

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS**  
**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**  
**LABORATORIO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD**  
**DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS.**  
**MÉRIDA-VENEZUELA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UN HONGO DEL**  
**GÉNERO *Aspergillus* AISLADO A PARTIR DE MEZCLAS DE PETRÓLEO**  
**EXTRAPESADO VENEZOLANO.**

**Trabajo de Grado para optar por el título de Licenciado (a) en Bioanálisis en la**  
**carrera de Bioanálisis.**

**Tesista:**

**Díaz Figueroa, Nelson Gerardo**

**Tutor:**

**Prof. Andrades, Efrén**

**Mérida, Octubre de 2016**

## DEDICATORIA

A **Dios** por la vida, la Salud y el entendimiento para realizar este trabajo.

A **Julieta y Nelson**, mis padres, por ayudarme, por guiarme, por nunca dejar que perdiera el horizonte.

A **mi abuela Jovita**, donde estés viejita mil gracias.

A **mi tía Zoraida y mi tío Gilberto** gracias por todo lo que hicieron por mí.

A **Jesús Ignacio** para que mis logros sean mañana tu ejemplo hijo mío.

A **Sebastián Josué**, todo se puede sobrino.

A **mis hermanas**, siempre triunfaremos no importa cuánto nos cueste.

www, bdigital.ula.ve

## **AGRADECIMIENTO**

**A Dios y a la Virgencita del Valle**, gracias por siempre cuidarme y escuchar mis peticiones.

**A toda mi familia** por estar allí a pesar de todo, mil gracias los quiero.

**Al señor Efrén Andrades** -mi tutor- **y a su señora esposa Cristina Grassi**, por su valiosa contribución en el desarrollo de mi trabajo de grado, por su alegría, por su paciencia, muchísimas gracias.

**A Paola**, Pao gracias por todo, muchísimas gracias...

**Al Laboratorio de Biotecnología**, por ser el lugar de trabajo, risas y anécdotas.

**A la Ilustre Universidad de los Andes**, por instruirme, por permitirme crecer dentro de tus espacios, por colocar en mi camino grandes profesores -los hijos que formaste- eternamente agradecido. **FELIZ DE SER ULANDINO.**

A ustedes gracias...

**Nelson**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I. EL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la investigación	5
Alcances y Limitaciones de la investigación	6
<b>CAPITULO II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	13
Bases Teóricas	20
<b>CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>34</b>
Tipo de Investigación	34
Metodología	35
Diseño de Investigación	42
<b>DISEÑO DE ANALISIS</b>	<b>42</b>
Análisis de datos	43
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOHEMEROGRAFIA</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Muestras de petróleo	45
<b>Tabla 2.</b> Crecimiento de cepas en distintos medios	45
<b>Tabla 3.</b> Crecimiento Bacteriano a partir de distintos medios	48
<b>Tabla 4.</b> Promedio de estructuras microscópicas del Hongo	49
<b>Tabla 5.</b> Crecimiento en Medio Haff con petróleo por “agotamiento metabólico	50
<b>Tabla 6.</b> Crecimiento en medio Haff con aceite biocompatible por “agotamiento metabólico”	51

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Aspergillus niger</i>	31
<b>Figura 2.</b> Bacterias gram positivas y gram negativas	37
<b>Figura 3.</b> <i>Aspergillus</i> coloreado con azul de Lactofenol	37
<b>Figura 4.</b> Placas y tubos de ensayo	47
<b>Figura.</b> Agar Bennett	47
<b>Figura 6.</b> Hongo en cuñas de Agar Tripticasa Soya	48
<b>Figura.</b> Fotografía de <i>Aspergillus niger</i> coloreado con Azul de Lactofenol tomada en el laboratorio 40x	50
<b>Figura 8.</b> <i>Aspergillus niger</i> Sembrado en cuña de Haff petróleo con aceite biocompatible	51
<b>Figura 9.</b> Placas, tubos y medios antes de esterilizar en Autoclave	52
<b>Figura 10.</b> Autoclave	52
<b>Figura 11.</b> <i>Aspergillus niger</i> 40X	52

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE FARMACIA BIOANÁLISIS**  
**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**  
**LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO DE**  
**INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS**  
**MÉRIDA- VENEZUELA**

**Trabajo de Grado para optar por el título de Licenciado (a) en Bioanálisis en la  
carrera de Bioanálisis.**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UN HONGO DEL  
GÉNERO *Aspergillus* AISLADO A PARTIR DE MEZCLAS DE PETRÓLEO  
EXTRAPESADO VENEZOLANO.**

**Autor: Díaz F. Nelson G.**

**Tutor: Andrades, Efrén**

**RESUMEN**

El petróleo ha dejado su huella imborrable en la economía venezolana desde muchos años atrás. En el pasado dio un vuelco a la actividad productiva venezolana. En el presente aún no podemos prescindir de él. En el futuro todavía su influencia se prolongará durante un largo horizonte de tiempo. En Venezuela y el mundo las tecnologías de biorremediación, así como la microbiología de petróleo son campos que pueden ser desarrollados debido a su utilidad e importancia dentro del ámbito económico y medio ambiental. En este trabajo experimental se realizó la caracterización y el aislamiento de cepas de *Aspergillus* en mezclas de petróleo extrapesado venezolano en medios Haff con petróleo, medio Haff con aceite biocompatible, Agar Tripticosa Soya, Agar Bennett, Agar Sabouraud Dextrosa. Fueron descritas las características macroscópicas y microscópicas del hongo aislado. Además de evaluar su crecimiento en los distintos medios. Luego estos resultados microscópicos y macroscópicos fueron comparados con bibliografías dando por resultado el aislamiento y caracterización de una cepa de *Aspergillus niger*. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa de *Aspergillus niger* es capaz de crecer en medios con diversas concentraciones de Tween 80, etanol y petróleo.

**Palabras claves:** *Aspergillus niger*, Biorremediación, petróleo, hongos, biodegradación.

## INTRODUCCIÓN

Esta Investigación tiene como propósito principal el estudio de hongos del género *Aspergillus*, a través de su caracterización y aislamiento en muestras de petróleo pertenecientes al Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Además de estudiar sus posibles usos en tecnologías de biorremediación ambiental.

En Venezuela y el mundo las tecnologías de biorremediación, así como la microbiología de petróleo son campos que pueden ser desarrollados debido a su utilidad e importancia dentro del ámbito económico y medio ambiental.

El petróleo ha dejado su huella imborrable en la economía venezolana desde muchos años atrás. En el pasado dio un vuelco a la actividad productiva venezolana. En el presente aún no podemos prescindir de él. En el futuro todavía su influencia se prolongará durante un largo horizonte de tiempo. Si bien es cierto que en los últimos años esta influencia ha experimentado una leve declinación, como bien lo demuestran las cifras, aún continúa siendo el principal renglón de exportación con que cuenta el país, el sector más influyente en la actividad productiva nacional, la principal fuente de divisas y parte sustancial de los ingresos fiscales.

Con la revolución industrial se inicia un cambio sustancial en el tratamiento del ambiente, caracterizado, por un lado, por el aumento en la explotación de los recursos no renovables, y por el otro, por la producción de residuos contaminantes de distinta naturaleza; todo ello aunado a un incremento poblacional sostenido y a un aumento de las necesidades humanas. Debido a esto, se llegó a una etapa en que, gracias a la rápida aceleración de la ciencia y la tecnología, el hombre adquirió el poder de transformar, de innumerables maneras y a una escala sin precedentes, cuanto lo rodeaba. Es por esto que en los últimos años a nivel mundial, tanto los gobiernos como las industrias han comenzado a preocuparse por los asuntos ambientales, buscando la forma de minimizar los impactos que sobre el ambiente, las comunidades y las personas producen los procesos que sostienen nuestra forma de vida a largo plazo. Aunque la preocupación por el ambiente está asociada a nuestra propia supervivencia, también está relacionada con el campo de la comercialización tanto nacional como internacional, pues la competitividad en los mercados es mayor cada día debido a que los clientes exigen que los productos a consumir sean amigables con



el ambiente en todo su ciclo de vida y que pueda analizarse la variable ambiental desde un punto de vista económico. Las grandes empresas petroleras son las principales generadoras de energía para el planeta y constituyen importantes fuentes de ingresos para los países donde radican. Estas empresas desarrollan diversos macroprocesos que por su naturaleza producen impactos al ambiente, pero cada vez más aumenta el empeño por minimizar estos impactos. Así, se percibe una fuerte tendencia a mejorar las políticas ambientales, realizar estudios en materia ambiental y optimizar las líneas de producción en general utilizando tecnologías limpias y de última generación.

Los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de los HAPs en los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural (Prince, 1993; Sutherland *et al.*, 1995). Por lo tanto es necesario un buen conocimiento y control de este proceso natural para aplicarlo a tecnologías de biorremediación (Whise, 2000). Según (Prince, 1993). La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural Este proceso se puede acelerar y/o mejorar mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación (Alexander, 1999). El crudo de petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos de interés en biorremediación. Son procesos naturales que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y se pueden realizar a un bajo coste. En muchos casos, pueden llevarse a cabo en el sitio donde se ha producido la contaminación, con lo cual se elimina la necesidad de transportar materiales peligrosos. Los tratamientos de biodescontaminación se basan en la acción de microorganismos o plantas sobre los agentes contaminantes.

Evidentemente, el proceso biológico para tratar compuestos tóxicos, debe competir con los métodos existentes, en términos de economía y eficiencia. Los procesos biológicos tienen las ventajas de requerir inversiones moderadas de capital, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos. (Martin C *et al.*).

## **CAPITULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del Problema**

Si bien es cierto que en los últimos años esta influencia ha experimentado una leve declinación, como bien lo demuestran las cifras, aún continúa siendo el principal renglón de exportación con que cuenta el país, el sector más influyente en la actividad productiva nacional, la principal fuente de divisas y parte sustancial de los ingresos fiscales. Además del peso evidente que su comportamiento tiene sobre las expectativas de los diversos agentes económicos, generando unas veces optimismo y otras desconfianza ante la perspectiva de un futuro incierto.

En Venezuela, la Faja Petrolífera del Orinoco constituye la mayor reserva probada de crudo pesado y extrapesado del mundo con más de 580 mil millones de barriles distribuidos en un área de 55.314 Km<sup>2</sup>. A nivel mundial la biotecnología y la biología molecular aplicada al petróleo y al ambiente es poco frecuente, de hecho este caso es uno de los pocos en el mundo en el que se aplica la biotecnología directamente a la industria petrolera.,

El desarrollo de proyectos con el uso de biotecnología fortalece las capacidades productivas de la industria petrolera. Las últimas investigaciones realizadas sobre la microbiología del petróleo y biotecnología permitirán dar un valor agregado tanto a la extracción de crudos así como también a la biorremediación de los accidentes petroleros y residuos producidos que son parte de la industria.

Se han reportado numerosos trabajos sobre la biodegradación efectiva del petróleo en suelos contaminados, mediante el uso de metodologías que involucran el empleo de medios enriquecidos o condiciones que favorecen el desarrollo de cepas de interés con capacidades biodegradativas, y que a la vez limitan, por competencia, el desarrollo de cepas que no presentan estas propiedades (Wick et al. 2003).

Venezuela, un país petrolero y minero, donde existen problemas de contaminación de ecosistemas frágiles y algunas áreas agrícolas, requieren investigación destinada al desarrollo de técnicas biocorrectoras adaptadas a las condiciones ecológicas del país. El fundamento de estas técnicas está basado en que muchos de los compuestos xenobióticos son semejantes a los naturales y, por tanto, factibles de degradación o inertización. No obstante existen algunos compuestos más complejos, difíciles de degradar. El objetivo de este trabajo es estudiar el papel de los microorganismos en la degradación de compuestos xenobióticos, su importancia desde el punto de vista ambiental y estudiar los factores y mecanismos que afectan el proceso de degradación, así como las técnicas de biorrecuperación más comunes que se emplean en la actualidad. Tomado de la tesis de postgrado de Duilio Torres Rodríguez, Facultad de Agronomía, postgrado Ciencia del Suelo, Universidad Central de Venezuela. 2101 Maracay (Aragua), Venezuela.

Basado en lo anteriormente planteado, la presente investigación se hace la siguiente interrogante: ¿Se pueden aislar y caracterizar hongos del genero *Aspergillus* a partir de mezclas de petróleo pertenecientes al Instituto de Biotecnología de Facultad de Farmacia y Bioanálisis.?

## **HIPÓTESIS**

Se pueden aislar y caracterizar hongos del genero *Aspergillus* a partir de mezclas de petróleo diseñadas en la Sección de Biotecnología del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

### **Justificación de la Investigación**

Considerando que Venezuela es un país petrolero todas las investigaciones orientadas a generar conocimientos nuevos sobre la microbiología del petróleo son de gran utilidad para nuestro país.

Además se sabe de la capacidad de ciertos microorganismos para crecer en medios con condiciones extremas es por ello que en este trabajo se dará a conocer un hongo del Género *Aspergillus* capaz de crecer en agar petróleo y agar Haff con de aceite biocompatible.

### **Objetivos de la Investigación**

#### ***Objetivo general***

Describir hongos del género *Aspergillus* a partir de mezclas de petróleo pertenecientes al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis en el periodo comprendido entre Enero de 2013 y Febrero de 2015.

#### ***Objetivos específicos***

- Realizar una revisión bibliohemerográfica de estudios sobre aislamiento y caracterización de hongos del género *Aspergillus* y otros géneros en muestras de petróleo.
- Aislar hongos del género *Aspergillus* a partir de mezclas de petróleo pertenecientes al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.
- Caracterizar hongos a partir a partir de mezclas de petróleo pertenecientes al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, mediante el estudio de las estructuras microscópicas y el análisis de las colonias.
- Aislar hongos del género *Aspergillus* en Agar petróleo y agar Haff con aceite biocompatible.

### **Alcances y limitaciones**

El estudio de la microbiología de petróleo y las tecnologías de biorremediación buscan aportar nuevos conocimientos que ayuden al mejoramiento de suelos y aguas contaminadas por derrames petroleros.

También busca la caracterización, el aislamiento y el estudio de las características que permiten su desarrollo en condiciones extremas de pH, temperatura, calor, salinidad, presión, entre otras.

Este trabajo busca realizar un aporte al campo de la microbiología de petróleo, debido a que la cepa aislada y caracterizada puede desarrollarse en medios cuya única fuente de carbono es el petróleo.

La limitante de la investigación es la disponibilidad de los medios de cultivo para el estudio macroscópico y microscópico de la cepa, así como también el estudio de su capacidad metabólica para usar el petróleo como única fuente de carbono.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Para la realización de este marco teórico se hizo una revisión bibliográfica que permitió ampliar conocimientos y actualizar información relacionada, en el mundo y en nuestro país. Así como también precisar algunas teorías y fundamentos para fortalecer definiciones en torno al petróleo, la contaminación generada por derrames petroleros, la biorremediación, aplicaciones de microorganismos en tratamientos de biodescontaminación. Estos temas han sido abordados por autores en el mundo y en país entre ellos cabe destacar:

En las primeras fases de estudio, se aislaron cepas marinas degradadoras de crudo de petróleo, entre las que cabe destacar la cepa *Pseudomonas* sp. F21, capaz de degradar tanto la fracción saturada como los compuestos aromáticos de un crudo de petróleo ligero (Solanas, 1981). A continuación se iniciaron estudios para analizar en mayor profundidad la biodegradación microbiana de diferentes crudos de petróleo utilizando la cepa *Pseudomonas* sp. F21 (Solanas *et al.*, 1984; Bayona *et al.*, 1986; Grimalt *et al.*, 1991). Los estudios de biodegradación se combinaron con estudios de genotoxicidad ambiental de matrices contaminantes enriquecidas en hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Grifoll *et al.*, 1990 y 1992; Casellas, 1995), en los que quedó reflejado la importancia de los HAPs en la genotoxicidad en diferentes ambientes y matrices ambientales.

*Trametes versicolor* oxida PAHs por la acción de lacasas (Field, J. Jong, 1992.) *Phanerochaete chrysosporium*, por la oxidación de antraceno y pireno mediante las enzimas lignina peroxidasa y manganasa peroxidasa.

No sólo se ha reportado la degradación de HAP por *P. chrysosporium*, sino también por *A. niger*, que aunque no tiene enzimas extracelulares generadoras de radicales, degrada fenantreno y pireno, (Sack et al, 1997).

En el caso de *P. chrysosporium*, este tiene un sistema enzimático muy especial, dos de las enzimas más estudiadas son la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, se han utilizado con éxito en la biodegradación de muchos productos químicos. (Cameron et al, 2000), este hongo puede trabajar en dos tipos de condiciones ligninolíticas y no ligninolíticas.

(Zhongming, Z. et al., 2002.), *Pleurotusostreatus* degrada benzoantraceno, criseno, benzofluorantreno, benzopireno, dibenzoantraceno y benzoperileno a través de enzimas como lacasa y peroxidasa dependiente de manganeso. (Baldrian, P. et al. 2000.).

Boldu et al. (2002) estudiaron el papel del hongo *Cladophialophora sp.* Sobre la degradación de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno. El hongo no fue capaz de degradar el benceno, pero degradó los compuestos alcalinizados (tolueno, etilbenceno y xileno). El mecanismo de degradación fue una combinación de asimilación y cometabolismo. El tolueno y el etilbenceno fueron usados como fuente de carbono y energía. En el proceso degradativo actúa la enzima monooxigenasa la cual se encargó de la degradación del tolueno, etilbenceno y el xileno.

Se han publicado diversos trabajos de los que se concluye la gran diversidad de basidiomicetos con capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos tales



como *Tyromycespalustris*, *Gloeophyllumtrabeum*, *Stropharia coronilla* oxida benzopireno mediante la enzima manganasaperoxidasa (Steffen, K. et al 2003)

En una serie de estudios realizados en Omán se aislaron tres cepas de hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Penicillium chrysogenum* a partir de hidrocarburos, posteriormente se hicieron estudios de biodegradación en medio de cultivo líquido con 77 mg de hexadecano en 20 ml de medio, de las tres cepas la que más hexadecano consumió fue *A. niger* (60.2 mg), la que tuvo un consumo intermedio fue *A. terreus* (47.4 mg) y la cepa que menos consumió fue *P. chrysogenum* (44.0 mg). La producción de biomasa fue más o menos la misma excepto para *A. niger.*, *P. chrysogenum* produjo 50.7 mg de biomasa, *A. terreus* 50.4 mg de biomasa y *A. niger* 25.1 mg de biomasa. En estudios con petróleo crudo *A. niger* consumió solo 14.9 mg, *P. chrysogenum* 9.6 mg y *A. terreus* 8.2 mg, comparado con el hexadecano el crecimiento es menor (Elshafie, A. et al, 2007).

Los alumnos, del departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Yale, en Estados Unidos, realizan como parte de su curso trabajo de campo en la selva amazónica, donde recolectan organismos endófitos: hongos o bacterias que viven al menos parte de su vida en simbiosis en los tejidos de las plantas sin causar enfermedad. Priya Anand, una de las estudiantes, decidió investigar si los endófitos que había recogido en Ecuador en 2008 registraban actividad biológica en presencia del plástico. Luego de la graduación de Anand otros estudiantes continuaron la búsqueda. Jeffrey Huang investigó la capacidad de los organismos para romper enlaces químicos.

Lo que los estudiantes habían descubierto es que el hongo denominado *Pestalotiopsis microspora* puede degradar plástico. Varias especies de hongos pueden descomponer plástico al menos parcialmente, pero *Pestalotiopsis*, es el único que puede hacerlo sin presencia de oxígeno, algo fundamental para futuras aplicaciones en vertederos.

Recuperado el 9 de Agosto de 2013 de [http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2011/08/110809\\_hongo\\_plastico\\_am.shtml](http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2011/08/110809_hongo_plastico_am.shtml)

En el caso del fenantreno se ha reportado que puede ser degradado por *P. chrysosporium* y *A. niger*, Una posible ruta de biodegradación de fenantreno por *P. chrysosporium* fue propuesta por Sutherland (Ouyang y Fitzgerald, 2008).

Mittal, A. (2009), Una cepa de *Aspergillus niger* fue aislado de petróleo contaminado con suelo del área de producción en Andhra Pradesh (Lingala), India. Se analizó la reducción de algunas fracciones de hidrocarburos, tales como n-alcanos, aromáticos, nitrógeno, Azufre y Oxígeno mediante cromatografía de gas.

Horrutiner, Y. (2011) El uso de diferentes cepas del hongo *Aspergillus niger* en la sorción de metales pesados ha sido estudiado por diferentes autores. Se conocen los trabajos iniciales de Kapoor y Viraraghavan sobre la sorción de cadmio, cobre, níquel y plomo en la biomasa, viva y muerta, de *A. niger*. Por otra parte Akar y colaboradores realizaron experimentos de sorción para el Pb (II) y Cu (II) con la biomasa tratada de *Aspergillus flavus*.

Los estudios de optimización de condiciones para la biosorción de Pb (II) en la biomasa inactiva del hongo *A. niger* y la caracterización de este tipo de material se encuentran en la literatura de forma muy dispersa e incompleta. En particular, la caracterización se reduce generalmente a la aplicación de la espectroscopia infrarroja (IR). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar como sorbente la nueva cepa del hongo *A. niger* O-5 obtenida en Cuba, mediante varias técnicas analíticas tales como espectroscopia IR, microscopía electrónica de barrido, análisis térmico diferencial y el método de muestras pesadas de Marhol para determinar la constante de disociación. También se estudiaron y optimizaron las condiciones del proceso de sorción de Pb (II) en disoluciones simuladas en el laboratorio.

Tamariz, Carmen, (2011), recolectó suelos contaminados con hidrocarburos de ocho talleres mecánicos, de donde se aislaron hongos filamentosos mediante la técnica de dilución. Los cultivos puros se probaron en un medio selectivo de sales inorgánicas líquido con petróleo crudo al 1% como única fuente carbonada. En el primer aislamiento se obtuvieron un total de 47 cepas, de las cuales se logró identificar a nivel de género aproximadamente 30 cepas es decir un 64%, de donde el género más abundante fue *Penicillium sp.* La selección fue en tres series, en la primera se seleccionaron 25 hongos, de los cuales el 40% fueron *Penicillium sp.* En la segunda etapa se seleccionaron 13 hongos de los cuales el 45% estuvo representado por cepas del género *Penicillium sp.* En la tercera etapa se seleccionó 6 cepas de las cuales todas fueron *Penicillium sp.* Estos resultados son concordantes con la literatura, donde indican al género *Penicillium* como uno de los que posee especies con la capacidad de degradar petróleo.

En un trabajo de M. Vanishree et al. (2013) titulado “*Biodegradation of Petrol Using Aspergillus sp.*” Se demuestra la capacidad de las cepas de *Aspergillus* para degradar gasolina a través del análisis del pH de las muestras, el incremento de la densidad óptica y la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado. En el estudio se utilizó la caracterización microscópica y microscópica de las cepas, además de técnicas como HPLC para el estudio de las muestras.

Así mismo también se han descrito una gran variedad de géneros de hongos degradadores de HAPs como:

*Agrocybe, Aspergillus, Candida, Rinipellis, Chrysosporium, Cunninghamella, Bjerkandera, Fusarium, Mucor, Penicillium, Rhodotorula, Saccharomyces,*

*Syncephalastrum*, entre otros. Recuperado el 17 de mayo de 2014 de <http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>

## ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El ser humano ha usado técnicas de biorremediación durante siglos, en procesos que fueron inventados a menudo en entornos ajenos al impulso tecnológico del neolítico. Por ejemplo, hay evidencias de que una civilización amazónica creó las condiciones para que siglos después se extendiera la selva amazónica, gracias a la Terra Preta de Indio, o uso a gran escala de carbón vegetal (biochar) para fertilizar conscientemente grandes extensiones de terreno.

El investigador Johannes Lehmann ha constatado que la "tierra negra del Amazonas" (también "tierra oscura del Amazonas") no es fruto de la casualidad. Según Lehmann, una civilización precolombina que habitó la Amazonia entre los años 2500 y 500 antes de Cristo se sirvió de técnicas de fertilización del suelo basadas en el carbón vegetal, que beneficiaron a medio plazo sus cosechas.

A largo plazo, las técnicas de biorremediación y geoingeniería de la civilización precolombina habrían hecho posible el Amazonas tal y como lo conocemos. Paradójicamente, la zona podría padecer una regresión también causada por el ser humano. Existen otros ejemplos ancestrales de biorremediación con gran impacto. Por ejemplo, se ha desalinizado terreno agrícola durante siglos usando plantas capaces de extraer las sales del terreno.

Las técnicas de compostaje para convertir residuos orgánicos en fertilizante de calidad se remontan al momento en que el ser humano empezó a experimentar en zonas como el Creciente Fértil con la domesticación de las semillas silvestres que aportaban mayores ventajas nutritivas. El proceso, como explica Jared Diamond

en *Guns, Germs, and Steel (Armas, gérmenes y acero)*, derivó en los avances del neolítico e incluso en el dominio de determinadas civilizaciones sobre el resto. Recuperado el 20 de Febrero de 2012 de <http://faircompanies.com/news/view/biorremediacion-10-metodos-recuperacion-ecologica/>

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80. Los científicos observaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de realizar procesos de degradación.

Las primeras observaciones de biorremediación fueron con el petróleo, después de algunos organoclorados y organofosforados; “se advirtió que los microorganismos no sólo eran patógenos, sino que además eran capaces de absorber compuestos orgánicos, algunos naturales, otros sintéticos, y degradarlos, lo que constituye el objetivo de la biorremediación”.

Científicos e industriales, cuyo objetivo principal era la recuperación de un suelo impactado por un derrame de crudo, determinaron que ciertos microorganismos, sobre todo algunas bacterias, podían utilizar los hidrocarburos como alimento y fuente de energía. Las investigaciones demostraron que los microorganismos eran responsables de la descomposición, originando que éstas oxidaran el petróleo a dióxido de carbono, agua y energía. Pero algunos hidrocarburos son resistentes y no degradados totalmente, aunque pueden ser oxidados parcialmente a compuestos menos tóxicos o incorporados como material húmico del suelo, disminuyendo así su viscosidad (Davis, 1967; Atlas, 1986).

Venezuela, como país petrolero, se encuentra dentro de las naciones que producen materiales y desechos peligrosos, provenientes principalmente de la industria manufacturera y petroquímica. Desde el inicio de la actividad petrolera, el

medio en que ésta se ha desarrollado, se ha visto afectado por numerosas intervenciones que han dañado severamente el ambiente circundante. Todas las actividades que están envueltas en la exploración y explotación del petróleo provocan impactos potencialmente negativos al medio ambiente, la extracción, transporte y procesamiento de crudo generan grandes volúmenes de desechos como ripios, lodos petrolizados, agua de perforación y petróleo crudo, constituido básicamente por compuestos orgánicos aromáticos, poliaromáticos, derivados de hidrocarburos, compuestos inorgánicos y metales, los cuales son difíciles de degradar de manera natural, por la complejidad de su estructura y pueden actuar como contaminante si no se maneja de forma adecuada (Ewis et al. 1999).

El proceso de biorremediación fue probado con éxito en derrames accidentales de petróleo, como el caso del buque Exxon Valdez ocurrido en Alaska en 1989, y el caso del Prestige acontecido en 2002 frente a las costas de Galicia, en España. La biorremediación fue una herramienta de limpieza suplementaria en el vertido del Exxon Valdez, luego de eliminar el grueso del petróleo por medios mecánicos. *“A pesar de todas las imperfecciones, supuso un importante ahorro y una menor agresión al ya dañado ecosistema frente a cualquier otra técnica que se hubiera empleado para la remediación a largo plazo”*, expresó el ingeniero José Luis Rodríguez Gallego de la Universidad de Oviedo en su artículo *“La biorremediación frente al vertido del Exxon Valdez”*.

Una de las peores catástrofes ecológicas causadas por el hombre y los grandes intereses de las compañías petroleras multinacionales, está ocurriendo ante nuestros propios ojos en el Golfo de México, frente a las costas de Louisiana. Millones de barriles de petróleo, alrededor de 5 mil diarios (unos 800 mil litros) están siendo expulsados por un pozo en aguas profundas de la empresa British Petroleum (BP) desde el 22 de abril. Recuperado el Febrero 2012 [http://www.do.cstoc.com/docs/117426187/Exxon-Valdez-\(DOC\)](http://www.do.cstoc.com/docs/117426187/Exxon-Valdez-(DOC)).

En el año 2000 se registraron 23 derrames de petróleo en el mundo, aunque estos eventos se presenten en diversos lugares del planeta afectan a todos los países porque las corrientes marinas y vientos expanden esos contaminantes.

Para contrarrestar los daños que generan los derrames petroleros, en México desde hace varias décadas ya se cuenta con procesos naturales de biorremediación, métodos en los que se utilizan microorganismos como los hongos, plantas o sus enzimas que restauran a su condición original un ambiente contaminado. De hecho este método ya se aplicó en los suelos de la refinería 18 de marzo en Azcapotzalco, en el Distrito Federal con buenos resultados.

Al respecto, la doctora Georgina Sandoval, investigadora del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), dijo que la función de esos microorganismos es comerse los contaminantes y transformarlos en sustancias inocuas. Recuperado el 20 de Enero de 2013 de <http://www.ecoticias.com/residuos-reciclaje/28224>

En vísperas del Día Mundial del Medio Ambiente, investigadores de México y Estados Unidos le apuestan al empleo de estos procedimientos ecológicamente sostenibles a largo plazo con la finalidad de degradar hidrocarburos a través de bacterias, hongos o enzimas.

“Para poder reducir los hidrocarburos por procesos biológicos usamos fertilizantes como fuentes de nitrógeno, fósforo u otros micronutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos en aguas o suelos y sedimentos contaminados”, comenta la doctora Refugio Rodríguez Vázquez.

La académica del Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados explica que con estos procedimientos de biorremediación es

posible “acelerar” el proceso de biodegradación de contaminantes que naturalmente llevaría decenas de años.

Científicos del Instituto de Biología (IB) de la UNAM estudian los posibles usos de los ascomicetes, hongos microscópicos capaces de degradar compuestos de petróleo y también de algunos polímeros complejos, informó la investigadora María del Carmen González Villaseñor. Incluso, hay evidencia de que algunos pueden hacerlo con plásticos, lo cual es una gran promesa desde el punto de vista biotecnológico, añadió. En todo caso podrían servir como bioindicadores eficientes del estado y funcionamiento de los ecosistemas.

La experta señaló que su acción es lenta, pero con la ingeniería genética se podrían "construir" organismos que se reprodujesen más rápido y fuesen más eficientes en procesos de degradación.

Pese a su potencialidad, reveló, en México y el mundo los ascomicetes que desarrollan una función ecológica activa en el ambiente marino y de agua dulce son aún desconocidos. A escala internacional pocos investigadores los estudian, dado que se ignora su biología y existen problemas metodológicos, como la dificultad para detectarlos y extraerlos del ecosistema. En este contexto, el Instituto está a la vanguardia.

A escala global, dijo, se conocen alrededor de 80 mil especies de hongos de todos los ambientes, de las cuales en México sólo se encuentran descritas cerca de siete mil variedades. De ellas, 4 mil 800 corresponden a macromicetes y mil 910 a micromicetes; de éstas últimas 30 provienen de escenarios en el mar. Recuperado 20 de Enero de 2012 de <http://noticias.universia.net.mx/ciencia-nn-tt/noticia/2006/02/16/74721/estudian-unam-hongos-microscopicos-degradan-petroleo-plasticos.html>



Existen muchos compuestos orgánicos naturales que resisten la biodegradación en condiciones normales, como es el caso de la lignina, que es un constituyente principal de los árboles y que además es la segunda materia orgánica natural más abundante después de la celulosa. Esta poca capacidad de la lignina para biodegradarse, permite a los árboles caídos en el bosque permanecer por muchos años. Esto muestra que muchos compuestos orgánicos sintéticos son perjudiciales y resisten el paso del tiempo.

Esto lo ha estudiado el Centro de Biotecnología de la Universidad Mayor de San Simón (UMSS) y ha investigado un hongo del género *Pleorotus*, que es capaz de degradar la lignina de los materiales lignocelulósicos como es el caso de los desechos del palmito.

Según, Erick Ferrufino, Jefe de Investigación de dicho centro, este tipo de investigaciones puede dar la posibilidad de reducir la contaminación ambiental por desechos forestales o industriales.

Esto demuestra que también los hongos tienen capacidad de degradar y pueden aislarse de la misma manera que las bacterias, sólo que en este caso son las raíces las que se incuban.

Para su aplicación, puede ser plantado sobre los desechos o puede hacerse crecer el hongo en medios líquidos y luego ser rociados sobre la materia orgánica. El hongo estudiado por el centro de Biotecnología, crece en forma de filamentos que se introducen dentro de la materia vegetal y degradan parcialmente la lignina. Muchos de estos hongos con capacidades de degradación se encuentran en zonas como el Chapare, en espera de ser descubiertos, investigados y utilizados. Recuperado el 27 de Julio de 2014 de <http://www.biodiversityreporting.org/article.sub?docId=595&cRef=Bolivia&cRef=Bolivia&year=2003&date=December%202003>

La aplicación de los conocimientos de las vías de biodegradación puede proporcionar la más rentable tecnología para la remediación de lugares contaminados. Este tipo de tecnología puede también ser la más aceptable para el público: es un proceso natural que esencialmente toma ventaja de las habilidades naturales de la naturaleza. Los sistemas más efectivos y aceptable se esfuerzan por la conversión completa de los contaminantes a productos inorgánicos. Las vías bacterianas para la degradación de muchos componentes que se pensaban no biodegradables están actualmente bajo estudio. Parales R. E. (2002)

También es posible producir biosurfactantes a partir de microbios, es decir, dispersantes biodegradables que resultan menos dañinos para la flora y fauna marinas, por lo cual pueden aplicarse en menores proporciones que los de tipo sintético.

Dentro de los factores bióticos destacan principalmente la presencia o no de microorganismos con capacidad de degradar los compuestos de interés. Numerosos géneros de bacterias y hongos tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono orgánico. En el proceso de biorremediación de compuestos del petróleo, las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, son una de la de mayor relevancia. (Atlas y Bartha, 1993)

Según Baek, K-H et al. (2006) El uso de microbios para limpiar ambientes contaminados a través de la biorremediación in situ es particularmente atractivo tanto por razones ambientales como por razones económicas. Hay dos técnicas de biorremediación muy importantes entre las numerosas disponibles que se pueden utilizar para maximizar la eficiencia: la bioestimulación, donde se incrementa la actividad de las poblaciones microbianas autóctonas a través de la adición de nutrientes y /o un aceptor final de electrones y la Bioaumentación, donde la degradación potencial del contaminante se incrementa debido a la adición de cepas

microbianas degradadoras. Para el éxito de cualquier proceso de biorremediación, es importante clarificar el comportamiento de las poblaciones responsables de la degradación de los contaminantes.

## **BASES TEÓRICAS**

### **El petróleo (o aceite crudo)**

Es una mezcla de compuestos orgánicos e hidrocarburos primarios, proviene de formaciones rocosas subterráneas, generadas a lo largo de varios cientos de millones de años. Los estudios indican que se formó a partir de animales y plantas marinas microscópicas. Cuando estos organismos murieron en agua bajo contenido de oxígeno no se descompusieron. Su transformación en petróleo es un motivo actual de investigación. La teoría sostiene generalmente que las bacterias convirtieron las grasas de la vida marina en ácidos grasos. Por mecanismos desconocidos, los ácidos se transformaron en material asfáltico denominado kerógeno. A través de millones de años, el calor, la presión y agentes catalíticos presentes en las rocas, transformaron el kerógeno en petróleo y gas.

Los hidrocarburos presentes en el petróleo pueden clasificarse en:

### **Alcanos o parafinas**

Son compuestos saturados de fórmula general  $C_n H_{2n+2}$  tales como metano, etano, etc. Pueden ser cadena lineal o ramificada, como el butano (lineal) y el isobutano (ramificado). Las parafinas que tienen de 1 a 4 átomos de carbono son gaseosas, entre 5 y 15 son líquidas y las de más números de átomos de carbono son sólidas a presión atmosférica.

## **Naftenos o cicloparafinas**

Son compuestos saturados con ciclos de 5 o 6 átomos de carbono de fórmula general  $C_n H_{2n}$  tales como el ciclopentano, ciclohexano, etc... Pueden tener o no cadenas parafínicas laterales.

## **Aromáticos**

Son compuestos no saturados cíclicos con fórmula general  $C_n H_{2n-6}$  que pueden tener uno (como el benceno) o más núcleos. Pueden presentar cadenas laterales parafínicas como el caso del tolueno. La concentración de aromáticos en el petróleo es menor que la de parafina. El número de hidrocarburos individuales presentes en el petróleo es muy grande.

## **Propiedades del petróleo**

Existen numerosas propiedades que permiten caracterizar al petróleo y hacen posible su selección de un petróleo para determinada finalidad; dentro de estas propiedades podemos mencionar.

### **Propiedades físicas**

Densidad, viscosidad, tensión superficial e interfásial.

### **Propiedades ópticas**

Índice de refracción, actividad óptica.

### **Propiedades térmicas**

Licuefacción y solidificación, volatilidad, calor latente, calor específico, entalpía o contenido de calor.

### **Propiedades eléctricas**

Conductividad, factor de poder, constante dieléctrica.

### **Tecnologías de biorremediación**

La necesidad de recuperar sitios contaminados ha permitido el desarrollo de diferentes técnicas de remediación de tipo físico, químico y biológico. Los métodos biológicos se engloban en las tecnologías de biorremediación: las cuales son efectivas para la eliminación de hidrocarburos del suelo y acuíferos, son económicas y amigables con el ambiente (Loehr, 1992; Saval, 1998).

La biorremediación es un proceso natural o controlado, en el cual, la actividad biológica, especialmente la microbiana, acumula o transforma los contaminantes a niveles no tóxicos, minimizando el riesgo para las personas en el área. Los procesos de biorremediación se pueden aplicar bajo las condiciones naturales del sitio o estimulando la actividad biológica, a través de la adición de nutrientes, de aceptores de electrones, controlando la humedad u otro parámetro.

Los tratamientos de remediación en suelo, se pueden aplicar:

En el sitio (in situ) - Esta operación se realiza en el mismo sitio contaminado sin excavar ni disponer el suelo para su tratamiento; modificando de forma mínima la estructura del suelo. Requiere de periodos de tratamiento más largos y es menos

seguro debido a la heterogeneidad propia del suelo. Las tecnologías de biorremediación in situ, incluyen: bioventeo, bioaumentación, bioestimulación, fitorremediación y atenuación natural (Van Deuren et al., 1997).

Fuera del sitio (ex situ) - Operaciones que requieren que el suelo contaminado sea excavado y transportado a otro sitio, para ser sometido a un tratamiento de remediación. Generalmente requiere periodos más cortos de tratamiento, son más seguros en cuanto a uniformidad de tratamiento ya que el sistema puede homogeneizarse; sin embargo, requieren de excavación del suelo, lo que provoca un aumento en los costos para su tratamiento. Las tecnologías de biorremediación ex situ, en general incluyen: composteo (biopilas) y biorreactores (Van Deuren et al., 1997).

Entre las ventajas de las técnicas de biorremediación se encuentran: a) son tecnologías limpias, b) es un sistema biológico de bajo costo, c) se puede llevar a cabo en el mismo sitio, eliminando el costo de transporte, d) ocasiona trastornos mínimos al sitio, e) los contaminantes son eliminados (no transferidos) al formar bióxido de carbono y agua y e) son tecnologías que gozan de aceptación social y por las autoridades ambientales (Saval, 1997).

Entre las desventajas de las técnicas de biorremediación se encuentran; a) no tiene éxito en suelos de baja permeabilidad, b) la actividad de los microorganismos se pueden inhibir con altas concentraciones de contaminantes, c) algunos compuestos no pueden ser eliminados, y d) necesidad de monitoreo extensivo para cada sitio.

A continuación se describen las técnicas de remediación de tipo biológicas:

### **Atenuación natural**

Es la acción de los procesos naturales intrínsecos del suelo, sin la adición de elementos externos o la manipulación del sistema. Es una estrategia de remediación que debe ser supervisada y controlada mediante un seguimiento analítico y basada en un estudio de riesgo. Incluye los procesos físicos como la volatilización, dilución, adsorción y dispersión hidráulica que resulta de una reducción de la contaminación (IMP, 2004).

La atenuación natural como estrategia de remediación, es ideal, cuando ciertos factores son favorables: las condiciones geológicas, geoquímicas, factores físicos y químicos y presencia de microorganismos degradadores de contaminantes. Además, es necesaria la caracterización del sitio, la verificación de la toxicidad de intermediarios o productos, así como la migración de contaminantes antes de su degradación o transformación. Esto último permite - junto con el escenario del sitio obtener una evaluación del riesgo de salud y el ambiente (agua subterránea y suelo) para discernir si los procesos de atenuación natural son suficientes en la mitigación del riesgo o si se requieren tratamientos más activos.

### **Bioaumentación**

Consiste en la adición de microorganismos vivos, capaces de degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o biotransformación. Esta tecnología es utilizada cuando se desea reducir el tiempo de tratamiento de un sitio contaminado o cuando la microflora natural es insuficiente en número o capacidad para degradar los contaminantes involucrados. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de su dispersión y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Riser Roberts, 1998). Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, es necesario realizar cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o

utilizar el contaminante como fuente de carbono y reproducirlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Alexander, 1994).

### **Bioestimulación**

La bioestimulación implica la adición de elementos nutricionales al suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos, preferiblemente hasta su conversión a productos inocuos. Típicamente, implica la inyección de agua con nutrientes (Van Deuren et al., 1997). Se aplica en caso de suelos pobres en nutrientes como N y P. La bioestimulación puede acompañarse con el manejo de aceptores de electrones, el contenido de humedad y puede aplicarse junto con la bioaumentación.

### **Bioventeo**

Aplicación de aire a un suelo o cuerpo de agua para satisfacer los requerimientos de oxígeno de los microorganismos encargados de la biodegradación. El suministro de oxígeno, se lleva a cabo mediante la aireación del sitio contaminado a través de movimiento forzado (vacío o inyección) con bajas velocidades de flujo.

Una alternativa para llevar a cabo el bioventeo, es el uso de oxigenantes químicos, como el  $H_2O_2$ , que en su reacción libera oxígeno y agua. Una limitante en el uso del peróxido es su rápida descomposición a  $H_2O$  y  $O_2$ , incluso algunas sustancias del suelo pueden ayudar a su catálisis, como el hierro, el cobre y las enzimas catalasas.

Esto produce una rápida liberación del oxígeno que forma rápidamente burbujas debido a su baja solubilidad por lo que no se transporta eficientemente a los microorganismos (Leeson y Hinchee, 1997).



Recientemente se han utilizado oxigenantes de metales primarios como el peróxido de magnesio y de calcio, que presentan las siguientes ventajas: mayor estabilidad, menor solubilidad, precipitan y son de liberación prolongada (Cassidy e Irvine, 1999; Regenesis, 2002).

El proceso de biosorción de los metales pesados resulta complejo porque depende de diversos factores como son: la especie química del ión metálico en disolución, propiedades específicas de la superficie del microorganismo, la composición del medio de cultivo, la fisiología de la célula, la forma en que se trabaje la biomasa (viva o muerta, inmovilizada o libre), y de factores químico-físicos del medio como el pH, temperatura, concentración del metal y la presencia de otros iones metálicos, entre otros. Por lo tanto se requiere un estudio y optimización de las condiciones del proceso de biosorción. (Yusleydi Enamorado Horrutiner, 2011)

## **Los Hongos**

Los hongos constituyen un grupo de organismos heterogéneos carentes de clorofila, que presentan nutrición heterotrófica a diferencias de las plantas, que son autotróficas, sin embargo tradicionalmente se han estudiado dentro de la Botánica debido a su estrecha relación con el mundo de las plantas, además de tener algunas características similares como por ejemplo la reproducción por esporas y en general la falta de movimiento.

Este grupo de organismos actualmente se contempla como un grupo polifilético con al menos tres líneas evolutivas independientes. Dentro del esquema de los cinco reinos de Whittaker y Margulis, parte de estos se ubican en el Reino Protoctista (Hongos ameboides y acuáticos en general) y otros en el Reino Fungi, mientras que en el esquema de ocho reinos de Cavalier-Smith, parte se encuentran en

el Reino Protozoa (hongos ameboides), otros en el Reino Chromista (pseudohongos) y el resto en el Reino Fungi (Izco y col. 1997).

A pesar de esta variedad podemos estudiarlos agrupándolos en función a su alimentación como fagotróficos y lisotróficos.

Según (Aycachi R., 2008) Todos los ecosistemas acuáticos y marinos contienen algún tipo de microorganismos degradadores de petróleo, entre los generos reportados están:

**Hongos:**

- *Allescheria*
- *Aspergillus*
- *Aureobasidium*
- *Botrytis*
- *Candida*
- *Cephalosporiumcaldosporium*
- *Cunninghamella*
- *Debaromyces*
- *Fusarium*
- *Gonytrichum*
- *Hansenula*
- *Helmintrosporium*
- *Mucor*
- *Phialophora*
- *Penicilium*
- *Rodothorula*

- *Saccharomyces*

### ***Aspergillus***

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Kozakiewicz 1989)

### **Morfología**

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz 1989).

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Kozakiewicz 1989).

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones o grupos

como se indica en el cuadro Peterson (2000) eliminó las secciones Versicolores y Usti e incluyó a las especies en la sección Nidulantes, además transfirió una parte de la sección Wentii a la Cremei y la otra (Petromyces) a la Flavi en base a las relaciones filogenéticas surgidas de las secuencias de los fragmentos de ADN ribosomal.

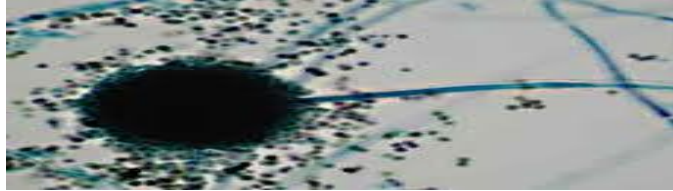
Los teleomorfos poseen meiosporos en ascos que pueden producirse en racimos desnudos o dentro de ascomas. Éstos tienen una pared formada por hifas sueltas, un plecténquima o un tejido estromático. Según Kozakiewicz (1989) la ornamentación superficial de las ascosporas que se observa con el microscopio electrónico de barrido, es una de las características más fidedignas para la identificación de las especies. Con excepción de *A. fischerianus* (sección Fumigati) y especies de las secciones Aspergilli y Nidulantes que tienen respectivamente, teleomorfos en los géneros *Neosartorya*, *Eurotium* y *Emericella*, no se observan formas perfectas en las condiciones habituales de trabajo (Klich & Pitt 1992).

### **Ambiente**

La ubicuidad de los aspergilos es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre substratos con diverso contenido de humedad. La colonización de los granos durante el almacenamiento, por *Aspergillus* y otros mohos, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intergranular se eleva por sobre el 70%, sin que se desencadene aún el fenómeno de brotación (Eguiazú 1984).

El rango de temperatura para el crecimiento va desde 0-5°C para *A. glaucus* hasta 50-55°C para *A. fumigatus*, estando el óptimo entre 30-33°C para la mayoría de las especies. Si unos granos con un contenido de humedad del 15% no fueron afectados por los aspergilos durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 5-10°C (Kozakiewicz 1989).

## *Aspergillus niger*



**Figura 1.** *Aspergillus niger*

**Reino:** *fungi*

**Phylum:** *Ascomicota*

**Clase:** *Eurotiomycetes*

**Orden:** *Eurotiales*

**Familia:** *Trichocomaceae*

**Género:** *Aspergillus*

**Especie:** *niger*

### **Distribución geográfica en el mundo**

Esta especie tiene una amplia distribución mundial, su ocurrencia ha sido documentada desde la región ártica hasta el trópico. A diferencia de otras especies, los reportes de *A. niger* en el trópico no superan el 50% del total reportado, sin embargo se reconoce que es más común en regiones cálidas.

### **Registros Biológicos**

**Cepas ATCC® número** 1027- 10549 -10553 – 10578 - 10579 -10594 -10864  
– 11394-11414 -12845 – 13496 – 13497 – 13794 -14331 - 14333 -14335 -15475 -  
16508 -16513

## **Historia natural**

Es considerado un microorganismo saprobio común del suelo. Sin embargo en su interacción con el hombre y animales, este hongo se reconoce como patógeno asociado a infecciones del oído medio y externo, también se ha asociado a enfermedades pulmonares y renales. Como fitopatógeno se ha asociado a lesiones en la raíz de cacahuets y síntomas en sorgo, cebolla y ajo. Algunas cepas, que provienen de suelos ácidos, presentan actividad solubilizadora de fosfato de calcio en medio de cultivo. Useche (2003).

## **Hábitat**

Considerando su distribución con respecto al clima, la vegetación y el suelo, se presenta la siguiente lista representativa de los hábitat en los que se ha reportado: Suelos glaciares en Alaska, pastizales, suelos secos con vegetación de estepa, bosques de coníferas, suelo de trufas, suelos desérticos, dunas de arena, salinas, estuarios, manglares, otros ambientes acuáticos marinos y de agua dulce, aguas contaminadas y lechos de ríos. De acuerdo con numerosos reportes, esta especie se distribuye en suelos con pH entre 4 a 8 y su abundancia relativa aumenta luego de las actividades de labranza y fertilización del suelo, tolera altas concentraciones de herbicidas (35 mg/g de Dalapon y 2,4 D) Se encuentran también sobre una variedad de sustratos incluyendo: granos, forraje, frutos, vegetales, semillas y en la rizósfera de una gran variedad de plantas como banano, trigo, arroz, algodón, café, caña de azúcar, cebada, avena, maíz y guisantes entre otros.

## **Taxonomía**

Hifas bien desarrolladas, profusamente ramificadas, hialinas y septadas. Como regla general las células son multinucleadas. El micelio joven produce conidióforos

en abundancia que surgen solitarios a partir de las hifas somáticas. Los conidióforos hialinos o pigmentados, son largos, erectos, cada uno terminando en una cabeza bulbosa llamada vesícula. Las vesículas son subesféricas, con 20-100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Un gran número de células conidiogénicas se producen en la superficie de la vesícula multinucleada a medida que esta se desarrolla, por lo que se observan como cabezas conidiales radiadas. Metula presente y su tamaño es dos veces el tamaño de las fiálides. Las células conidiogénicas, sean primarias o secundarias, son típicas fiálides. A medida que las fiálides alcanzan la madurez, comienzan a producir conidios, uno tras otro, en cadenas. Los conidios son globosos, ornamentados, de color marrón, con paredes rugosas y con 3,5-5,0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conidios se forman en el extremo de las fiálides tubulares. Como los conidióforos y los conidios se producen abundantemente, su color es predominante en la pigmentación de la colonia, apareciendo negras o marrón.

#### **Uso y tráfico**

Este hongo es empleado en varios procesos industriales por la variedad de enzimas que produce. Los ácidos cítrico y glucónico son obtenidos comercialmente por el uso de este microorganismo. Así mismo se producen preparaciones enzimáticas y algunos antibióticos.

Useche (2003) reportó su capacidad solubilizadora de fosfatos de calcio en medio de cultivo en los aislamientos provenientes de suelos ácidos del Sur del Trapecio Amazónico por lo que tendría un uso potencial como bioinsumo para la elaboración de biofertilizantes.

La cepa de referencia ATCC® número 10579™ produce inulinasa (endoinulinasa) La cepa de referencia ATCC® número 10864™ produce grandes cantidades de maltasa y pequeñas cantidades de alfa-amilasa. También produce etanol a partir de

almidón de papa cuando se cocultiva con *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603 y degrada almidón de papa no hidrolizada. Produce acetil-xylanesterasa, acetilesterasa, alfa-glucosidasa (maltasa), amilasa alfa 1A; glucoamilasa, monoamino oxidasa y enzimas sacarificantes.

La cepa de referencia ATCC numero 11414 produce acido cítrico, 6-fosfofructo-2-kinasa, ATP citrato liasa, carnitinaacetil-transferasa y poligalacturonasa. La cepa de referencia ATCC® número 12845™ produce ácido cítrico y degrada melazas. Las cepas de referencia ATCC® número 13496™ y 13497™ producen glucoamilasa.

www.bdigital.ula.ve



## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLOGICO**

Para el desarrollo de este trabajo se realizó, en principio, una revisión documental de materiales bibliográficos, hemerográficos y páginas Web, relacionadas con temas de petróleo, microbiología, micología, biología. La información recabada permitió orientar el proceso investigativo, aunque se encontraron estudios sobre *Aspergillus*, no se encontró directamente en muestras ambientales, sino que se aislaron y fueron usadas para probar su capacidad enzimática y de crecimiento. Según Hernández R. (1994).

La finalidad de esta investigación fue lograr conocimientos acerca de cómo aislar hongos y microorganismos en general de muestras de petróleo del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

#### **Tipo de Investigación**

Esta investigación fue de carácter experimental según (Rodríguez ,2005) este tipo de investigación prospectiva se presenta mediante la manipulación de una variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o porque causa se produce una situación o acontecimiento particular.

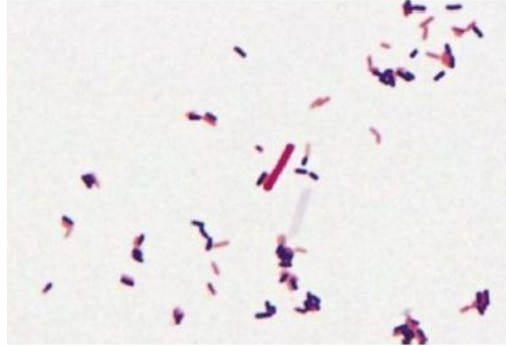
## PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

### **Materiales**

- Guantes
- Bata
- Tapaboca
- Frascos de plástico y de vidrio
- Frascos de ámbar
- Pipetas automáticas
- Placas de Petri
- Puntillas
- Espátula
- Pinzas
- Tirro
- Marcadores
- Cámara fotográfica
- Balanzas normales y analíticas
- Papel
- Autoclave
- Asa en aro y en punta
- Cuarto oscuro equipado
- Lupa
- Microscopio
- Cilindros
- Cámara fotográfica

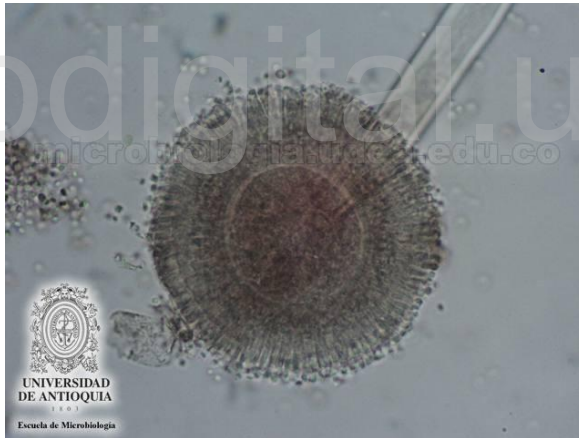
### **Pruebas morfológicas:**

- **Coloración de Gram (ver ejemplo).**



**Figura 2.** Bacterias gram positivas y gram negativas. Murray, 2013 p. 217

- **Coloración Azul de Lactofenol.**



**Figura 3.** Aspergillus coloreado con azul de Lactofenol .Tomado de <http://aprende enlinea.udea.edu.co/>

### **Medios de Cultivo.**

- Agar Bennett.
- Agar Haff con Petróleo.

- Agar Sabouraud Dextrosa.
- Agar tripticasa de soya.

## **Pruebas Morfológicas**

### **Coloración o Tinción de Gram.**

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico y con el que el estudiante debe estar perfectamente familiarizado. Su utilidad práctica es indiscutible y en el trabajo microscópico de rutina del Laboratorio de Microbiología las referencias a la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, positivos, negativos, etc.) se basan justamente en la tinción de GRAM.

Descrita en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente:

1. el Frotis fijado con calor se tiñe 1 min con Violeta Cristal,
2. se lava con agua,
3. se cubre con solución Yodada durante 1 min
4. y se lava de nuevo con agua,
5. decolorar con mezcla alcohol etílico/acetona.
6. Escurrir y cubrir con Safranina (color de contraste) durante 20 seg. Lavar y secar.

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas (en este caso, los términos positivo y negativo no tiene nada que ver con carga eléctrico, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias).

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula

bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano.

Debido a su importancia en taxonomía bacteriana y a que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias, describiremos aquí con algún detalle la tinción de Gram y las interpretaciones que actualmente se hacen sobre el porqué de su funcionamiento.

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta (otros colorantes básicos no son tan efectivos) y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las grampositivas como las gramnegativas, están teñidas de azul.

El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el  $I_2$ ; el KI simplemente hace soluble el  $I_2$  en agua. El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo  $I_2$ -cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran, mientras que otros (gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias

gram-negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células grampositivas son todavía azules, pero las gramnegativas son incoloras.

Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células gramnegativas son rojas, mientras que las grampositivas permanecen azules.

Deben destacarse algunos aspectos cruciales de la tinción de Gram:

- 1) El tratamiento con cristal violeta debe preceder al tratamiento con yodo. El yodo por sí solo tiene poca afinidad con las células.
- 2) La decoloración debe realizarse con poca agua para evitar que pierdan la tinción las células grampositivas. El proceso de decoloración debe ser corto y es esencial un cálculo preciso del tiempo para obtener resultados satisfactorios.
- 3) Cultivos más viejos de 24 horas pueden perder su habilidad de retener el complejo cristal violeta - yodo.

El carácter de grampositivo no es siempre un fenómeno del todo o nada. Algunos organismos son más grampositivos que otros y algunos son gram-variables, es decir, unas veces grampositivos y otras gramnegativos. Recuperado el 12 de Noviembre de 2014 de [http://www .microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm](http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm)

## **Coloración con Azul de Lactofenol.**

### **Técnica**

1. Partiendo de una colonia de hongos de un cultivo puro y utilizando un asa de micología, transferir una pequeña cantidad de micelio (cortar un cuadrado de agar Malta) a un portaobjetos, procurando no dañar las estructuras del hongo.
2. Añadir una gota de azul de Lactofenol.
3. Colocar un cubre y absorber con papel de filtro el exceso.
4. Observar al microscopio con objetivo de inmersión.
5. Resultados. El azul Lactofenol actúa como líquido de soporte, agente fijador y tiñe el micelio y las esporas de color azul.

### **Fundamento del método**

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes.

### **Medios de Cultivos microbiológicos**

- Agar Bennett.
- Agar Haff con Petróleo.
- Agar Sabouraud Dextrosa.
- Agar Tripticasa de soya.
- Agar Caseína-Peptona-Lecitina.

### **Agar Bennett.**

Todas las cepas fueron subcultivadas en agar Bennett (ácido casamino 2 g/L, extracto de levadura 1 g/L, extracto de carne 1 g/L, glucosa 10 g/L y agar 15 g/L) Uzcátegui et al. (2009).

### **Agar Sabouraud Dextrosa**

#### **Fórmula**

Dextrosa 40.0  
Peptona de Caseína 5.0  
Digerido Pancreático de Tejido Animal 5.0  
Agar Bacteriológico 15.0  
pH  $5.6 \pm 0.2$

#### **Método**

Suspender 65 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles. Recuperado 5 de Agosto de 2014 <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20DEXTROSA%20SABORAUD.pdf>

### **Agar Tripticasa de soya**

Formula aproximada por litro de agua purificada

- Digerido pancreático de caseína.....14,5g
- Digerido papaico de harina de soja....5,0 g
- Cloruro sódico.....5,0 g



- Agar .....14,0g
- Factores de crecimiento.....1,5 g

Emplear técnicas asépticas. Para preparar el medio en placa, colocar los tubos de agares con las tapas flojas en baño María en ebullición hasta que el medio se haga líquido (transparente.) dejar enfriar a 45-50 °C, añadir sangre si se desea y verter en placas de Petri estériles. Dejar que el medio se solidifique y se seque antes de usar. La superficie del agar debe ser lisa y húmeda pero sin humedad en exceso.

Inocular el medio tan pronto como sea posible después de recibirlo en el laboratorio. Recuperado el 18 de Febrero de 2015 de <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808511%280703%29ES.pdf>

### **DISEÑO DE ANALISIS**

El trabajo de tesis se comenzó con las muestras de petróleo biocompatibles de la Sección Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, cada muestra con proporciones distintas de tween 80, etanol y petróleo.

De los tubos dispuestos en el laboratorio se tomó el material con un asa en aro. Luego de allí se procedió al cultivo microbiológico en distintos medios Bennett, agar Tripticasa de Soya, Sabouraud Dextrosa para así obtener cultivos puros y observar en que medios habían mayor crecimiento. Cada placa cultivada fue seriada para llevar un control, a una temperatura de 37 grados centígrados.

Hubo crecimientos morfológicamente compatibles con un hongo. Se realizó coloración azul de Lactofenol para observar las características microscópicas de los cultivos.

Se utilizó la técnica de agotamiento que según Negroni, Marta (2009). Se trata de un método rápido y simple de agotamiento progresivo y continuo del inóculo (material microbiano de partida utilizado para sembrar un medio de cultivo) sobre un medio sólido contenido en una capsula de Petri. A medida que se realizan estrías las bacterias pasan del asa al medio en un número cada vez menor, de manera que las estrías iniciales proporcionan un crecimiento confluyente, mientras que a lo largo de las últimas estrías se desarrollan colonias bien aisladas.

Se inocularon tres placas por el método anteriormente descrito. Hubo crecimientos morfológicamente compatibles con un hongo. Se realizó coloraciones con azul de Lactofenol para observar las características microscópicas de los cultivos.

Se consideró primordial realizar la replicación de las cepas de los hongos que crecieron en las placas Petri con medio Haff petróleo para así comprobar que fueran parte de las muestras y no producto de contaminación del laboratorio.

Luego de esto se tomaron inóculos los cuales fueron sembrados en tubos de ensayo con agar Sabouraud Dextrosa y medio Haff con aceite biocompatible.

Después de determinar por las características macroscópicas y microscópicas que se trataba de un hongo del género *Aspergillus* se procedió a plasmar los resultados obtenidos.

### **Análisis de los Datos**

Los resultados se analizaron a través de un análisis cualitativo y cuantitativo de las variables

Los resultados fueron presentados en tablas y también mediante la descripción de las características microscópicas y macroscópicas de los cultivos fúngicos.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

**Tabla 1** .Muestras de petróleo

Secuencias		
S1	S2	S3
Secuencia 1 (LL3561)	1:0,1:1:1 (LL3561)	1:1:0,1:1 (LL3561)
Secuencia 2 (LL3561)	1:0,5:1:1 (LL3561)	1:1:0,5:1 (LL3561)
Secuencia 3 (LL3561)	1:1:1:1 (LL3561)	1:1:1:1 (LL3561)
Secuencia 4 (LL3561)	1:2:1:1 (LL3561)	1:1:2:1 (LL3561)

**Fuente:** Ramos (2011)

En el cuadro anterior podemos identificar las muestras utilizadas, las cuales fueron clasificadas en secuencias.

**Tabla 2.** Crecimiento de cepas en distintos medios

Cepas	Tiempo	P1 Haff	Medio	P2 Medio Haff	P3 Medio Haff	Observaciones
S1/2	24 Horas	Es		Es	Es	*
	48 Horas	Es		Es	Es	
	96 Horas	Mo		Es	Es	

<b>S1/3</b>	<b>24 Horas</b>	-	-	-	*
	<b>48 Horas</b>	<b>Es</b>	<b>Es</b>	<b>Es</b>	
	<b>96 Horas</b>	<b>Es</b>	<b>Es</b>	<b>Es</b>	
<b>S1/4</b>	24 Horas	-	-	-	*
	48 Horas	Es	Es	Es	
	96 Horas	Es	Es	Es	
<b>S2/1</b>	24 Horas	-	-	-	*
	48 Horas	-	-	-	
	96 Horas	Es	Es	Es	
<b>S3/2</b>	24 Horas	Mo	Mo	Ab	<b>DE ESTA CEPA SE DESARROLLO UN HONGO QUE CRECE EN MEDIO DE PETRÓLEO Y SE MANTIENE, ES DECIR UTILIZA EL MEDIO PARA SU CRECIMIENTO</b>
	48 Horas	Mo	Ab	Ab	
	96 Horas	Ab	Ab	Ab	

**Fuente:** Ramos (2011). Ab: Abundante, Mo: Moderado, Es: Escaso, (-): no hubo crecimiento, P1: Placa 1, P2: Placa 2, P3: Placa 3.

De las placas (P1, P2 y P3) las cuales fueron sembradas una a partir de la otra por método de agotamiento se obtuvieron los resultados presentados a continuación:



**Figura 4.** Placas y tubos de ensayo

#### **AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE HONGO**

Se procedió al aislamiento de los hongos a partir de los cultivos previamente obtenidos en placas de Petri y tubos de ensayo, los cuales estaban mezclados con crecimientos bacterianos. Cada medio fue inoculado a 37 °C y observado cada 24 horas.

En los medios Agar Tripticasa Soya, Agar Bennett, Agar Dextrosa Sabouraud, se observó un crecimiento abundante.



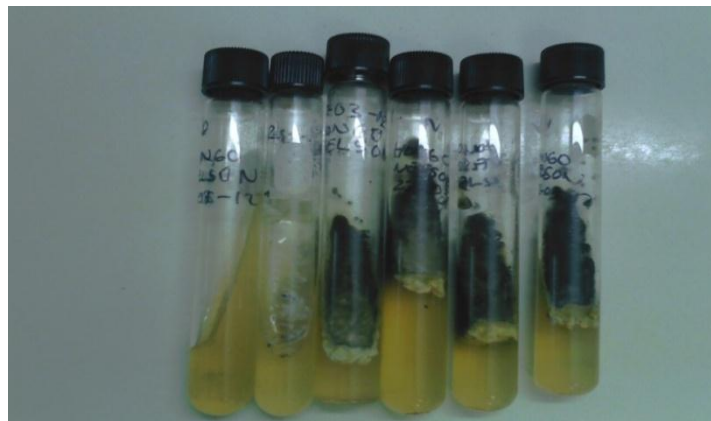
**Figura 5.** Agar Bennett

**Tabla 3.** Crecimiento Bacteriano a partir de distintos medios

MEDIO	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
ATS	++	+++	+++	++++
AB	++	+++	+++	++++
ADS	++	+++	+++	++++

ATS: Agar Tripticasa Soya, AB: Agar Bennett, ADS: Agar Dextrosa Sabouraud.

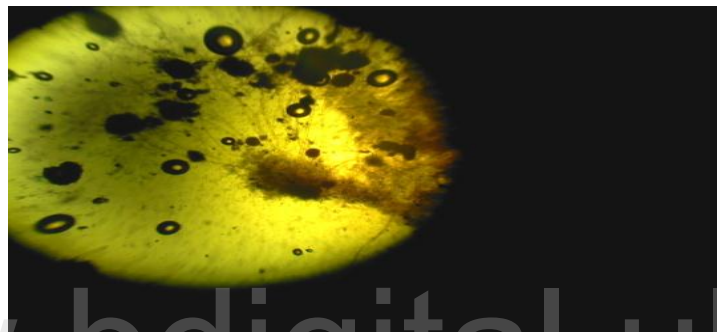
Se observaron las características macroscópicas. Se observó un hongo de color negro de crecimiento abundante, hifas septadas y la colonia tiene aspecto granuloso. Se realizó tinción de Gram y Azul de Lactofenol, para observar sus características microscópicas. Luego se contaron cien conidias, 100 esporangio y 100 hifas y se midieron para sacar un promedio. (Cuadro 2).



**Figura 6.** Hongo en cuñas de Agar Tripticasa Soya

**Tabla 4.** Promedio de estructuras microscópicas del Hongo

Conidias	Hifas	Conidióforos
2,6 micras	3mm	105.5 micras



**Imagen 7.** Fotografía de *Aspergillus* con Azul de Lactofenol tomada en el laboratorio 40x.

Después de purificar el hongo se procedió a inocular el medio Haff con petróleo para determinar si era realmente capaz de crecer en un medio cuya única fuente de carbono y energía, fuera el petróleo. Por el método de agotamiento se pudo demostrar que el hongo es capaz de usar petróleo como fuente de carbono.

Se sembraron 3 placas con medio Haff petróleo. De la placa uno (P1) se tomó una asada para inocular la placa dos (2), luego de registrar crecimiento se procedió a tomar material e inocular la placa tres (3). Observando y reportando el crecimiento cada 24 horas e incubado en la estufa a 37 °C.



**Cuadro 5.** Crecimiento en Medio Haff con petróleo por “agotamiento metabólico”.

Placa	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
<b>1</b>	+	++	+++	++++	+++++
<b>2</b>	+	++	+++	++++	+++++
<b>3</b>	+	++	+++	++++	+++++

Se utilizó un medio Haff con aceite biocompatible, en este medio también se sembró el hongo en placa y tubo por método de agotamiento observando crecimiento abundante. El crecimiento se observó y reportó al igual que los demás cultivos cada 24 horas y a 37 °C. Obteniendo un crecimiento abundante indicativo de la capacidad de la cepa de usar el aceite biocompatible para su crecimiento.



**Figura 8.** *Aspergillus niger* Sembrado en cuña de Haff petróleo con aceite biocompatible

**Tabla 6.** Crecimiento en medio Haff con aceite biocompatible por “agotamiento metabólico”.

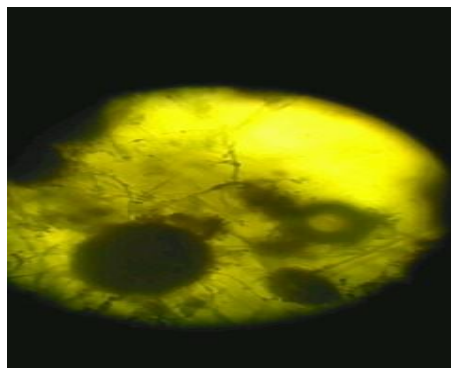
Placa	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
<b>1</b>	+	++	+++	++++	+++++
<b>2</b>	+	++	+++	++++	+++++
<b>3</b>	+	++	+++	++++	+++++



**Figura 9.** Placas, tubos y medios antes de esterilizar en Autoclave.



**Figura 10.** Autoclave



**Figura 11.** *Aspergillus niger* 40X

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los microorganismos que pueden resistir condiciones de extremo pH, presión, calor, salinidad, xenobióticos, etc., son denominados extremotolerantes. Es por esta razón que el hongo aislado en esta investigación lo podemos denominar de ese modo.

Se logró aislar un hongo de las muestras de petróleo pertenecientes al Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Para determinar que especie de hongo era se realizaron pruebas morfológicas que permitieron su caracterización y posterior identificación.

El hongo aislado y caracterizado fue un *Aspergillus niger* capaz de crecer en medios que tiene como fuente de carbono el petróleo y sus derivados (Medio Haff con petróleo y Medio Haff con aceite biocompatible)

Con lo antes expuesto se logró dar respuestas a las preguntas formuladas en la investigación.

## RECOMENDACIONES

### Se sugiere:

Seguir el estudio del hongo aislado y caracterizado en el Laboratorio de Biotecnología.

Buscar otras aplicaciones en el campo de la biotecnología del petróleo.

Promover el estudio microbiológico del petróleo entre los estudiantes de la facultad.

Dar a conocer las ventajas del uso de microorganismos en la biotecnología.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## BIBLIOHEMEROGRAFIA

*Aislamiento de hongos filamentosos con potencial de degradar petróleo.* Recuperado el 22 de octubre de 2014 de <http://www.cienciaperu.org/component/content/article/50-ciencias-ambientales-/130-aislamiento-de-hongos-filamentosos-con-potencial-de-degradar-petroleo.html>

Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, New York. 869p.

Atlas, R. (1986). *Biodegradation of hydrocarbons in the environment*. In: G.S. Omen (ed.). *Environmental biotechnology, reducing risks from environmental chemicals through biotechnology*. Plenum Press, Nueva York.

Aycachi, Romulo y Carreño, Carmen. (2008). *Biodegradación de Petróleo Diesel*. España.

*Azul de Lactofenol.* Recuperado el 15 de Noviembre de 2014 de: <http://www.labsar.com/archivos/fichastecnicas/AZUL%20DE%20LACTOFENOL.pdf>

Baldrian, P. Wiesche, C. Jiri, G. Nerud, F. and Zadrazil, F. (2000). *Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Pleurotus ostreatus in soil. Applied and Environmental Microbiology*. Vol.66, No. 6.)

*Biocatalysis/biodegradation data base.* Recuperado el 01 de Noviembre 2012 de [http://umbbd.msi.umn.edu/pha2/pha2\\_map.html](http://umbbd.msi.umn.edu/pha2/pha2_map.html)

*Biorremediación: 10 métodos de recuperación ecológica.* Recuperado el 18 de Octubre de 2014 de <http://faircompanies.com/news/view/biorremediacion-10-metodos-recuperacion-ecologica/>

Boldu, F., Vervoort, J., Grontehuis, J. & Van Groenestijn, J. (2002). *Sunstrate interactions during the biodegradation of Benzene, Toluene Ethylbenzene and Xylene (BTEX) Hidrocarbons by the fungus Cladophialophora sp. strains T1. Applied and Enviromental Microbiology* 68: 2660-2665

Borgna Armando, Di Cosimio Juana y Fígoli Nora. (2001). *Petróleo y gas natural. Reservas procesamientos y usos*. Santa Fe, Argentina.

Cameron M.D., Timofeevski S. and Aust S.D. (2000). *Enzymology of Phanerochaete Chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. Applied Microbiology and Biotechnology*. 54:751-758

Cerniglia, (1997). *The Biodegradative strain data base*. Recuperado el 20 de Febrero de 2015 de <http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>

Davis, J. (1967). *Petroleum microbiology*. Ed. Elsevier, Inglaterra.

Elshafie, A. Yahya A. A., Al Busaidi, Bakheit C. & Albahry S. N. (2007). *Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman Marine Pollution Bulletin* 54:1692-1696

Enamorado, Yusleydi, Villanueva, Margarita et Al (2011). *Caracterización de la biomasa inactiva de Aspergillus niger O-5 como sorbente de Pb (II)*. La Habana, Cuba.

*Estudian en la UNAM hongos microscópicos que degradan petróleo y plásticos*. Recuperado el 16 de Octubre de 2014 de <http://noticias.universia.net.mx/ciencia-nn-tt/noticia/2006/02/16/74721/estudian-unam-hongos-microscopicos-degradan-petroleo-plasticos.html>

*Estudiantes descubren un hongo que degrada plástico.* Recuperado el 9 de Agosto de 2013 de [http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2011/08/110809\\_hongo\\_plastico\\_am.shtml](http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2011/08/110809_hongo_plastico_am.shtml)

Ewis, J., Ergas, S., Chag, D., Schoroeder, E. (1999). *Principios de Biorrecuperacion. MacGraw-Hill, España. 1a Edición en español, l.327.*

Ihsan Flayyih Hasan (2014). *Ability of Some Soil Fungi in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon and Biodegradation of Kerosene by Aspergillus niger and Rhizopus stolinifer.*

Field, J., Jong, E., Costa, G., Bont, M. (1992). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 58. No. 7.

Grifoll, M., A. M. Solanas & J. M. Bayona (1992). *Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of the Besos and Llobregat rivers (Barcelona, Spain), Arch. Env. Cont. Toxicol.* 23:19-25.

Hernández, R. (1994). *Coefficiente de Proporción de Rangos (CPR): Una alternativa para determinar la validez de contenido de instrumentos de medición. Ponencia presentada en la XLIV Convención anual de ASOVAV: Coro.*

Horrutiner, Y. (2011). *Caracterización de la biomasa inactiva de Aspergillus niger O-5 como sorbente de Pb(II).*

Klich MA, Pitt JI. (1992). *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs.* CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.

Kozakiewicz Z. (1989). *Aspergillus species on stored products*. CAB international Mycological Institute, Kew, Surrey.

*La Biorremediación frente al vertido del Exxon Valdez*. Recuperado el 18 de Octubre, 2012 de [http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/biorremediacionexxon\\_valdes.pdf](http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/biorremediacionexxon_valdes.pdf)

Loehr, R. (1992). *Bioremediation of PAH compounds in contaminated soil. Hydrocarbon Contaminated soils and ground water*. Vol. 2. P. T. Kostecki (Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.

*Los Hongos de los Alimentos y Forrajes*. Recuperado de: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/04htextoaspergilos.pdf>

M. Vanishree et al. (2013). *Biodegradation of Petrol Using Aspergillus sp.*

Martín, C., (2004) *Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación*. Madrid-España.

*Medio BBL preparado en un tubo de uso general Trypticase Soy Agar, Modified (TSA II) Deeps*. Recuperado el 18 de Febrero de 2015 de: <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808511%280703%29ES.pdf>

Mittal, A. and Singh, P. (2009). *Studies on biodegradation of crude oil by Aspergillus niger*.

Murray, P., Rosenthal, K y Pfaller, M., (2013). *Microbiología Médica*. 7ma edición. Editorial Elsevier Saunders. Barcelona, España.



Negroni, Marta. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: medica panamericana. 2da edición.

Prince, R. (1993). *Petroleum spill bioremediation in marine environments*. Crit. Rev. Microbiol. 19, 217-242.

Rodriguez, E. (2005). *Metodología de la investigación*. México.

Riser-Roberts, E., (1998). *Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes*, Lewis Publishers, BocaRaton, FL

*Sabouraud Dextrosa*. Recuperado 5 de Agosto de 2014 <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20DEXTOSA%20SABORAUD.pdf>

Sack U., Heinze T.M., Deck J., Cerniglia C.E., Martens R., Zadrazil F. & Fritsche W. (1997). *Comparison of phenantrene and pyrene degradation by different Wood decaying fungi*. *Applied and Environmental Microbiology*.

Saval S. (1998). *Biorremediación: Alternativas para la limpieza de suelos y acuíferos de suelos contaminados con hidrocarburos*. *Ingeniería y Ciencias Ambientales* No.34.

Solanas, A. (1981). *Contaminación y biodegradación de hidrocarburos en las aguas superficiales del barcelonés*. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. Departament de Microbiologia. Barcelona

Steffen, K. Hatakka, A. Hofrichter, M. (2003). *Degradation of benzo (a) pyrene by the litter-decomposing basidiomycete Stropharia coronilla: role of Manganese peroxidase*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 49, No. 7

Sutherland J.R., Selby A.L., Freeman J.P., Evans F.E. y Cerniglia, C. (1991). *Metabolism of phenantrene by Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology.

*Técnicas de tinción. Fundamentos*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2014 de: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>

*Tinción de Gram*. Recuperado 29 de Octubre de 2014 de <http://galeon.com/lactobacilo/micro.htm>

*Tools and resources to assist in contaminated site remediation*. Recuperado 29 de Octubre de 2012 de <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>

Torres Duilio, Facultad de Agronomía, postgrado Ciencia del Suelo, Universidad Central de Venezuela. 2101 Maracay (Aragua), Venezuela.

Useche Y., Peña C., Cardona Vanegas G. 2003. *Aspergillus Níger Tiegh (1867)*. *Catálogo de la Biodiversidad de Colombia*.

Uzcategui M., Serrano J., Boiron P., Rodriguez V., Couble A., Moniee D., Sánchez K., Sandoval H., Reviakina V., Panizo M., Mendoza M. (2009). *Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo*.

Van Deuren, J., Wang, Z. y Ledbetter, J. (1997). *Remediation technologies screening matrix and reference guide*. 3a Ed. Technology in novation office, EPA.

Whise, D. L. 2000. *Bioremediation of contaminated soils*. Marcel Decker. New York.

WickL., N. Pasche, S. Bernasconi, O. Pelz & H. Harms. (2003). Characterization of multiple-substrate utilization by an thracene-degrading Mycobacterium Frederiksbergense LBSOIT. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6133-6142.

Zhongming, Z. Obbard, P. (2002). *Polycyclic Aromatic Removal From soil by surfactant solubilization and Phanerochaete Chrysosporium oxidation.* *Journal.Environmental Quality.* 31: 1842-1847

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)