrada del Toro, Camaná. CIEN DES 10

Santamaria Orozco, Demetrio Marcos; Amezcua Allieri, Myriam Adela y Carrillo Hernandez, Teresita de Jesús. 2009. Generación de petróleo mediante experimentos de pirólisis: revisión sobre el conocimiento actual. *Bol. Soc. Geol. Mex* [online]. 61, (3): 353-366.

Santos, Aldo R y Silva, Rogério J. 2008. Análisis del Consumo de Coque de Petróleo en Algunos Sectores Industriales. *Inf. tecnol.* [online]. 19, (2): 93-101.

Sericano, J.L., Wade, T.L., Jackson, T.J., Brooks, J. M., Tripp, B.W., FARRINGTON, J.W., Mee, L.D., Readman, J.W., Villeneuve, J.P. & Goldbergs, E.D. 1995. Trace organic contamination in the Americas: An Overview of the US National Status & Trends and the International "Mussel Watch" Programmes. Mar. Pollut. Bull. 31 (4-12): 214-225.

Trindade P.V.O., Sobral L.G., Rizzo A.C.L., Leite S.G.F. y Soriano A.U. (2005). Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soil from Brazil: a comparison study. Chemosphere 58, 515-522.

Tukey, J. (1977), *Exploratory Data Analysis*, Reading, MA: Addison-Wesley, USA.

Vasudevan, N. y P. Rajaram. 2001. Bioremediation of soil sludge-contaminated soil. Environment International 26: 409-411.

Venosa A.D. y Zhu X. (2003). Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. Spill Sci. Technol. Bull. 8, 163-178.

Volker, L. & Velasco, A. (2003). Biodegradación de hidrocarburos

Zambrano, Mónica. 2012. Bioacumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en Anadara tuberculosa. *Gayana (Concepc.)* [online], 76, (1): 1-9.

Zamora, A.C. 2006. Análisis funcional de comunidades bacterianas asociadas a un proceso de biorremediación de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburo. Tesis. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias, UCV. Caracas. 89 p.

Zamora, Alejandra; Ramos, Jesús y Arias, Marianela. 2012. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro* [online], 24, (1): 5-12.

WEB

www.INAMHI.gob.ec/index.php/red-de-estaciones/easytablerecord/2-prueba/1002

http://issuu.com/inamhi/docs/m2-mapa_inventario_total_provincias_ecuador

www.opec.org/opec_web/en/about_us/25.htm

11. ANEXOS

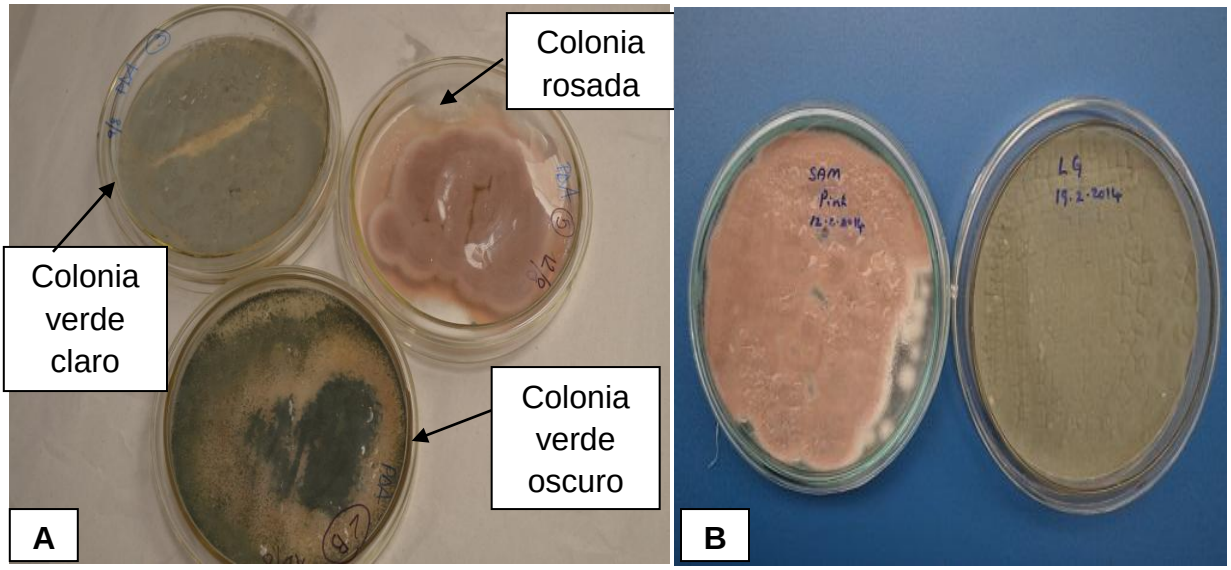
Tabla 17. Número de repeticiones y tratamiento.

A continuación se muestra la tabla con el número de repeticiones y tratamientos utilizados.

Factores	Color del Hongo	Tratamientos	Niveles	Repeticiones
Concentración de Nutrientes N-P-K con Petróleo crudo	Rosado	T1	2 g/L	3
	Rosado	T2	4 g/L	3
	Rosado	T3	6g/L	3
Concentración de Nutrientes N-P-K con diésel	Verde claro	T1	2 g/L	3
	Verde claro	T2	4 g/L	3
	Verde claro	T3	6g/L	3
Efecto de pH con diésel	Rosado	T1	3.0	3
	Rosado	T2	4.0	3
	Rosado	T3	5.5	3
	Rosado	T4	7.0	3
	Rosado	T5	8.0	3
Efecto de pH con Petróleo crudo	Verde claro	T1	3.0	3
	Verde claro	T2	4.0	3
	Verde claro	T3	5.5	3
	Verde claro	T4	7.0	3
	Verde claro	T5	8.0	3
Efecto de temperatura con diésel	Rosado	T1	8	3
	Rosado	T2	25	3
	Rosado	T3	37	3

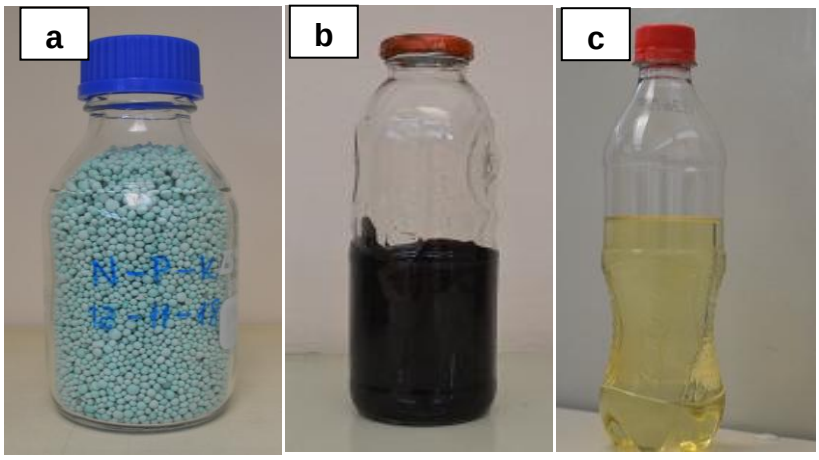
	Rosado	T4	55	3
Efecto de temperatura con Petróleo crudo	Verde claro	T1	8	3
	Verde claro	T2	25	3
	Verde claro	T3	37	3
	Verde claro	T4	55	3
Concentración de contaminante con diésel	Rosado	T1	0.5	3
	Rosado	T2	1.0	3
	Rosado	T3	1.5	3
	Rosado	T4	2.0	3
	Rosado	T5	2.5	3
Concentración de contaminante con Petróleo crudo	Verde claro	T1	0.5	3
	Verde claro	T2	1.0	3
	Verde claro	T3	1.5	3
	Verde claro	T4	2.0	3
	Verde claro	T5	2.5	3

Figura 15. Los cultivos puros de hongos aislados de suelos contaminado con petróleo crudo de la cuidad de Lago Agrio de la provincia de Sucumbíos.



A) tres tipos de colonias de hongos según la coloración. **B)** Hongo en cultivo puro seleccionado para el estudio.

Figura 16. Fotografía de los elementos que se usó para el estudio.



a) N, P, K. **b)** petróleo crudo. **c)** diesel.

Figura 17. Fotografía del micelio de los hongos en estudio**,** tomada en el microscopio.

.