

BIODEGRADACIÓN DE DIFERENTES ACEITES POR HONGOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS

Data de aceite: 02/08/2023

Ismael Acosta Rodríguez

Laboratorio de Micología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis
Potosí, S.L.P.
San Luis Potosí, México.
Orcid: 0000-0001-8620-2727

Karen Cirina Ruíz Trujillo

Laboratorio de Micología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis
Potosí, S.L.P.
San Luis Potosí, S.L.P., México.

Adriana Rodríguez Pérez

Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
Centro de Investigación y Extensión de la
Zona Media.
Cd. Fernández, San Luis Potosí.
Orcid: 0000-0002-6570-6579

Juan Fernando Cárdenas González

Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
Centro de Investigación y Extensión de la
Zona Media.
Cd. Fernández, San Luis Potosí.
Orcid: 0000-0002-3502-5959

Juana Tovar Oviedo

Laboratorio de Microbiología
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis
Potosí, S.L.P.
San Luis Potosí, México.

RESUMEN: Los microorganismos tolerantes a petróleo, desarrollan y utilizan diferentes respuestas especializadas (enzimáticas y fisiológicas) para crecer en presencia de este contaminante. Estas condiciones propician las variaciones poblacionales de los microorganismos autóctonos, y de manera natural realizan la degradación química del petróleo presente en aguas y suelos, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar la biodegradación de aceite de cocina nuevo, aceite de cocina usado, gasolina nueva Premium, gasolina usada Premium, aceite de transmisión nuevo, aceite de motor usado y petróleo por: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp. y *Penicillium* sp, utilizando una técnica colorimétrica para la medición de la biodegradación. Esta técnica, basada en la reducción del indicador 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP), encontrando que *Paecilomyces* sp., es el que degrada más eficientemente petróleo (90.7%), *Penicillium* sp., aceite de transmisión automotriz nuevo y aceite de motor usado (86.2 y 60.6%), *Candida albicans*, aceite casero nuevo y usado (79 y 88%), mientras que *Aspergillus niger* fue el más eficiente en biodegradar gasolina Premium nueva y usada, aunque con una eficiencia muy baja (18.5 y 17%).

ABSTRACT: Oil-tolerant microorganisms develop and use different specialized responses (enzymatic and physiological) to grow in the presence of this pollutant. These conditions favor population variations of autochthonous microorganisms, and naturally carry out the chemical degradation of oil present in waters and soils, hence, the aim of this work was to study the biodegradation of oil new kitchen, cooking oil; gasoline new Premium, gasoline used Premium, new transmission oil, used motor oil and petroleum by *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp., and *Penicillium* sp., using a colorimetric technique for measuring biodegradation, based on the reduction of the indicator 2,6 dichlorophenol indophenol (DCPIP), finding that *Paecilomyces* sp., is more efficiently degrading petroleum (90.7%), *Penicillium* sp., automotive transmission oil new and used motor oil (86.2 and 60.6%), *Candida albicans*, oil home new and used (79 and 88%), while *Aspergillus niger* was the most efficient at biodegrading new and used Premium gasoline, although with very low efficiency (18.5 and 17%).

KEYWORDS: Biodegradation, Oils, Fungi, Contamination

1 | INTRODUCCIÓN

Los derrames de petróleo son una importante fuente de contaminación del suelo y agua, ya que el uso, más el transporte transfronterizo tanto de petróleo crudo como de sus derivados, derrames de contenedores, rupturas en tuberías subterráneas y diferentes procesos industriales, hace que los derrames de hidrocarburos sean cada vez más frecuentes, lo que provoca riesgos asociados a la salud humana por la inhalación de vapores y la ingestión de aquellos hidrocarburos que están disueltos en el agua y el contacto dérmico, que se da principalmente en actividades recreativas, pues algunos de sus componentes son considerados carcinogénicos y teratogénicos [1]. También origina que se desarrolle tolerancia a la presencia de este compuesto, induciendo la selectividad y la disminución de la diversidad microbiana en los diferentes nichos ecológicos contaminados. Los microorganismos tolerantes a petróleo, desarrollan y utilizan diferentes respuestas especializadas (enzimáticas y fisiológicas) para crecer en presencia de este contaminante [2]. Estas condiciones propician las variaciones poblacionales de los microorganismos autóctonos, y de manera natural realizan la degradación química del petróleo presente en aguas y suelos [3]. La mayor preocupación es por los contaminantes de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), asfáltenos y muchos derivados compuestos por 20 o más átomos de carbono, pues no son fácilmente metabolizados por los microorganismos nativos y son considerados un riesgo potencial como carcinógeno y mutagénico [1]. Éstos son usados para la producción de lubricantes automotrices y aceites lubricantes. Y, comúnmente son desechados sin ningún tipo de tratamiento, y pueden persistir en el ecosistema por más de 6 años y resultan un problema para la biota. Tomando en cuenta que un litro de lubricante logra agotar el oxígeno de 1 000 000 litros de agua [4]. Entre

las soluciones existentes podemos mencionar: El confinamiento, el cual se basa en el aislamiento de las aguas o suelos contaminados, de forma que su objetivo es evitar que se transfiera lateralmente. En este se hace la construcción de barreras como: Barreras de lodo, que son trincheras verticales que se rellenan de lodo, que impermeabiliza el perímetro a aislar, y las barreras químicas, en las que se inyecta bajo el área afectada un producto que impida la dispersión del contaminante. Estas metodologías tienen sus limitaciones, ya que solo evitan la propagación del contaminante y no logran una verdadera remoción [5]. Recientemente, se ha estudiado el aislamiento de microorganismos tolerantes y su capacidad de degradación, a partir de sitios contaminados con el mismo, como la bacterias *Rhodococcus aetherivorans* y *E. wratislaviensis* [6], *Streptomyces* spp [7] y *Pseudomonas aeruginosa* [8], las levaduras *Candida tropicalis* y *Candida albicans* [9, 10] y los hongos filamentosos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma asperellum* [11]. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad de biodegradación de diferentes aceites y gasolinas por diferentes hongos

2 | MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de tierra

Se tomaron en recipientes de plástico previamente lavados con ácido sulfúrico al 10% y esterilizados por calor húmedo, muestras de suelo de diferentes suelos contaminados de la Ciudad de San Luis Potosí, México, y se guardaron en hielera, y se trasladaron al laboratorio y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Aislamiento e identificación de las cepas obtenidas

El aislamiento se realizó inoculando 100 μ L de las muestras previamente diluidas (1 g de suelo en 9 mL de agua destilada estéril) en cajas de Petri conteniendo medio mínimo de Lee adicionado de agar bacteriológico (20% p/v) [12], sin glucosa y adicionadas de 1.0 mL de petróleo crudo como fuente de carbono, incubando a 28°C durante 7 días. Las colonias obtenidas se purificaron por resiembras sucesivas en el mismo medio de cultivo, y para su posterior identificación, se sembraron por duplicado en Agar Sabouraud Dextrosa, así como la prueba de tubo germinal para la identificación de *C. albicans* [13].

Aceites analizados

1. Aceite nuevo casero
2. Aceite usado casero.
3. Gasolina nueva Premium.
4. Gasolina usada Premium.

5. Aceite de transmisión para automóvil nuevo
6. Aceite de motor de automóvil usado.
7. Petróleo crudo.

Estudios de biodegradabilidad

Éstos se realizaron utilizando una técnica basada en el indicador redox 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) [14]. La resistencia se analizó inoculando por duplicado 1×10^6 células/mL en tubos de ensayo de 12 mL, conteniendo 4.5 mL de medio Bushnell-Hass (BH), 50 μ L de cada aceite y gasolina a analizar, y 25 μ L de DCPIP a una concentración de 27mg/mL, y se incuban 3 días a 28°C. El medio BH contiene (g/L): $MgSO_4$: 0.2; $CaCl_2$: 0.02; KH_2PO_4 : 1.0; K_2HPO_4 : 1.0; NH_4NO_3 : 1.0; $FeCl_3$: 0.05 [15]. El principio de esta técnica es que durante la oxidación microbiana de los hidrocarburos, los electrones se transfieren a un aceptor de electrones como O_2 , nitratos y sulfatos, y al incorporar un aceptor de electrones como el DCPIP al medio de cultivo, es posible analizar la capacidad de los microorganismos para utilizar como sustrato los hidrocarburos, por la observación del cambio de color del DCPIP de azul (oxidado a incoloro (reducido)), determinando la absorbancia de las muestras en un Espectrofotómetro Uv/Vis a una longitud de onda de 600 nm [14]. Esta técnica se ha utilizado en diferentes trabajos, con resultados satisfactorios [3, 5, 16].

3 | RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron 3 hongos contaminantes ambientales y una levadura: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp., y *Penicillium* sp, los cuales crecen muy bien con 1 mL de petróleo crudo como fuente de carbono. Con respecto a la capacidad de biodegradación de los diferentes compuestos analizados, se encontró que *Paecilomyces* sp., es el que degrada más eficientemente petróleo (90.7%), *Penicillium* sp., aceite de transmisión automotriz nuevo y aceite de motor usado (86.2 y 60.6%), *C. albicans*, aceite casero nuevo y usado (79 y 88%), mientras que *A. niger* fue el más eficiente en biodegradar gasolina Premium nueva y usada, aunque con una eficiencia muy baja (18.5 y 17%) (Tabla 1, Figura 1), mientras que utilizando una mezcla de los hongos aislados, ésta fue más eficiente en la biodegradación de aceite casero nuevo y usado (61 y 49.5%, respectivamente) (Tabla 2, Figura 2).

MUESTRA	HONGO USADO	% DE BIODEGRADACION
1.1 Aceite casero nuevo	<i>Cándida albicans</i>	78.78
2.1 Aceite casero usado	<i>Cándida albicans</i>	87.73
3.1 Gasolina Premium nueva	<i>Aspergillus niger</i>	18.5
4.1 Gasolina Premium usada	<i>Aspergillus niger</i>	17
5.1 Aceite de transmisión nuevo	<i>Penicillium sp.</i>	86.2
6.1 Aceite motor usado	<i>Penicillium sp.</i>	60.6
7.1 Petróleo	<i>Paecilomyces sp.</i>	90.7

Tabla 1.- Porcentaje de degradación de los diferentes aceites analizados por los hongos analizados.



Figura 1.- Biodegradación de las diferentes muestras de aceite por las diferentes cepas utilizadas.

MUESTRA	% DE BIODEGRADACION
1.1 Aceite casero nuevo	61
2.1 Aceite casero usado	49.5
3.1 Gasolina Premium nueva	11.2
4.1 Gasolina Premium usada	11.2
5.1 Aceite de transmisión nuevo	39.8
6.1 Aceite de motor usado	32.5
7.1 Petróleo	1

Tabla 2, Porcentaje de biodegradación de los diferentes sustratos analizados por una mezcla de las diferentes cepas obtenidas.

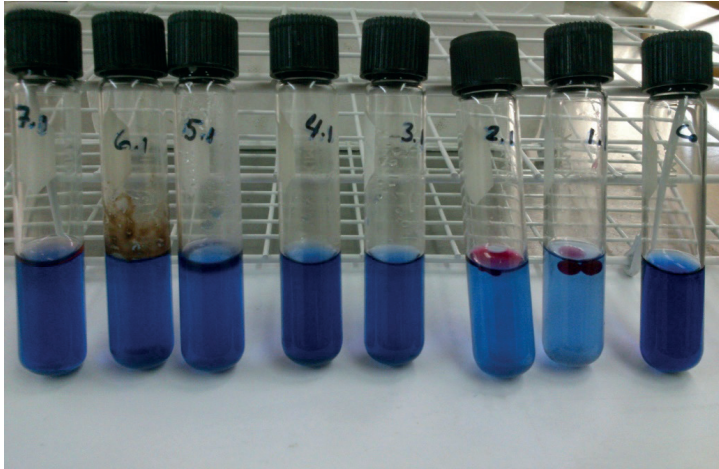


Figura 5. Biodegradación de la diferentes muestras analizadas por una mezcla de las diferentes cepas obtenidas.

Por otro lado, Se ha encontrado que el 96% de bacterias aisladas de medios líquidos (lagos, ríos, y lagunas) presentan capacidad de crecer y emulsificar hidrocarburos derivados del petróleo [3], y los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que las cepas de hongos y levadura aislados, crecen eficientemente en el medio líquido adicionado con 1.0 mL de petróleo crudo, Estos resultados son similares a los obtenidos con las bacterias *R. aetherivorans* y *E. wratislaviensis* [6], con *P. aeruginosa* [8] y con la levadura *C. albicans* [10]. La sobrevivencia en estas condiciones, sugiere que estos hongos podrían tener la capacidad de utilizar hidrocarburos alifáticos y aromáticos como fuentes de carbono y/o donadores de electrones [17]. Por otra parte, los resultados obtenidos fueron muy eficientes, lo que representa un buen avance para considerar esta técnica como una opción para el estudio de la biorremediación de contaminación por aceites y confirma algunos de los reportes de la literatura con diferentes bacterias, hongos y levaduras [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16 y 17].

CONCLUSIONES

Se aislaron 3 hongos contaminantes ambientales y una levadura resistentes a petróleo, con el potencial para degradarlo. Además en presencia de diferentes sustratos como fuente de carbono presentan una gran capacidad de biodegradación, por lo que pueden utilizarse para eliminar hidrocarburos presentes en aguas y suelos contaminados.

REFERENCIAS

1. S. Chen y C. Liao. Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Sci. Total Environ.* 366: 112-123 (2006).
2. M.R. Atlas, A. Horowitz, M. Krichevly y K.A. Bej. Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbiol. Ecol.* 22, 249-256 (1991).

3. A. Pinto Mariano, D. Marcos Bonotto, D. F. de Angelis, M. P. Santos Piróllo y J. Contiero. Biodegradability of comercial and weathered diesel oils. *Braz. J. of Microbiol.* 39:133-142 (2008).
4. K.M. Sugiera, M. Ishihara, T. Shimauchi, y S. Harayama. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Science Technol.* 31: 45-51 (1997).
5. D. Boaneres de Souza, G.C. Barbosa Brito, F.C. Wasner Vasconcelos y L.C. Braga. Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Rev. de estudos ambientais.* 12(2): 38-46 (2010).
6. M. Auffret, D. Labbe, C. Thoudand, Ch. W. y F. Fayolle-Guichard. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 5(24): 7774-7782 (2009).
7. I. Saadouni, M. Awawdeh, Z. Jaradat y Q. Ababneh. Growth of *Streptomyces* spp. from hydrocarbon-polluted soil and their analysis for the presence of alkane hydroxylase gene (alkB9 by PCR). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 2191-2198 (2008).
8. J. K. Nduka, L. N. Umeh, I. O. Okerulu, L. N. Umedum y H. N. Okoye. Utilization of Different Microbes in Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soils Stimulated with Inorganic and Organic Fertilizers. 2(3), *J Pet Environ Biotechnol* 2012, 3:2. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.1000116>.
9. S. Farag y N.A. Soliman. Biodegradation of Crude Petroleum Oil and Environmental Pollutants by *Candida tropicalis* Strain. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 54(4): 821-830, (2011).
10. I. Acosta Rodríguez, M.G. Moctezuma Zárate, J.F. Cárdenas González y J. Tovar Oviedo. Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras tolerantes a petróleo. *Inv. Tecnol.* 22(6): 103-110 (2011).
11. M.C. Rivera Cruz, R. Ferrera Cerrato, V. Volke Haller, R. Rodríguez Vázquez y L. Fernández Linares. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. *Terra.* 423-434 (2002).
12. K.L. Lee, H.R. Buckley y C.C. Campbell. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Micol.* 13, 145-153 (1975).
13. R. López Martínez, L.J. Méndez Tovar, F. Hernández y L.R. Castañón. R. Hongos contaminantes comunes en el Laboratorio. En *Micología Médica. Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio.* 2ª. Ed. Trillas. pp 137-148. México (2004).
14. K.G. Hanson, J.D. Desai, A.J. Desai. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Tech.* 7: 745-748 (1993).
15. Difco Manual. (1984). Detroit: Difco Laboratories.
16. A. Pinto Mariano, D. F. de Angelis, M. P. Santos Piróllo, J. Contiero y D.M. Bonotto. Investigation about the Efficiency of the Bioaugmentation Technique when Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. *Braz. Arch. Biol. and Technol.* 52(5): 1297-1312 (2009).
17. R. Argumedo-De Lira, A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato y J.J. Peña Cabriales. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Cont. Amb.* 25 (4), 257-269 (2009). Laboratorio, En *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de Laboratorio.* 2ª. Ed. Trillas. pp 137-148. México (2004).