

Condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para el desarrollo del microorganismo hidrocarbonoclasta *Penicillium* sp. in vitro

José Gabriel Martínez-Vázquez¹, Miguel Ángel Hernández-Rivera²,
Marcia Eugenia Ojeda-Morales³, María Juana García-Marín⁴.

Resumen

En México y el mundo existen diversas áreas impactadas con petróleo crudo. Las tecnologías de biorremediación actuales emplean mayormente microorganismos para descontaminar sitios con hidrocarburos. En esta investigación, se evaluaron las condiciones para el óptimo desarrollo de la cepa de un hongo hidrocarbonoclasta, encontrada en muestras de un suelo contaminado con 4.0×10^5 mg kg⁻¹ de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP), a fin de obtener biomasa fúngica para su potencial aplicación en biorremediación.

Palabras Clave: Hongos hidrocarbonoclastas, crecimiento óptimo, *Penicillium* sp.

Environmental and optimum nutrient conditions for in vitro hydro-carbonoclast microorganism *Penicillium* sp development

Abstract

In Mexico and the rest of the world there are several regions affected by crude oil spills. The current bioremediation technologies use mainly microorganisms to decontaminate areas with presence of hydrocarbons. In this research, the conditions for optimum development of a hydro-carbonoclast fungus strain, found in samples of soil contaminated with 4.0×10^5 mg kg⁻¹ of total oil hydrocarbons, were assessed in order to obtain fungal biomass for potential applications in bioremediation.

Key words

Hydrocarbonoclastic fungi, optimum growth, *Penicillium* sp.

1 José Gabriel Oscar Martínez-Vázquez: Facultad de Salud, Universidad UCINF y Facultad de Salud y Ciencias A. F., Universidad Internacional SEK. Magister en Ciencias Químicas por la Universidad Nacional Autónoma de México.

2 Miguel Ángel Hernández-Rivera: División Académica de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Dr. en Ciencias Químicas por la Universidad Nacional Autónoma de México.

3 Marcia Eugenia Ojeda-Morales: División Académica de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Magister en Ing. y Protecc. Ambiental, por Univ. Juárez Autónoma de Tabasco, México.

4 María Juana García-Marín: División Académica de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Magister en Ingeniería Ambiental, por el Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Introducción

A nivel mundial es de trascendental importancia la explotación de los recursos energéticos. En el caso de México, el petróleo crudo es su principal fuente energética (INEGI, 2009), logrando una extracción total de 2.6 millones de barriles diarios en el año 2009: 77.5 % fueron extraídos de los pozos en el mar del Golfo de México (Cruz-Serrano, 2010), y el 22.5% se extrajo de los pozos en tierra. La mayoría de los pozos en tierra se encuentran ubicados en el estado de Tabasco, de donde se obtuvo el 77% del total de petróleo extraído de los pozos en tierra (Hernández, 2009), correspondientes al 3.7 % del Producto Interno Bruto (PIB) total nacional (Arias, 2010). La industria petrolera sufre continuamente de accidentes que originan derrames de petróleo, contaminando los ecosistemas terrestres y marinos, impidiendo con ello el aprovechamiento de los recursos naturales afectados y problemas de salud en la población humana (Levin y Gealt, 1997; Eweis *et al.*, 1999). Es por ello que se han estado desarrollando estudios en técnicas de biorremediación para estos sitios, a fin de hacer esfuerzos para abatir estos serios problemas que afectan la ecología y la salud humana.

La biorremediación utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para limpiar ambientes marinos y terrestres abiertos contaminado, siendo una técnica adecuada para la industria petrolera porque es de aplicación simple sobre grandes áreas y lleva a la destrucción completa de los hidrocarburos contaminantes (Castro-Riquelme, 2008). Dentro de la biorremediación, la bioaugmentación involucra la

inoculación de una cepa o consorcio microbiano mixto enriquecido en la tierra o en el agua (Kuiper *et al.*, 2004; Ogbulie *et al.*, 2010), donde se ha señalado que los microorganismos indígenas son más eficaces para degradar petróleo crudo local o sus derivados locales, que para degradar hidrocarburos provenientes de otras regiones (Gesinde *et al.*, 2008). Los microorganismos indígenas, están presentes en cantidades muy pequeñas y por ello no tienen la capacidad para degradar un contaminante en particular o pueden encontrarse en formas metabólicas inactivas en sus hábitats. La bioaugmentación ofrece una manera de proporcionar microbios específicos en número suficiente para completar la biodegradación (D'Annibale *et al.*, 2006). Se ha reportado que los hongos son mejores que las bacterias en la degradación de hidrocarburos tanto en cantidad como en variedad de constituyentes, siendo los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* los que se encuentran con mayor frecuencia en suelos y aguas marinas contaminados con hidrocarburos (Chávez-Gómez *et al.* 2003; Valenzuela *et al.*, 2006; Castro-Riquelme, 2008; Ogbulie *et al.*, 2010). Estos hongos toleran a los hidrocarburos y crecen en ellos, porque producen enzimas y ácidos que rompen y desarmen las cadenas largas de los hidrocarburos, la estructura base común a los aceites, productos derivados del petróleo y muchos otros contaminantes (Launen *et al.*, 1995, Wunder *et al.*, 1997; Isitua e Ibeh, 2010). Es por ello que se ha utilizado el *Penicillium* sp. en estudios sobre la biodegradación de petróleo crudo (Mittal y Singh. 2009; Okoro, 2008; Obire *et al.*, 2008; Leitão, 2009; Obire y

Anyanwu, 2009; Ogbulie *et al.*, 2010), o derivados del petróleo con el mismo fin (Jeonge-Dong and Choul-Gyun, 2007; Castro-Riquelme, 2008; Leitão, 2009; Isitua e Ibeth, 2010; Machín-Ramírez *et al.*, 2010), y sobre la mineralización de una variedad de compuestos derivados del petróleo, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), incluidos pireno, criseno, y el benzo [a] pireno, a metabolitos polares (Kiehlmann *et al.*, 1996; Sing, 2006; Leitão, 2009; Isitua and Ibeh, 2010; Machín-Ramírez *et al.*, 2010), así como en estudios de toxicidad con diferentes hidrocarburos, puesto que la biodegradación puede no llevarse a cabo por la toxicidad del hidrocarburo más que por la persistencia del mismo (Castro-Riquelme, 2008). Se ha señalado la presencia del hongo *Penicillium* sp. en suelos contaminados con hidrocarburos en diversas partes y ambientes en el mundo, como por ejemplo: en Kuwait (Radwan *et al.*, 1995), Canadá (April *et al.*, 2000), África (Gesinde *et al.*, 2008; Nkwelang *et al.*, 2008; Isitua e Ibeth, 2010; Ogbulie *et al.*, 2010), Chile (Valenzuela *et al.*, 2006), y Korea (Jeonge-Dong y Choul-Gyun, 2007), entre otros.

En lo relativo a las condiciones de Temperatura, Nutrimientos y pH para el desarrollo óptimo del *Penicillium* sp., varios investigadores han señalado temperaturas de 30 °C o 31 °C (Castro-Riquelme, 2008; Leitão, 2009), aunque Corry (1987) y Lacey (1989) reportaron que en nueve especies de *Penicillium* la temperatura media óptima de crecimiento fue de 28 °C. Sin embargo estudios recientes han recomendado un intervalo de 28 ± 2 °C para el crecimiento óptimo del *Penicillium* sp. (Isitua e Ibeh, 2010). Res-

pecto a los nutrientes, en necesario proporcionar C, N, P, K y oligoelementos. Según reporta Ercoli *et al.* (2000), la fuente de oligoelementos ayuda a mejorar el proceso de biodegradación de hidrocarburos. Respecto al pH, Alexander (1994) ha recomendado en pH = 4.0 para el crecimiento óptimo de los hongos. Los resultados obtenidos por Sanchis *et al.* (1992), en su estudio sobre *Penicillium griseofulvum*, mencionaron que el pH de entre 3.5 y 4.5 es el óptimo para su crecimiento.

El hongo *Penicillium* sp. ha demostrado su alto potencial en el campo de la biorremediación, sin embargo no ha recibido la atención adecuada para su aplicación en proyectos a gran escala (Leitão, 2009). Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar cuales son las condiciones óptimas medioambientales y de nutrientes que puedan favorecer el mayor desarrollo biomásico de este microorganismo, a fin de ser un aporte en el diseño de nuevas estrategias en biorremediación por bioaumentación sobre suelos contaminados con petróleo crudo o derivados del petróleo, tanto en México como en el Mundo.

Materiales y métodos

Etapa 1. Aislamiento, caracterización y adaptación de hongos hidrocarbonoclastas

Se colectaron muestras de un suelo contaminado de un campo petróleo del Municipio de Huimanguillo, estado de Tabasco en México, ubicado a una altitud de 20 msnm (INEGI, 2001). Se tomaron muestras simples de suelo de acuerdo con la

Norma Oficial Mexicana 021 (NOM-021-RECNAT-2000, 2002), para una superficie total de 5 000 m² (0.5 ha), y se conservaron a 4.0 °C hasta su uso. A continuación, se determinaron los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) presentes en las muestras de suelo por el método de Extracción (EPA-3540C, 1996; EPA-9071B, 1998), en su fracción pesada (hidrocarburos con un número de átomos de carbono mayores de C18), y posteriormente se cuantificaron por gravimetría (EPA-1664A, 1999). Las muestras de suelo fueron sometidas a siembra en la Fase I.

Fase I: El aislamiento de los hongos totales se llevó a cabo en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa PDA (Baker), preparado de acuerdo con el fabricante y adicionado en placas petri. Se preparó una disolución con 10.0 g del suelo muestreado en 90 mL de agua destilada estéril, a partir de la cuál se prepararon dos diluciones seriadas (Madigan *et al.*, 2003), obteniéndose diluciones 10⁻¹ y 10⁻². Posteriormente, se sembró 0.1 mL de cada dilución por separado en 6 cajas petri con PDA, esparciéndola con la espátula de Drigalsky y se incubaron a 28 °C por 8 días (d). Luego se cuantificaron hongos totales por el método del recuento en placas por dilución seriada (Madigan *et al.*, 2003). De entre 14 cepas de hongos aisladas, se escogieron las 5 de mayor crecimiento radial: H14, H18, H19, H20 y H24, para ser evaluadas como hidrocarbonoclastas en la Fase II. Las cepas se inocularon en tubo inclinado con PDA y se preservaron a 4 °C hasta su uso.

Fase II: Cultivo en medio Sólido Agar Celulosa (SAC) para hongos hidrocarbonoclas-

tas. El medio SAC (Baker) se preparó de acuerdo con Rivera-Cruz *et al.* (2002), y se adicionó a placas petri. Los medios de cultivo, el petróleo crudo Istmo fracción pesada (C>18), con índice API = 33.74 (PEMEX, 1988), y papel filtro de 1 cm², se esterilizaron durante 20 min a 121 °C (Madigan *et al.*, 2003). Por otro lado, se re-sembraron las cepas de hongos obtenidas de la Fase I, tocando con un asa el micelio de cada colonia preservada, se esparcieron en PDA esterilizado y se incubaron a 35 °C por 72 h. A continuación se colocó un cuadro de 1.5 cm² de papel filtro impregnado con petróleo crudo sobre en medio SAC de cada placas petri, se extrajo con un saca-bocado (0.9 cm de diámetro) una rodaja de hongo con estructura reproductiva de las cepas re-sembradas, se colocó sobre el papel filtro impregnado con petróleo en el medio SAC y se tapó la placa petri (Rivera, 2001). Cada cepa se sembró por triplicado en el medio SAC y se incubaron a 29 °C por 6 d. Las cepas H14, H18 y H24 presentaron mayor desarrollo radial, y pasaron a la siguiente Fase.

Fase III: Adaptación de hongos en medio mineral Líquido Agar-Celulosa (LAC) para hongo hidrocarbonoclastas. El medio LAC fue preparado de acuerdo con Johnson y Curl (1972). Se incorporó petróleo crudo al medio LAC, como fuente de carbono y energía de acuerdo con Rivera-Cruz (2001), luego se sembró cada cepa por separado, considerando lo señalado por Rivera-Cruz *et al.* (2002), y se incubó por 6 d. La cepa H24 mostró mayor desarrollo y se eligió para ser evaluada en la Etapa 2. Esta cepa se identificó como *Penicillium* sp. por medio de un micro-cultivo, empleando las claves de Barnett y Hunter

(1972). Este hongo fue preservado en medio PDA a 4 °C en tubo inclinado.

Etapas 2. Desarrollo del diseño experimental para determinación de parámetros de desarrollo óptimo

Se empleó el modelo estadístico $Y_{ijk} = \mu + T_i + N_j + pH_k + TiN_j + TipH_k + NipH_j + EI(ijk)$, para la implementación del bioensayo experimental *in vitro* con arreglo de factores 3x3x2, consistente de las temperaturas: T1=29°C, T2=35°C y T3=40°C; los pH's: pH1=3.5, pH2=5.0 y pH3=6.0; y los fertilizantes nutricionales: N1=Urea y N2=Nitrofoska-Azul. Las temperaturas de 35 °C y 40 °C se establecieron en baños con calentador eléctrico. Los parámetros de nutrimentos y pH se determinaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL distribuidos en tres series de 6 tratamientos, conectados a un compresor con filtro de membrana y controlador de válvulas para suministro de aire estéril.

Preparación de los medios de cultivo. Los medios nutritivos utilizados fueron: N1=Urea (Abbot), y N2=Nitrofoska-Azul 12-12-17-6 NPKS (Compo), preparados con igual proporción de C, en base a la misma cantidad de glucosa (Merck), adicionada a cada medio. Los medios tuvieron la relación de proporcionalidad de nitrógeno N siguiente, Urea:Nitrofoska-Azul aprox. 9.5:1; en cuanto a la proporción de fósforo P y potasio K, se tomaron las informadas por Hernández Rivera et al. (2011), donde se cumple proporción entre Triple-17:Nitrofoska-Azul, P (2.8:1) y K (1:1), respectivamente,

ya que la Urea no proporciona P ni K. Así mismo, la carga en masa fue la misma para ambos fertilizantes orgánicos. Los medios se prepararon de la siguiente manera: para cada uno de los se prepararon tres matraces Erlenmeyer con 500 mL de agua destilada (Química Mercurio) y 2.5 g de glucosa como fuente de carbono. El primer medio contenía 0.25 g de Urea y 0.25 g Nitrofoska, haciendo un total de 6 matraces. Posteriormente a cada tipo de estos medios nutritivos se les ajustó el pH a 3.5, 5.0 y 6.0 respectivamente, utilizando disoluciones 0.1M de H2SO4 (J.T. Baker) y de NaOH (J.T. Baker). Para evaluar los medios nutritivos a cada temperatura, se midieron por triplicado 150 mL de cada medio nutritivo con su pH ajustado y se colocaron en un matraz de 250 mL, obteniendo 18 unidades experimentales (u.e.), de acuerdo al diseño experimental. Las u.e. fueron esterilizadas durante 20 min a 121 °C y 103.421 kPa (15 lbf plg²). Estas u.e. fueron posteriormente inoculadas con *Penicillium* sp.

Preparación del inoculante. El *Penicillium* sp. preservado (Fase III de Etapa I), se re-aisló en placas petri en el medio PDA como se señaló previamente y se incubó a 35 °C por 4 d. A continuación se adicionaron 5 mL de agua destilada estéril al tubo inclinado. La suspensión anterior se vació en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de agua estéril y se determinó la concentración inicial de esporas por conteo en cámara Neubauer de acuerdo con Pica et al. (2004). De este medio inoculante, se inyectaron 2.5 mL en cada una de las 18 u.e. y de manera inmediata se determinó la cantidad inicial del inóculo como UFC de *Penicillium* sp. al tiempo cero días (t=0 d),

por el método de celular viables (Madigan, 2003). La evaluación de la multiplicación del hongo en las u.e. se realizó cada 2 d durante 37 d por el mismo método. Los valores de pH y de temperatura se determinaron diariamente.

Resultados

Se realizó un estudio sobre un suelo contaminado con 4.0×10^5 mg kg⁻¹ HTP (400,000 ppm) de petróleo crudo (API = 33.74), con la finalidad de encontrar y aislar microorganismos degradadores de hidrocarburos para emplearlos en la producción de biomasa fúngica. El Cuadro 1 muestra 14 cepas de hongos obtenidos en la fase de aislamiento microbiano (Fase 1 de la Etapa 1), de las cuales se seleccionaron las 5 que tuvieron

mayor crecimiento radial en el medio de cultivo PDA para continuar con su evaluación en la Fase II.

De las 5 cepas seleccionadas de la Fase anterior, sembradas en el medio de cultivo SAC para hongos degradadores de HTP (Fase II), las cepas nombradas como H14, H18 y H24 mostraron un mayor desarrollo y pasaron a la Fase III (Cuadro 2).

En el Cuadro 3 (Fase III), se presenta el crecimiento de los tres hongos seleccionados en la Fase II, en el medio LAC. Se observó el comportamiento de la rapidez de su reproducción a través del tiempo (6 d). Así mismo, se verificó visualmente el rompimiento de la tensión superficial del petróleo crudo cambiando completamente su apariencia física.

Estos resultados permitieron clasificar a las

CUADRO 1: CARACTERÍSTICAS Y CRECIMIENTO RADIAL DE LOS HONGOS AISLADOS DEL SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO, EN EL MEDIO PDA

HONGO	COLOR	Longitud (cm)									
		FORMA	0d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d
H1	rojo-verde	Redondo	0.9	0.9	2.2	3.0	3.8	4.5	5.1	5.5	6.0
H2	blanco	Redondo	0.9	0.9	1.3	2.3	3.5	4.8	5.0	5.5	6.0
H3	rojo	Redondo	0.9	0.9	1.5	2.5	3.4	4.2	4.7	5.0	5.4
H5	verde oscuro	Redondo	0.9	0.9	1.6	1.9	2.5	3.2	4.0	4.5	5.0
H6	naranja	Redondo	0.9	0.9	1.5	3.2	4.1	5.0	5.5	6.0	6.0
H12	amarillo-blanco	Redondo	0.9	0.9	1.4	2.1	3.6	4.3	5.0	5.4	5.8
H14	verde olivo	Redondo	0.9	0.9	1.4	2.5	3.3	4.1	5.0	5.7	6.5
H15	gris-blanco	Redondo	0.9	0.9	1.0	2.3	2.9	3.4	3.9	4.2	4.9
H18	blanco	Redondo	0.9	0.9	2.0	3.5	4.2	5.5	6.3	6.5	6.8
H19	café	Redondo	0.9	0.9	2.3	3.0	3.5	4.5	5.5	6.0	6.5
H20	café tierra	Redondo	0.9	0.9	2.3	3.5	4.5	5.6	6.8	7.0	8.0
H21	gris	Redondo	0.9	0.9	1.1	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
H22	blanco	Redondo	0.9	0.9	1.7	2.5	3.3	4.0	4.5	5.0	5.3
H24	verde oscuro	Redondo	0.9	0.9	1.5	2.6	3.8	4.5	5.5	6.5	7.5

CUADRO 2: DESARROLLO RADIAL DE LAS CEPAS SELECCIONADAS DE LA FASE 1, EN EL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO AGAR-CELULOSA (SAC) PARA HONGOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO HTP, DURANTE LOS 6D QUE DURÓ EL ESTUDIO

HONGO	Desarrollo radial (cm) a cada día (d)					
	1d	2d	3d	4d	5d	6d
H14	0.9	1.1	2.0	3.2	4.6	5.4
H18	0.9	1.3	2.2	3.5	4.7	6.2
H19	0.9	0.9	1.2	1.5	1.8	1.9
H20	0.9	1.0	1.5	1.8	2.0	2.2
H24	0.9	1.4	2.5	3.8	5.5	7.0

CUADRO 3 : CRECIMIENTO DE LAS CEPAS FÚNGICAS COMO UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN EL MEDIO DE CULTIVO MINERAL LÍQUIDO AGAR-CELULOSA (LAC), ENRIQUECIDO CON PETRÓLEO CRUDO DURANTE LOS 6D QUE DURÓ EL EXPERIMENTO

HONGO	UFC inicio (t=0 d)	UFC a t=3 d	UFC a t=6 d
Testigo (sin hongo)	30 x 10⁻²	31 x 10⁻²	28 x 10⁻²
H14	30 x 10⁻²	28 x 10⁻³	31 x 10⁻⁴
H18	30 x 10⁻²	34 x 10⁻³	52 x 10⁻⁴
H24	30 x 10⁻²	72 x 10⁻³	78 x 10⁻³

tres cepas de hongos como hidrocarbonoclastas. De estas cepas, la nombrada H24 e identificada como *Penicillium* sp. por comparación con las claves de Barnett y Hunter (1972), tuvo el mayor crecimiento durante el tiempo que duró el experimento, y fue seleccionada para ser evaluada en la Etapa 2.

En la evaluación del crecimiento de *Penicillium* sp. en matraz (Etapa 2, Fase I), se observó un aumento en la viscosidad del medio de cultivo en el transcurso del crecimiento biomásico. Con los datos obtenidos se realizó la prueba de medias. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos

en los tratamientos a diferentes temperaturas, nutrientes y pH. La Figura 1A indica que la multiplicación de *Penicillium* sp. fue mejor a la temperatura de 29 °C, y un poco menor en las otras dos temperaturas. La Figura 1B señala que el microorganismo se desarrolló más en el medio con el fertilizante Nitrofoska-Azul, manifestando una diferencia significativa en comparación del medio con Urea. En la Figura 1C se muestra que el desarrollo poblacional de *Penicillium* sp. a un valor de pH de 3.5 fue significativamente superior al de los pH's de 5.0 y 6.0, mientras que la diferencia entre éstos dos últimos no mostró diferencia notable.

Las Figuras 2 muestra los resultados de tres tratamientos para cada medio nutritivo que presentaron el mayor crecimiento poblacional de *Penicillium* sp. de acuerdo con el diseño experimental. La cantidad de microorganismo al $t=0$ h fue de 4500 UFC mL^{-1} . Se observó que el mejor resultado se obtuvo con el medio $N_2 = \text{Nitrofoska-Azul}$, $pH_1 = 3.5$, $T_2 = 35^\circ\text{C}$, con un máximo de crecimiento poblacional de $4.28 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ a los 20 d. Los siguientes mejores tratamientos fueron (en orden decreciente de desarrollo fúngico): $N_2 = \text{Nitrofoska-Azul}$, $pH_3 = 6.0$, $T_1 = 29^\circ\text{C}$ ($3.18 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ a los 13 d), $N_2 = \text{Nitrofoska-Azul}$, $pH_2 = 5.0$, $T_1 = 29^\circ\text{C}$ ($2.92 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ a los 33 d), $N_1 = \text{Urea}$, $pH_1 = 3.5$, $T_1 = 29^\circ\text{C}$ (8.9×10^4 a los 25 d), $N_1 = \text{Urea}$, $pH_3 = 6.0$, $T_1 = 29^\circ\text{C}$ (5.8×10^4 a los 9 d), y $N_1 = \text{Urea}$, $pH_2 = 5.0$, $T_1 = 29^\circ\text{C}$ (4.1×10^4 a los 22 d). La multiplicación máxima de los medios preparados con Nitrofoska fue superior a los preparados con Urea.

FIGURA 1 : DESARROLLO DE *PENICILLIUM* SP A DIFERENTES CONDICIONES DE:
A) TEMPERATURA, B) NUTRIENTES Y C) pH.
MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS CON DIFERENTES LETRAS TIENEN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS SIGNIFICATIVAS ($\alpha \leq 0.05$)

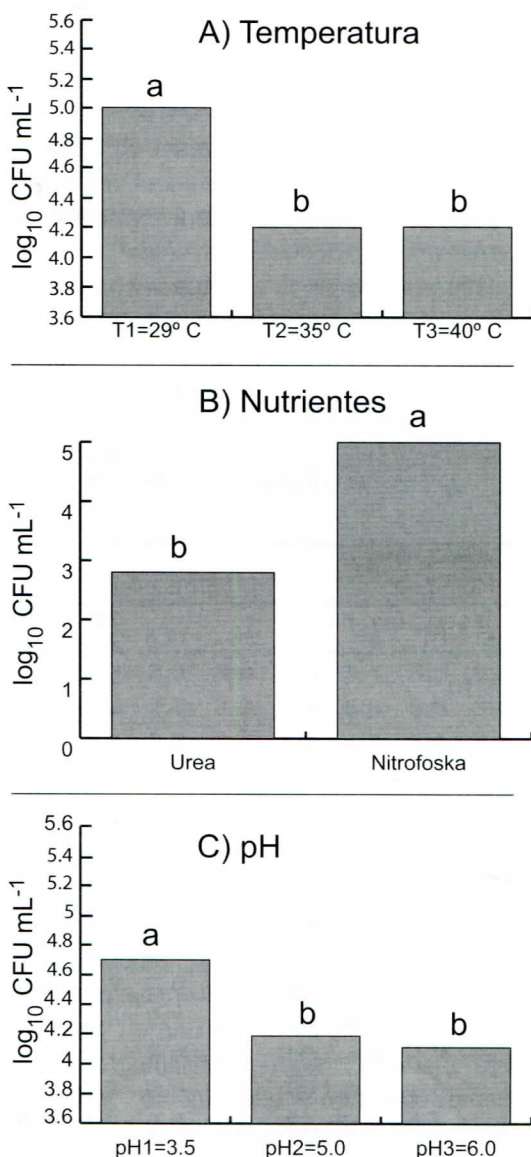


FIGURA 2 : DESARROLLO DE PENICILLIUM SP EN TRATAMIENTOS A NIVEL MATRAZ
(4.5×10^3 UFC mL^{-1} , AL T= 0D)

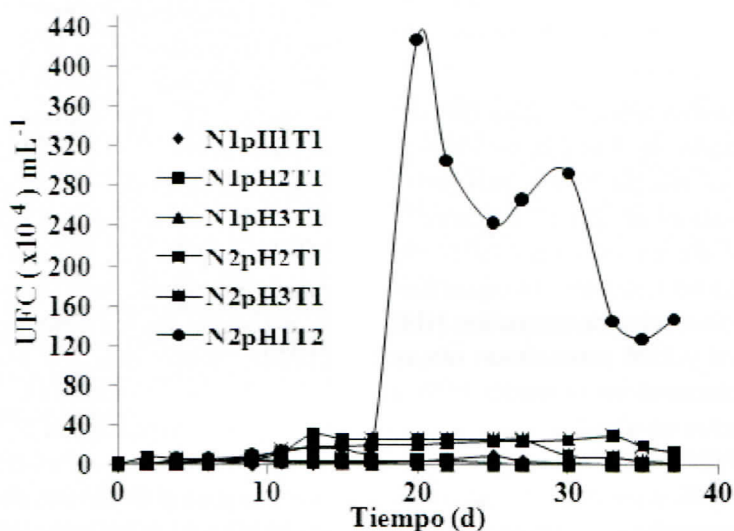
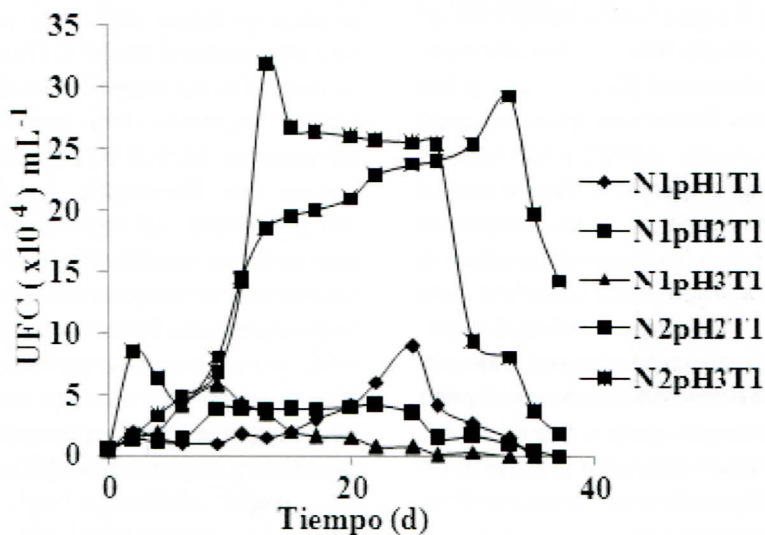


FIGURA 3 : DESARROLLO DE PENICILLIUM SP EN TRATAMIENTOS A NIVEL MATRAZ
(4.5×10^3 UFC mL^{-1} , AL T= 0D)



Mientras que la Figura 3 es una ampliación de la figura 2, que no incluye el tratamiento N_2 =Nitrofoska-Azul $pH_1=3.5$ $T_2=35^\circ C$.

Discusión

El estudio se realizó sobre un suelo *Gleysol-mólico* del estado de Tabasco en México, contaminado por más de 20 años con petróleo crudo (Zavala *et al.*, 2003). La cuantificación de HTP dio un valor de 4.0×10^5 mg kg^{-1} HTP. El Cuadro 1 muestra 14 cepas fúngicas, de las cuales las denominadas H14, H18, H19, H29 y H24 presentaron mayor desarrollo poblacional en el medio PDA y fueron sembradas en el medio SAC, donde H14, H18 y H24 mostraron mayor crecimiento (Cuadro 2), y pudieron considerarse como cepas especializadas y degradadoras de hidrocarburos, según Atlas *et al.* (1991) y Adams-Schroeder *et al.* (2002), por su poder de adaptación en suelos contaminados con HTP (Cerniglia y Heitkamp, 1987; Heidelberg *et al.*, 2002; Leitão, 2009). A continuación, estas 3 cepas fueron sembradas en el medio LAC, donde H24 presentó el mayor crecimiento poblacional (Cuadro 3), y fue clasificada como *Penicillium* sp. de acuerdo con Barnett y Hunter (1972), y con Mier *et al.* (2000). Esto se puede atribuir a que el *Penicillium* sp. posee en la membrana un grupo específico de oxigenasas asociado a la producción de agentes de superficie (Lee y Levy, 1989; Walton *et al.*, 1994). Sin embargo, hasta el momento sólo se puede hablar del potencial del *Penicillium* en el campo de la biorremediación, puesto que no se encuentra información relativa a la generación de biomasa fúngica de este hongo hidrocarboclasta con miras a su aplicación en bio-

remediación de petróleo crudo en suelos, es decir, no se encuentran reportados estudios a gran escala (Leitão, 2009).

Posteriormente se estableció el experimento en el laboratorio para la determinación de los parámetros óptimos de crecimiento fúngico. El *Penicillium* sp. presentó pigmentación roja en los tratamientos con urea, coincidiendo con Méndez-Zavala *et al.* (2007). Al respecto Cho *et al.* (2002), han informado que la fuente de nitrógeno marca un efecto muy significativo sobre la expresión de los pigmentos. Alexander (1994), indicó que los microorganismos presentan el crecimiento óptimo en un rango de temperatura de 28 a 39 °C. Varios investigadores han señalado temperaturas óptimas para el desarrollo del *Penicillium* sp de 30 °C o 31 °C (Castro-Riquelme, 2008; Leitão, 2009). Por su parte, Corry (1987) y Lacey (1989) reportaron que en nueve especies de *Penicillium* la temperatura media óptima de crecimiento fue de 28 °C. La Figura 1A muestra que *Penicillium* sp produjo el mejor desarrollo poblacional a una temperatura de 29°C (Tukey $\alpha \leq 0.05$), lo que esta de acuerdo con Isitua e Ibeh (2010), quienes han recomendado un intervalo de 28 ± 2 °C para el crecimiento óptimo del *Penicillium* sp. Respecto a los nutrientes, se registraron evidencias estadísticas significativas (Figura 1B), resultando el mejor crecimiento en el tratamiento con Nitrofoska-Azul (4.28×10^6 UFC mL^{-1}), lo que se atribuye a contiene P y K, elementos que no proporciona la Urea. La Figura 1C presenta diferencia estadística significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$), con mayor población de 1×10^5 UFC mL^{-1} en el tratamiento $pH_1=3.5$. Según

Alexander (1994), los hongos presentan el crecimiento óptimo en medio con agar a un pH de alrededor de 4.0. Los resultados obtenidos por Sanchis et al. (1992), en su estudio sobre *Penicillium griseofulvum*, mencionaron que el pH óptimo se encuentra en un rango de 3.5 a 4.5. Sin embargo, Hussein y Abdel-Fattah (2002), han indicado como 7.0 el valor de pH para el crecimiento óptimo en sus estudios sobre *Penicillium* sp. Con estos datos se procedió a planificar el diseño experimental a fin de determinar las mejores condiciones de desarrollo del *Penicillium* sp., y así emplear el tratamiento más eficiente en la obtención de biomasa fúngica hidrocarbonoclasta.

Las Figuras 2 y 3 muestran el desarrollo fúngico obtenido en los 6 mejores tratamientos del diseño experimental consistente de 18 u.e. Todos los medios tuvieron un rápido desarrollo microbiano los dos primeros días, llegando a un orden de magnitud de 10^4 , para luego continuar su adaptación en cada medio en el mismo orden de magnitud de manera paulatina, previo a su desarrollo exponencial, logrando un máximo en el mismo orden de magnitud que la meseta previa para el caso de la Urea, pero para el caso de Nitrofoska-Azul el máximo llegó a 10^5 ($N_2pH_3T_1$ y $N_2pH_2T_1$) e incluso de 10^6 para el medio $N_2pH_1T_2$. Posteriormente, en cada tratamiento disminuyó la población fúngica, alcanzando una meseta que continuaba disminuyendo la cantidad de microorganismo hasta su eliminación o término del estudio. Los tratamientos a base de Nitrofoska-Azul lograron la mayor multiplicación del *Penicillium* sp por sobre los medios preparados con Urea. El mejor de todos los tratamientos fue el denominado

$N_2pH_1T_2$ con 4.28×10^6 UFC mL⁻¹ a los 20 d, el segundo mejor medio fue el $N_2pH_3T_1$ con 3.18×10^5 UFC mL⁻¹ a los 13 d, correspondiente al 7.43 % del desarrollo poblacional microbiano logrado con el medio $N_2pH_1T_2$. El mejor medio con Urea, logró un a multiplicación fúngica correspondiente al 2.08 % del $N_2pH_1T_2$ ($N_1pH_1T_1$, con 8.9×10^4 UFC mL⁻¹ a los 25 d). Finalmente, el sexto mejor medio ($N_1pH_2T_1$, con 4.1×10^4 UFC mL⁻¹ a los 22 d), alcanzo 0.96 % del desarrollo logrado por el medio $N_2pH_1T_2$.

Los resultados expuestos en esta investigación, el estudio sobre la obtención de biomasa bacteriana en biorreactor por Hernández et al. (2011), y el costo del fertilizante Nitrofoska-Azul (bulto de 50 kg: Urea 21.34 dollar, Nitrofoska-Azul 61.04 dollar), dan soporte para recomendar la obtención de biomasa fúngica empleando el fertilizante Nitrofoska-Azul, por sobre la Urea.

Conclusiones

La investigación sobre un suelo *Gleysol-mólico* del estado de Tabasco en México, determinó que estaba contaminado con 4.0×10^5 mg kg⁻¹ (400,000 ppm) de HTP. Este suelo se muestreó, y se aisló y caracterizó el hongo hidrocarbonoclasta *Penicillium* sp. La adaptación del microorganismo en dos medios nutricionales: Urea y Nitrofoska-Azul, a tres temperaturas y tres pH, sirvieron para diseñar un experimento completamente al azar. En base a los resultados obtenidos del diseño experimental, se encontró que el tratamiento con Nitrofoska-Azul, pH de 3.5 y a una temperatura de 35 °C ($N_2pH_1T_2$), presentó el mejor crecimiento poblacional a los

20 d con 4.28×10^6 UFC mL⁻¹. Por lo anterior y considerando los costos de los fertilizantes y estudios previos de nuestro equipo de investigación, se recomienda el empleo de estas condiciones experimentales para la obtención de biomasa fúngica, a fin de que sea considerada en una estrategia de biorremediación por bioaumentación sobre suelos contaminados con petróleo crudo, y contribuir así a dar solución al problema de los suelos contaminados con hidrocarburos en México y en el mundo.

Agradecimientos

Esta investigación forma parte del proyecto POA-2008011, "Determinación de los Parámetros Óptimos de Crecimiento para la Producción de Biomasa Bacteriana y Fún-

gica Hidrocarbonoclasta", desarrollado por la División Académica de Ingeniería y Arquitectura (DAIA) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), con financiamiento parcial por parte de la empresa Corporativo de Servicios Ambientales S.A. de C.V. (CORSA). Los autores agradecen a la DAIA de la UJAT por el apoyo para llevar a cabo el presente trabajo de investigación, al Ing. Alfredo Castro Betancourt, Gerente General de CORSA S.A de C.V. por la gestión del financiamiento otorgado al proyecto, a los señores Mauricio Kohan Rubio y Cristián Contreras Radovic, Decano de la Facultad de Salud y Ciencias A. F. y Director de Investigación, respectivamente, de la Universidad Internacional SEK, por las facilidades otorgadas para la organización y conclusión del presente documento.

Bibliografía

- Adams-Schroeder, R. H., Dominguez-Rodríguez V. I., Vinalay Carrillo, L. (2002). "Evaluation of microbial respiration and ecotoxicity in contaminated soils representative of the petroleum producing region of southeastern México". Terra Latinoam. 20, 253-265.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. Acad. Press, San Diego, 302 p.
- April, T.M., J.M. Foght, and R.S. Currah. (2000). "Hydrocarbon-degrading filamentous fungi. Isolated from flare pit soils in northern and western Canadá". J. Microbiol. 46, 38-49.
- Arias, S. (2010). *Desarrollo económico de Tabasco. Tabasco hoy*. http://www.tabascohoy.com.mx/noticia.php?id_notas=190648. 28/12/2010.
- Atlas, M. R., Horowitz, A., Krichevsky, M., Bej, K. A. (1991). "Response of microbial population to environmental disturbance". Microbial Ecol. 22, 249-256.
- Barnett, H., and B. Hunter. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3 ed. Burgess Pub. Company, Minnesota, 241 p.
- Castro-Riquelme, Yuri. (2008). *Estudios de toxicidad y biodegradación de hidrocarburos modelo en hongos filamentosos*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma

Metropolitana, México, D.F., 90 p.

- Cerniglia, C. E., Heitkamp, M. A. (1987). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in the aquatic environment. In: U. Varausi (ed.). *Metabolism of PAH in the Aquatic Environment*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp: 41-68.
- Chávez-Gómez, B., Quintero, R., Esparza-García, F., Mesta-Howard, A. M., Zavala, D. F. J., Hernández-Rodríguez, C. H., Gillén, T., Poggi-Varaldo, H. M., Barrera-Cortés J., Rodríguez-Vázquez R. (2003). "*Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith*". *Biorresource Tech.* 89, 177-83
- Cho, Y. J., Park, J.P., Hwan, H. J., Kim, S. W., Choi, J.W., Yun, J.W. (2002). "*Production of red pigment by submerged culture of Paecilomyces Sinclairii*". *Lett. of Appl. Microbiol.* 35, 195-202.
- Corry, J. E. L. (1987). Relationships of water activity to fungal growth. In: Van Nostrand Reinhold (ed.). *Food and Beverage Micology*. Beuchat LR, New York, pp: 51-99.
- Cruz-Serrano, N. (2010). Pemex, tercera petrolera en el mundo en 2009. *El Universal*. <http://www.eluniversal.com.mx/finanzas/80420.html>. 28/12/2010.
- D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., Petruccioli, M. (2006). "*Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons*". *Applied and Environmental Microb.* 72, 28-36.
- EPA-Method-1664A. (1999). Revision A. n-Hexane Extractable Material. <http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/oil/1664guide.pdf>
- EPA-Method-3540C. (1996). Soxhlet Extraction. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>.
- EPA-Method-9071B. (1998). n-hexane extractable material (hem) for sludge, sediment, and solid samples. <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-9071B.pdf>
- Ercoli, E., Gálvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., Bauzá, J. (2000). *Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo*. In: Congreso Producción. III Workshop Latinoamericano sobre aplicaciones de la Ciencia en la Ingeniería de Petróleo. Puerto Iguazú. Argentina. Formato electrónico.
- Eweis, J., Ergas, S., Chag, D., Schoroeder, E. (1999). *Principios de Biorrecuperación*. McGraw-Hill, Madrid, 327 p.
- Gesinde, A. F., Agbo, E. B., Agho, M. O., Dike, E. F. C. (2008). "*Bioremediation of Some Nigerian and Arabian Crude Oils by Fungal Isolates*". *Int. J. Pure App. Scs.* 2(3), 37-44.
- Heidelberg, J. E., Paulsen, I. I., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W.C., Read, T. D., Eison, J. A. (2002). "*Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium*.

Shewanella oneidensis". Nature and Biotech. 1, 1-6.

- Hernández, E.C. (2009). Innovación tecnológica base para extracción de petróleo. Milenio Tabasco. <http://www.skyscrapercity.com/showthread.php?t=634607&page=18>. 28/1/2010.
- Hernández-Rivera, M. A., Ojeda-Morales, M. E., Martínez-Vázquez, J. G., Villegas-Cornelio, V., Córdova-Bautista, Y. (2011). "Optimal parameters for In Vitro development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus sp.*" J. Soil Sci. Plant Nutr. 11(1), 29-43.
- Hussein, Hany M., Abdel-Fattah, Yasser R. (2002). "Numerical modelling of petroleum oil bioremediation by a local *Penicillium* isolate as affected with culture conditions: Application of Plackett-Burman design". Arab J. Biotech. 5(2), 165-172.
- INEGI. (2001). Síntesis Geográfica, Nomenclátor y Anexo Cartográfico del Estado de Tabasco, México. 116 p.
- INEGI. (2009). Comunicado Núm. 203/09. 10 p.
- Isitua, C. C., Ibeh, I. N. (2010). "Comparative study of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* in the biodegradation of automotive gas oil (AGO) and premium motor spirit (PMS)". African Journal of Biotechnology 9, 3607-3610.
- Jeonge-Dong Kim, Choul-Gyun, Lee. (2007). "Microbial degradation of Polycyclic aromatic hidrocarbons in soil by bacterium-fungus Co-cultures". Biotech. and Bioproc. Engin. 12, 410-416.
- Johnson, L. F., Curl, E. A. (1972). *Methods for Research on the Ecology of Soil-Borne Plant. Pathogens*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN, 247 p.
- Kiehlmann, E., Pinto, L., Moore, M. (1996). "The transformation of chrysene to trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene by filamentous fungi". Can. J. Microbiol. 42, 604-608.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. O., Lugtenberg, B. J. J. (2004). "Rhizoremediation. A beneficial plant microbe interaction". Molecular plant-microbe interactions 17, 6-15.
- Lacey J. (1989). "Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products". J. of Appl. Bacteriol., Symposium Supplement 11S-25S.
- Launen, L., Pinto, L., Wiebe, C., Kiehlmann, E., Moore, M. (1995). "The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi". Can. J. Microbiol. 41, 477-488.
- Lee, K., Levy, E. M. (1989). *Biodegradation of petroleum in the marine environment and its enhancement*. In: J. O. Nriagu, J. S. S. Lakshminarayana (eds). Aquatic toxicology and water quality management. John Wiley and Sons Inc., New York, pp: 217-243.
- Leitão, A. L. (2009). "Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. Int. J. Environ". Res. Public Health. 6, 1393-1417.

- Levin, M., Gealt, M. (1997). *Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos*. McGraw-Hill. Madrid, España. 354 p.
- Machín-Ramírez, C., Morales, D., Martínez-Morales, F., Okoh A. I. Trejo-Hernández, M. R. (2010). “*Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains*”. Inter. Biodeter. and Biodeg. 64, 538-544.
- Madigan, M. T., Martinko J. M., Parker, J. (2003). Brock. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall, Madrid, 1096 p.
- Méndez-Zavala, J. C., Contreras, F., Lara, R., Victoriano, R., Rodríguez, R. (2007). “*Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica Penicillium purpurogenum GH-2*”. Rev. Mexicana de Ing. Química 6, 267-273,
- Mier, T., Toriello, C., Ulloa, M. (2000). *Hongos Microscópicos Saprobios y Parásitos: Métodos de Laboratorio*. UAM-UNAM, México D. F., 90 p.
- Mittal, A., Singh, P. (2009). “*Studies on biodegradation of crude oil by Aspergillus niger*”. The South Pacific J, of Nat. Science 27, 57-60.
- Nkwelang G., Kamga, F. L., Nkeng, E., Antai, S. P. (2008). “*Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical soil polluted with oily sludge*”. African J. of Biotech. 7, 1075-1080.
- NOM-021-RECNAT-2000. (2002). Apartado 6.1. Evaluación de la conformidad para muestreo de suelos. Diario Oficial de la Federación, Segunda Sección, Diciembre de 2002.
- Obire, O., Anyanwu, E. C., Okigbo. R. N. (2008). “*Saprophytic and crude oil degrading fungi from cow dung and poultry droppings as bioremediating agents*”. J. of Agricultural Tech. 4, 81-89.
- Obire, O., Anyanwu, E. C. (2009). “*Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil*”. Int. J. Environ. Sci. Tech. 6, 211-218.
- Ogbulie, T. E., Nwigwe, H. C., Iwuala, M. O. E., Okpokwasili, G. C. (2010). “*Study on the use of monoculture and multispecies on bioaugmentation of crude oil contaminated agricultural soil*”. Nigerian J. of Microbiol. 24, 2160-2167.
- Okoro, C. C. (2008). “*Biodegradation of hydrocarbons in untreated produce water using pure fungal cultures*”. African J. of Microbiol. Res. 2, 217-223.
- PEMEX. (1988). El petróleo. Edición revisada y redactada por H. Covantes, Petróleos Mexicanos, México, D.F., 176 p.
- Pica, G. Y., Ronco, A., Díaz, B.M. (2004). Bioensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Método de enumeración celular basado en el uso de hematocímetro Neubauer. In: M. G. Castillo (eds.). *Ensayos toxicológicos y*

métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México. pp: 62-73.

- Radwan, S. S., Sorkhoh, N. A., Fardoun, F., Al-Hasan, R. H. (1995). "Soil management enhancing hydrocarbon degradation in the polluted Kuwaitii desert". Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 265-270.
- Rivera-Cruz, M. C. (2001). Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán (*Echinochloa polystachya* H.B.K. Hitchc) y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el benzo(a)pireno. Tesis de doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, 348 p.
- Rivera-Cruz, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Vásquez R., Fernández-Linares L. (2002). "Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo". Terra Latinoamer. 20, 423-444.
- Sanchis, V., Lafuente, F., Vinas, I., Torres, M., Canela, R. (1992). "Influence of incubation conditions in the patulin production by *Penicillium griseofulvum* Dierckx". Rev. Iberoam. Micol. 9, 88-90.
- Sing, H. (2006). *Mycoremediation*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 592 p.
- Valenzuela, F. E., Solís, M. L., Martínez, V. O., Pinochet, T. D. (2006). "Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo". Boletín Micológico 21, 35-41.
- Walton, B. T., Guthrie, E. A., Hoylman, A. M. (1994). Toxicant degradation in the rhizosphere. In: T. A. Anderson, J. R. Coats (eds.). *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. American Chemical Society, Washington, DC, pp: 11-26.
- Wunder, T., Marr, J, Kremer, S, Sterner, O., Anke, H. (1997). "1-Methoxy pyrene and 1,6-dimethoxy pyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons". Arch. Microbiol. 167, 310-316.
- Zavala-Cruz, J., V.A. Botello, S.R.H Adams, y A. Ruiz-Bello. (2003). *Hidrocarburos Alifáticos y aromáticos en las tierras*. In: J. Zavala-Cruz, M. C. Gutiérrez-Castorena, D. J. Palma-López (eds.). *Impacto ambiental en las tierras del campo petrolero Samaria*, Colegio de Postgraduados, CONACYT, CCYTET, Villahermosa, Tabasco, 131 p.