

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICA  
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA



**MICORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON ACEITE SUCIO DE MOTOR Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Chenopodium quinoa wild***

Tesis para obtener el título de licenciado en Bioquímica

Catacora Angulo Lilia Danitza

LA PAZ-BOLIVIA

2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICA  
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA



**MICORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON ACEITE SUCIO DE MOTOR Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Chenopodium quinoa wild***

**Tesis para obtener el título de licenciado en Bioquímica:**

Catacora Angulo Lilia Danitza

**TUTOR:**

María Teresa Álvarez Aliaga PhD.

LA PAZ-BOLIVIA

2019

## **Dedicatoria**

A mi familia, mentores y amigos,

"Cuando crezcas, descubrirás que ya defendiste mentiras, te engañaste a ti mismo o sufriste por tonterías. Si eres un buen guerrero, no te culparás por ello, pero tampoco dejarás que tus errores se repitan."

Pablo Neruda

## **Agradecimiento**

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, en especial al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas que me brindó el espacio para desarrollar la experimentación que dio lugar al presente trabajo de Tesis y contribuir en mi formación académica.

A quienes primero quiero manifestar mi más sincera admiración y reconocimiento es a mis padres Celestino Catacora y Pacesa Angulo, por su paciencia y gran apoyo incondicional. A mi hermano David Catacora por creer en mí.

Desde el primer momento en que se comenzó a gestar esta Tesis muchas han sido las personas que se han involucrado conmigo para hacerla realidad, y a quienes deseo expresar mi gratitud por el apoyo y la cooperación que me han prestado de forma desinteresada.

Aprendí que educar a una persona no es hacerle aprender algo que no sabía sino hacer de él alguien que no existía, por esto, quiero agradecer a mi Tutora de Tesis, María Teresa Álvarez Aliaga PhD. por mostrarme los caminos de la ciencia, por su guía y ejemplo de dedicación profesional, además por su actitud siempre afectuosa.

Las grandes obras no son llevadas a cabo por la fuerza sino por la perseverancia, gran lección enseñada por la M.Sc. Marisel Mamani Mamani a quien le agradezco por haberme permitido trabajar con su equipo humano de investigación, su disposición a enseñarme, por la paciencia en el trabajo experimental y su compromiso con la formación de profesionales de excelencia.

En este viaje no estuve sola por ello quiero agradecer a mis amigos Pamela L., April V., Ana A., Mabel C., Lidia M., Marisol V., Yessica S. Ariel D. y Valeria S. gracias por brillar con luz propia y hacer más bello el camino estando a su lado.

## Tabla de contenido

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. OBJETIVOS .....	20
3.1 Objetivo General .....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4. DISEÑO TEÓRICO.....	20
4.1. MARCO REFERENCIAL.....	20
4.2. MARCO TEÓRICO.....	23
4.2.1. Derivados del petróleo .....	23
4.2.2. Aceite de motor .....	24
4.2.2.1. Composición del aceite de motor .....	25
4.2.2.2. Origen, toxicidad y problemática medioambiental de los hidrocarburos aromáticos policíclicos generado por el Aceite sucio de motor .....	26
4.2.3. Remediación de suelos y sedimentos contaminados con derivados de petróleo.....	28
4.2.3.1 Atenuación natural .....	29
4.2.3.2.1. Degradacion de PAH por hongos.....	29
4.2.3.2.2. Micorremediación .....	30
a. Hongos no ligninolíticos.....	31
b. Hongos ligninolíticos .....	32
c. Sistema enzimático implicado en la degradación de la lignina. ....	33
d. Enzimas oxidorreductasas .....	34
e. Enzimas ligninolíticas .....	34
4.2.4. Fitotoxicidad.....	35
5. MARCO CONCEPTUAL.....	36
6. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	37
7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES EN ESTUDIO .....	38
8. DISEÑO METODOLÓGICO .....	41
8.1. Población de estudio.....	42
8.2. Ámbito de estudio .....	42
8.3. Periodo de investigación .....	42
8.4. Tipo de investigación .....	42
9. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
9.1. Material biológico .....	42

9.2.	Identificación de cepas fúngicas con actividad ligninolítica pertenecientes al cepario del IIFB .....	44
9.2.1.	Activación de cepas en medio GEA.....	44
9.2.2.	Activación y selección de cepas en medio ASCA.....	44
9.2.2.1.	Aspecto macroscópico.....	45
9.2.2.2.	Aspecto microscópico .....	46
9.2.3.	Crecimiento de cepas en medio ABTS.....	47
9.2.4.	Establecimiento de condiciones modificadas de cultivo en medio líquido ASCA para la determinación cuantitativa de enzimas oxidorreductasas de <i>Bjerkandera sp.</i> y <i>Aspergillus sp.</i> ..	48
9.3.	Establecimiento de un proceso de remediación de suelos contaminados con aceite de motor sucio.....	49
9.4.	Establecimiento de ensayos de ecotoxicidad en <i>Chenopodium quinoa</i> .....	51
9.4.1.	Determinación del porcentaje de germinación.....	51
9.4.2.	Determinación del porcentaje de hojas primarias .....	51
9.4.3.	Determinación del porcentaje de la viabilidad de los plantines .....	52
9.4.4.	Determinación de la longitud del tallo .....	52
9.4.5.	Determinación del número de hojas e índice de área foliar .....	52
9.4.6.	Determinación de la longitud de la raíz.....	52
9.5.	Identificación molecular.....	53
9.6.	Determinaciones analíticas.....	54
9.6.1.	Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica .....	54
9.6.1.1.	Determinación de actividad Lacasa.....	54
9.6.1.2.	Determinación de la actividad Manganese Peroxidasa .....	55
9.6.2.	Determinación de los parámetros físico químicos en suelos contaminados.....	56
9.6.2.1.	Determinación de carbono orgánico.....	56
9.6.2.2.	Determinación de micronutrientes P, K y N .....	57
9.6.2.3.	Determinación del pH .....	58
9.6.2.4.	Determinación del porcentaje de humedad .....	59
9.6.3.	Determinación del porcentaje de hidrocarburos totales (TPH) .....	59
10.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
10.1.	Activación, crecimiento y selección de cepas fúngicas con actividad enzimática oxidorreductasa – Medios GEA, ASCA, ABTS .....	60
10.1.1.	Determinación cuantitativa de la actividad enzimática oxidorreductasa de <i>Bjerkandera sp.</i> y <i>Aspergillus sp.</i> en condiciones modificadas de cultivo en medio líquido ASCA.....	64
10.2.	Micorremediación de suelos contaminados con Aceite Sucio de Motor (ASM) .....	69

10.2.1.	Determinación de TPH en suelos contaminados con ASM y tratados con <i>Aspergillus</i>	69
10.2.2.	Variaciones de las actividades ligninolíticas y factores químicos y físicos del suelo debidas a la biorremediación .....	72
10.3.	Ensayo ecotoxicológico con semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> wild de suelos biorremediados .....	87
10.4.	Identificación Molecular .....	95
11.	CONCLUSIONES .....	95
12.	RECOMENDACIONES .....	97
13.	BIBLIOGRAFIA.....	98
	ANEXOS .....	113

## **Tabla de anexos**

<b>Anexo 1.</b>	Descripción de características macromorfológica y características microscópicas de las cepas desarrolladas en medios con Aserrín y cascarilla de arroz...	<b>112</b>
<b>Anexo 2.</b>	Descripción del crecimiento de las cepas fúngicas en medios con ABTS..	<b>114</b>
<b>Anexo 3.</b>	Descripción de la actividad enzimática oxidoreductasa determinada por la oxidación de ABTS, en 10 días de incubación.....	<b>115</b>
<b>Anexo 4.</b>	Evaluación Oxidoreductasa ANOVA de medidas repetidas.....	<b>116</b>
<b>Anexo 5.</b>	Análisis One way ANOVA del porcentaje de degradación de TPH luego de 6 meses de tratamiento con <i>Aspergillus sp</i> .....	<b>120</b>
<b>Anexo 6.</b>	PCA de las Condiciones finales, factores fisicoquímicos evaluados antes y después de la micorremediación con <i>Aspergillus sp</i> .....	<b>121</b>
<b>Anexo 7.</b>	Características morfológicas Longitud del tallo, elongación radicular y numero de hojas evaluados después de la micorremediación con <i>Aspergillus sp</i> .....	<b>124</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b>	Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de las cepas fúngicas en estudio.....	<b>43</b>
<b>Tabla 2.</b>	Descripción de características macromorfológicas de colonias fúngicas.....	<b>45</b>
<b>Tabla 3.</b>	Actividad ligninolítica. Interpretación de la intensidad del cromógeno verde generado.....	<b>47</b>
<b>Tabla 4.</b>	Establecimiento de las condiciones de producción de enzimas oxidoreductasas en medio líquido ASCA al 10% y 20%.....	<b>48</b>
<b>Tabla 5.</b>	Establecimiento de proceso de remediación en suelos contaminados con aceite sucio de motor, suplementado con material ligninocelulósico.....	<b>50</b>
<b>Tabla 6.</b>	Interpretación de los rangos de concentración de nutrientes en el suelo y los niveles de muestras superficiales para la mayoría de los cultivos agronómicos.....	<b>58</b>
<b>Tabla 7.</b>	Crecimiento en medio con residuos ligninocelulósico y la determinación cualitativa de la actividad oxidoreductasa de las 7 cepas fúngicas reactivadas.....	<b>61</b>
<b>Tabla 8.</b>	Actividad enzimática oxidoreductasa (UI/mL) máximas de las cepas fúngicas BOL 13 y YL12 bajo diferentes condiciones de cultivo.....	<b>65</b>
<b>Tabla 9.</b>	Actividades enzimáticas ligninolíticas y Factores químicos y físicos establecidos luego de 30 días de tratamiento del suelo contaminado con ASM e inoculado con la cepa YL12 de <i>Aspergillus sp</i> .....	<b>73</b>
<b>Tabla 10.</b>	Porcentaje de germinación, hojas primarias y viabilidad de plantines en suelos contaminados con ASM antes y después del tratamiento con <i>Aspergillus sp</i> .....	<b>88</b>
<b>Tabla 11.</b>	Descripción de características macromorfológicas.....	<b>112</b>
<b>Tabla 12.</b>	Actividad oxidoreductasa. Interpretación de la intensidad del cromógeno verde.....	<b>114</b>
<b>Tabla 13.</b>	Variables para Análisis de PCA.....	<b>121</b>

## Tabla de figuras

<b>Figura 1.</b>	Biodegradación fúngica de hidrocarburos poliaromático.....	<b>31</b>
<b>Figura 2.</b>	Características macroscópicas del crecimiento fúngico.....	<b>46</b>
<b>Figura 3.</b>	Actividad enzimática oxidorreductasa determinada en función a la oxidación del ABTS. Dos cepas fúngicas fueron inoculadas en el medio basal conteniendo ya sea 10 o 20% de aserrín/cascarilla de arroz e incubadas a 37°C en condiciones de agitación o no a 100 rpm, con humedad de 19 % (humedad relativa del ambiente) o 60% (humedad controlada).....	<b>66</b>
<b>Figura 4.</b>	Porcentaje de degradación de TPH luego de 6 meses de tratamiento con <i>Aspergillus</i> spp. cepa YL12, en función a la cantidad de aceite sucio de motor añadido a 100 g suelo (g ASM/100 g suelo). Categorización de concentraciones (g ASM/100 g suelo): -2= 0, -1= 4.6, 0= 9.2, +1= 15.5, +2= 19.1.....	<b>71</b>
<b>Figura 5.</b>	(I) Actividades enzimáticas ligninolíticas: Lacasa y Mn Peroxidasa y (II) Factores químicos y físicos establecidos luego de 30 días de tratamiento del suelo contaminado con ASM e inoculado con la cepa YL12 de <i>Aspergillus</i> sp.....	<b>74</b>
<b>Figura 6.</b>	Análisis de Componentes Principales (C, N, P, K, pH y Humedad relativa) en función a los tratamientos de suelo contaminado con ASM.....	<b>78</b>
<b>Figura 7.</b>	Características morfológicas del desarrollo de <i>Chenopodium quinoa wild</i> .....	<b>92</b>

## Tabla de abreviaturas

°C	Grados celsius
cm	centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
H <sub>1</sub>	Hipótesis alternativa
H <sub>2</sub> O	Agua
g/ L	Gramos por litro
Kg	kilogramo
L	Longitud
M	Concentración molar
mg	miligramo
mL	mililitro
N	Nitrógeno
nm	nanómetro
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrógeno
ANOVA	One-way Analysis of Variance
Rpm	Revoluciones por minute
TPH	Hidrocarburos Totales de Petróleo
sp.	Especies
ASM	Aceite sucio de motor
THC	Contenido total de hidrocarburos

## Resumen

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, fundamentalmente en los últimos cincuenta años, se ha traducido en un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos como los derivados del petróleo (entre ellos, los aceites lubricantes) que por sus características recalcitrantes y de baja biodegradabilidad, están impactando de manera persistente y acumulativa al medio ambiente.

El propósito del presente trabajo fue determinar la capacidad de biorremediación del suelo contaminado con aceite sucio de motor empleando 2 cepas fúngicas del cepario del IIFB, *Bjerkandera sp.* BOL13 y *Aspergillus sp.* YL12, consideradas productoras de enzimas extracelulares con actividad oxidorreductasa. De tal manera, la metodología comprendió siete etapas: 1) Activación de las cepas, 2) Inoculación y masificación de cepas, 3) Selección de la cepa con mayor actividad oxidorreductasa, 4) Establecimiento del proceso de Micorremediación, 5) Determinación del porcentaje de degradabilidad de los Hidrocarburos totales de Petróleo (TPH), 6) Determinación de los micronutrientes presentes en el suelo y 7) Ensayos de ecotoxicidad.

La cepa *Aspergillus sp.* YL12 presentó mayor actividad oxidorreductasa ca. 200 UI/ml en el medio de cultivo con sustrato ligninocelulósico: Aserrín y cascarilla de arroz, en comparación con la cepa *Bjerkandera sp.* BOL13. Posteriormente se estableció el proceso de Micorremediación bajo condiciones de laboratorio controladas, inoculando la cepa seleccionada *Aspergillus sp.* YL12 en suelos suplementados con material lignocelulósico al 20 % (aserrín y cascarilla de arroz) y contaminados con aceite sucio de motor (ASM) en concentraciones de 0 %; 4,6 %; 9,8 %; 15,5 %; 21,8 % y 29,1 %, respectivamente. Se

estableció el análisis de degradabilidad de TPH. Se comprobó que en los grupos experimentales: 9,8%; 15,50%; 21,80%, el porcentaje de degradación de los TPH alcanzó un 95 %, 96 % y 97 %, correspondientemente. La prueba estadística ANOVA demostró que el tratamiento con la cepa *Aspergillus sp* YL12, disminuye significativamente la cantidad de TPH presentes en el suelo contaminado con ASM. Además, de acuerdo al análisis de componentes principales, las variables que contribuyen más a la variación en las condiciones finales del tratamiento del suelo con la cepa *Aspergillus sp*. YL12 demostró un incremento de las concentraciones de Carbono, Nitrógeno, Fosforo, Potasio y de la humedad relativa, sin embargo el pH disminuyó de 7 a 4.

Por último se evaluaron factores de ecotoxicidad mediante la siembra de semillas de *Chenopodium quinoa wild*, no siendo evidente el efecto tóxico en etapas de germinación ni desarrollo de hojas primarias. No obstante, cuando se empleó concentraciones mayores al 15,5 % de aceite sucio de motor en los suelos tratados con la cepa *Aspergillus sp*. YL12, el porcentaje de viabilidad de plantines disminuyó.

### **Palabras clave**

Micorremediación, Enzimas oxidorreductasas, Enzimas ligninolíticas, Ecotoxicidad, aceite sucio de motor.

## Summary

The rapid expansion and growing sophistication of different industrial sectors, mainly in the last fifty years, has resulted in an increase in the quantity and complexity of toxic waste such as petroleum products (among them, lubricating oils) that for their recalcitrant characteristics and low biodegradability, are impacting persistently and cumulatively to the environment.

The purpose of this work was to determine the capacity of bioremediation of soil contaminated with dirty engine oil using 2 fungal strains of the IIFB strain-collection, *Bjerkandera sp.* BOL13 and *Aspergillus sp.* YL12, considered producers of extracellular enzymes with oxidoreductase activity. In this way, the methodology comprised seven stages: 1) Activation of the strains, 2) Inoculation and massification of strains, 3) Selection of the strain with greater oxidoreductase activity, 4) Establishment of the Mycoremediation process, 5) Determination of the percentage of degradability of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), 6) Determination of micronutrients present in the soil and 7) Ecotoxicity tests.

The strain *Aspergillus sp.* YL12 showed greater oxidoreductase activity ca. 200 IU / ml in the culture medium with lignin cellulosic substrate: sawdust and rice husk, compared to the strain *Bjerkandera sp.* BOL13. Subsequently, the Mycoremediation process was established under controlled laboratory conditions, inoculating the selected strain *Aspergillus sp.* YL12 in soils supplemented with 20% lignocellulosic material (sawdust and rice husk) and contaminated with spent motor oil (ASM) in concentrations of 0%; 4.6%; 9.8%; 15.5%; 21.8% and 29.1%, respectively. The degradability analysis of TPH was established. It was found that in the experimental groups: 9.8%; 15.50%; 21.80%, the

degradation percentage of the TPH reached 95%, 96% and 97%, correspondingly. ANOVA showed that the treatment with the strain *Aspergillus sp.* YL12, significantly decreases the amount of TPH present in soil contaminated with ASM. In addition, according to the analysis of main components, the variables that contribute most to the variation in the final conditions of soil treated with *Aspergillus sp.* YL12 reported the increase in the concentrations of Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Potassium and relative humidity, however the pH decreased from 7 to 4.

Finally, ecotoxicity factors were evaluated by sowing *Chenopodium quinoa* wild seeds, the toxic effect not being evident in germination stages or development of primary leaves. However, when concentrations greater than 15.5% of spent engine oil were used in soils treated with the *Aspergillus sp.* YL12, the percentage of viability of seedlings decreased.

### **Keywords**

Mycoremediation, Oxidoreductases, Ligninolytic Enzymes, Ecotoxicity, spent engine oil.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industrialización y el fomento de la tecnología en diversos ámbitos de la vida humana, ha convertido a los aceites lubricantes en productos de uso masivo por tanto los automóviles, transportes de carga pesada, aviones, embarcaciones, motores de agua, los equipos de planta de proceso tales como bombas, compresores, turbinas, utilizan aceites lubricantes para evitar el contacto directo entre superficies metálicas con movimiento relativo, reduciendo así la fricción y sus consecuencias, de tal manera el mercado mundial de lubricantes alcanza los 38,5 millones Tm anuales, distribuido aproximadamente a: Automoción 61%; Industria 24%; Otros 15%.

En nuestro medio los vehículos de combustión interna son la principal fuente consumo y generación de aceite usado pues de acuerdo a los datos del Registro Único para la Administración Tributaria Municipal (RUAT) y del Instituto Nacional de Estadística (INE) el parque automotor en Bolivia está creciendo a un ritmo promedio del 8 por ciento al año, esto resulta en consumo de unos 7,6 millones de Tm/año de lubricantes. En la Ciudad de La Paz, en los últimos 10 años el parque automotor se ve incrementado en más de un 80 % siendo reportado en el 2007 (191.384 vehículos), hasta el 2017 (427.922 vehículos) (INE I. N., 2017), siendo así un factor contaminante más generado por nuestra sociedad que tiene efecto directos sobre la salud ya que, los aceites lubricantes usados que se extraen de los vehículos adquieren concentraciones elevadas de metales pesados como plomo, cadmio, cromo, arsénico y zinc, producto del desgaste en los motores y maquinarias lubricadas (Silva, et al 2017) en su mayoría, compuestos de alto impacto nocivo en la salud humana, especialmente de naturaleza carcinogénica. Además, de acuerdo con (Nuñez, 2014), el aceite lubricante usado es potencialmente peligroso para el ambiente, debido a la

persistencia y habilidad que tienen para esparcirse en grandes áreas de suelo y agua. Una vez en el agua forman una película que no permite el paso de oxígeno, trayendo como consecuencia la degradación de los ecosistemas. Si son vertidos al suelo destruyen el humus por falta de oxígeno, disminuyendo la fertilidad (González, 2014). De tal manera la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos indica que un litro de aceite usado derramado en forma pura contamina un millón de litros de agua (suministro para 50 personas por año), mientras que cinco litros de aceite usado quemado contaminan el aire que una persona respira en tres años, y un litro de aceite usado derramado en el suelo puede llegar a formar una mancha de 4000 m<sup>2</sup> (Palaguachi & Heredia, 2017).

De tal manera, para el tratamiento de estos aceites sucios de motor se considera la opción de biorremediación más segura, más limpia, más eficiente de la energía y más económicamente viable que las tecnologías alternativas, como la incineración o el lavado con surfactante, debido al empleo de microorganismos en el tratamiento (puede ser *in situ* como en el cultivo de tierra o *ex situ* como en los biorreactores), ya que este requiere una infraestructura y atención mínimas (Medina, García, & Paricaguán, 2014). Los hongos filamentosos son los preferidos para la biorremediación de suelos contaminados con HAPs, debido a su capacidad de acceder a los hidrocarburos mediante el movimiento de sus hifas sin estar restringidos por entornos hidrófobos, la penetración de petróleo anóxico que contiene agregados del suelo y su capacidad para tolerar la presión osmótica en condiciones áridas para las enzimas en las primeras etapas de la biodegradación de HAPs (Gallegos & Romero, 2015).

En la actualidad existen empresas que captan, reciclan, reutilizan, transforman y comercializan el aceite sucio automotriz como la Empresa de Dorian Oil, además este

aceite sucio automotriz es empleado como fuente energética en procesos de combustión de hornos y calderas, para la obtención de bases lubricantes a través de la refinación o como insumo para otras industrias como la del caucho, fundición, cerámica entre otros (Gonzales, 2014), generando de tal manera una industria rentable que además promueve el cuidado y recuperación del medio ambiente. De tal manera la aplicación a gran escala del presente trabajo llega a ser una alternativa adicional a los procesos ya empleados en la industria recicladora de aceite automotriz para potenciar los tratamientos de transformación y generación de productos para su comercialización, asimismo disminuyendo mediante estos procesos biotecnológicos el costo del reciclaje a nivel industrial.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El negocio de los aceites en el mundo es grande, rentable y complejo, esto hace que los aceites usados sean uno de los residuos contaminantes más abundantes que se genera actualmente, pudiendo alcanzar la cifra de 38.5 millones de toneladas de Tm/año en el mundo. En la Ciudad de La Paz, el parque automotor desde el 2007 (191.384 vehículos), hasta el 2017 (427.922 vehículos), presenta un incremento del 80% según INE, esto resulta en consumo de unos 7,6 millones de Tm/año de lubricantes. Solo el 35 % del aceite de motor es empleado el restante 65 % es desechado como aceite sucio de motor sobre suelos, alcantarillados y en algunos casos tratados por métodos convencionales.

El efecto sobre el medio ambiente y la necesidad de generar soluciones alternas, amigables y sostenibles para el tratamiento de la contaminación del suelo por el aceite sucio de motor nos comprometen como profesionales e institución el minimizar este efecto negativo que se ha visto influenciado debido al incremento del parque automotor en nuestra ciudad. Aportando en consecuencia el alto impacto nocivo en la salud humana por la presencia de

aromáticos policíclicos (HAPs) y metales pesados en su composición; siendo estos principalmente de naturaleza carcinogénica. Además, la contaminación por HAPs tiene un efecto perjudicial sobre todo del ecosistema y hace que la condición del suelo sea desfavorable para el crecimiento de las plantas debido a la reducción en el nivel de nutriente disponible o aumento de ciertos elementos tóxicos.

Por lo tanto la aplicación de un proceso de biorremediación, promueve a que las sustancias orgánicas e inorgánicas peligrosas puedan degradarse, acumularse o inmovilizarse, dando como resultado una reducción significativa del nivel de contaminación, principalmente mediante el empleo de microorganismos para degradar HAPs en compuestos menos tóxicos y se pueda realizar in situ, sin necesidad de costosas infraestructuras o modificaciones. Entre las técnicas de la biorremediación se encuentra la micorremediación, esta emplea hongos en la eliminación de compuestos tóxicos; podría llevarse a cabo en presencia de hongos filamentosos (mohos) y macrohongos (setas). Los mecanismos responsables para la degradación de los aceites usados de motor por los hongos son caracterizados por la actividad de enzimas oxidorreductasas y ligninolíticas, las cuales presentan un mecanismo no específico y no estereoselectivo sobre los contaminantes recalcitrantes. Por esta razón el presente trabajo tiene la finalidad de proporcionar respuestas inmediatas a esta problemática, a través del empleo de cepas fúngicas de la diversidad microbiana boliviana en suelos contaminados con aceites sucios de motor, para dicho propósito, se establecieron estudios de sistemas comparativos de simulación en suelos contaminados con aceite sucio de motor, los cuales tienen la capacidad de biorremediar los suelos contaminados de forma natural y sin causar daño al ecosistema, siendo la eliminación de amplias gamas de

contaminantes y desechos presentes en el medio ambiente un requisito absoluto para promover el desarrollo sostenible de nuestra sociedad con bajo impacto medioambiental.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Determinar el potencial de remediación de suelos contaminados con aceite sucio de motor mediante la actividad ligninolítica de cepas fúngicas del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB)

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar y seleccionar cepas fúngicas con actividad enzimática ligninolítica del cepario de la unidad de Biotecnología Fúngica del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).
2. Establecer un proceso de remediación de suelos contaminados con aceite sucio de motor mediante el uso de cepas fúngicas seleccionadas.
3. Comprobar la efectividad del tratamiento de biorremediación efectuado en el suelo contaminado mediante técnicas de ecotoxicidad con el uso de *Chenopodium quinoa wild*.

### 4. DISEÑO TEÓRICO

#### 4.1. MARCO REFERENCIAL

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, fundamentalmente en los últimos treinta años, se ha traducido en un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos como los derivados del petróleo (Silva, et al 2013). Sin embargo, debemos tener muy presente, que los residuos generados por el uso de estos productos, entrañan un peligro para la salud y el medio ambiente. Por ello, es

necesario saber cómo evitar o reducir su producción, como manipularlos de forma segura y qué hacer con ellos una vez generados, para no afectar de forma negativa al Medio Ambiente (Tapia E., 2013).

El efecto en la salud por la exposición al aceite sucio de motor y sus componentes como ser partículas metálicas genera efectos directos que incluyen: efectos cancerígenos sobre las vías respiratorias superiores, tejidos pulmonares, próstata y vejiga por presencia de metales como plomo, cadmio, manganeso. Además, se reportaron que los mecánicos de automóviles y el personal que trabaja en la industria automotriz, son expuestos a cantidades altas de aceite usado de desecho sufriendo efectos de la piel (salpullidos), la sangre (anemia) y el sistema nervioso (dolores de cabeza y temblores) (Sanchez A., 2013).

Sobre el medio ambiente, se puede destacar su capacidad de contaminación de tierras, ríos por su baja biodegradabilidad, siendo que solo un litro de aceite puede contaminar un millón litros de agua que podría ser potable. En ciertos negocios dedicados a esta actividad además de botarlo por el fregadero le añaden detergente pensando que así se disolverá mejor. Grave error, pues forman en los ríos una capa oleosa que impide el correcto intercambio de oxígeno (Tapia E., 2013).

El empleo de microorganismos para la biorremediación de suelos contaminados con derivados de petróleo ha reportado el año 2014 la capacidad de degradación de aceite de motor de dos hongos *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* donde los contenidos de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo en suelos contaminados e inoculados aumentaron después de seis meses de tratamiento. Sin embargo, se destacó la disminución de potasio, pH y THC (Contenido total de hidrocarburos), *P. ostreatus* redujo el THC inicial a 8% y

9% en suelos contaminados con 20% de aceites de motor, respectivamente, lo cual fue menor empleando *P. pulmonarius* (Olanipekun, 2014).

De tal manera en otra investigación se biorremediaron suelos contaminados, la degradación total de hidrocarburos de petróleo (TPH) fue 84,41% al 5%, 64,87% al 10% y 44,27% al 15% de nivel de contaminación luego de dos meses de incubación con *P. pulmonarius*. Además, se reportó la reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en la concentración de metales pesados Cu y Zn. El contenido de cobre se redujo de 0,033 a 0,014 mg/kg a 0% de contaminación por aceite y de 0,027 a 0,021 mg/kg con una contaminación al 15% de aceite mientras que el zinc redujo de 0,076 a 0,059 mg/kg a 0% de aceite y de 0,057 a 0,056 mg/Kg al 15% de contaminación por aceite. Al sembrar *Corchorus olitorius* (Alverja), el crecimiento de la planta en el suelo remediado fue de 11,18 cm de alto después de la sexta semana, mientras que la planta de control fue de 4,23 cm a una contaminación de nivel del 5%

Por otra parte, se examinó el hongo de la pudrición blanca, *Pleurotus tuberregium*, por su capacidad para mejorar el suelo contaminado con petróleo crudo y apoyar en la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas en *Vigna unguiculata*, a los 0, 7 y 14 días después del tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron que la biorremediación del suelo contaminado con crudo era posible, especialmente cuando se había permitido al hongo establecer y colonizar completamente el sustrato mezclado con el suelo. Además, que el nivel más alto de contaminación por petróleo crudo (15%), presento una mejora de aproximadamente 25% en el valor del porcentaje de germinación. Esta tendencia de mejora en los valores también se observó para la altura de la planta, la

elongación de las raíces y la acumulación de biomasa, así como la disminución del contenido total de hidrocarburos (Cuaical, 2016).

También se estudiaron los efectos fisicoquímicos del aceite lubricante gastado sobre el suelo, dando como resultado un aumento de la densidad aparente, la porosidad del agua, la materia orgánica, los contenidos de carbono orgánico y la capilaridad del suelo además de reducir, la aireación del suelo, la capacidad de retención de agua, el nitrógeno, el fósforo, el sodio, el potasio, el magnesio y el calcio. Sin embargo, la reducción en la concentración de aceite lubricante gastado debido al riego diario dio como resultado mejoras en las propiedades físicas y químicas de la muestra de suelo (Silva, et al 2017).

## 4.2.MARCO TEÓRICO

Los problemas de contaminación por derivados del petróleo en el ámbito local, nacional e internacional son parte de nuestra vida cotidiana; es preocupante la manera en cómo se han ido degradando los ecosistemas de nuestro planeta, y la capa superficial de la corteza terrestre no es la excepción. La alta demanda energética en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados como su principal fuente. La actividad industrial ha ocasionado uno de los problemas más serios en materia de contaminación de suelos, donde el derrame de hidrocarburos derivados del petróleo ocupa uno de los primeros lugares.

### 4.2.1. Derivados del petróleo

El petróleo tiene presente hidrocarburos que son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, siendo de origen fósil, fruto de la transformación de materia orgánica procedente de zooplancton y algas que, depositados en grandes cantidades en fondos anóxicos de mares o zonas lacustres del pasado geológico,

fueron posteriormente enterrados bajo pesadas capas de sedimentos. El número de carbonos y su estructura química determina su clasificación. Los hidrocarburos alifáticos son de cadena lineal o ramificada y pueden ser saturados (alcanos) o insaturados (alquenos y alquinos). Los hidrocarburos de cadenas cíclicas, pueden ser saturados (ciclo alcanos) o con uno o más anillos bencénicos (aromáticos).

La contaminación de los suelos por petróleo es consecuencia de los procesos de fabricación, distribución, derrames, el propio de sus derivados aceite de motor, lubricante, diesel, kerosene, naftas, gasolinas y petróleo combustible, y por ende carecen de capacidad biodegradativa, afectando la flora, la fauna y al propio hombre por la interrelación existente en los ecosistemas.

#### 4.2.2. Aceite de motor

También conocido como aceite lubricante se produce a partir de aceite de base derivado de la destilación del petróleo (Cortez del Pino, 2013). Es considerado como uno de los productos más utilizados del proceso de refinación de petróleo debido a su capacidad para lubricar motores en automóviles y grupos de generación de energía, lo que es importante para garantizar el buen funcionamiento de un motor (Fundación YPF, 2017).

Los aceites lubricantes son productos de uso masivo, siendo consumidos por el sector industrial, empresas de servicios, y transporte. Los puntos de generación, así como los actores involucrados son muy diversos, destacándose en orden de relevancia por el volumen de generación las estaciones de servicio y talleres de mantenimiento de vehículos y plantas industriales. En el caso de los vehículos se estima una vida útil del aceite lubricante equivalente a los 5000 Km, mientras que en los usos industriales depende del uso específico.

Debido al uso cada vez mayor de aceite de motor en automóviles y la industria en todo el mundo, la contaminación de aceite de motor que es una fuente no puntual que está recibiendo más atención en áreas urbanas en comparación con la contaminación de petróleo crudo (Abioye, et al 2012). El parque automotriz mundial genera alrededor del 65% del total de aceite usado generado, mientras que el restante 35% es de origen industrial.

La denominación aceite usado o sucio se aplica para definir a los aceites de origen mineral, que durante el uso perdieron sus propiedades características, volviéndose inapropiados para continuar su utilización con el mismo propósito. Comprenden a los aceites lubricantes de motores (de vehículos y máquinas industriales), los fluidos hidráulicos y de transmisión.

#### 4.2.2.1. Composición del aceite de motor

El aceite de motor consiste principalmente en una mezcla de hidrocarburos que son compuestos alifáticos, aromáticos, ramificados y algunos compuestos organometálicos, así como aditivos para mejorar sus propiedades y que la mayoría de ellos son tóxicos para los organismos vivos y el medio ambiente (Vázquez R. 1989).

La investigación ha demostrado que la composición del aceite de motor fresco y usado es diferente en términos de estructura de hidrocarburos, contenido químico y contenido de metales. El aceite de motor fresco contiene 99,7% de hidrocarburo alifático, 0,27% de hidrocarburo aromático y 0,03% de hidrocarburo olefínico, mientras que el aceite de motor usado contiene 98,9% de hidrocarburo alifático, 0,94% de hidrocarburo aromático y 0,08% de olefínico hidrocarburo. El aumento significativo del contenido de hidrocarburos aromáticos en el aceite de motor gastado se debe a la oxidación del aceite del motor durante la operación del motor (Kupareva et al 2013).

La exposición a altas temperaturas y una elevada presión mecánica, el aceite de motor usado contiene una gran cantidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y metales. Muchos tipos de HAP en el medio ambiente se han identificado como contaminantes ambientales graves (Ghim O., et al 2018)

Después de su uso, el aceite lubricante adquiere concentraciones elevadas de metales pesados como el cromo, el zinc y el cobre se producen en aceite de motor gastado cuando las piezas del motor se desgastan durante el funcionamiento del motor (Obayori, et al 2014). Además, se encuentran con frecuencia solventes clorados en los aceites usados, provenientes principalmente por contaminación durante su uso (reacción del aceite con compuestos halogenados de los aditivos), esto constituye la principal preocupación de los aceites usados.

#### 4.2.2.2. Origen, toxicidad y problemática medioambiental de los hidrocarburos aromáticos policíclicos generado por el Aceite sucio de motor

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, HAPs) son una familia de compuestos orgánicos formados exclusivamente por carbono e hidrógeno, estructuralmente, son moléculas planas formadas por anillos de benceno fusionados

Los HAP se forman durante la descomposición térmica de moléculas orgánicas y posterior recombinación. Las mayores fuentes de HAP de origen natural son los incendios forestales y erupciones volcánicas. Las fuentes antropogénicas están relacionadas principalmente con actividades industriales que implican la quema de combustibles (madera, carbón, petróleo y sus derivados) su manipulación o transformación. Entre una de las fuentes de HAP en nuestro medio se tiene a la contaminación con aceite sucio de motor debido a que muchos

talleres mecánicos en la ciudad de La Paz tienden a desechar este aceite desgastado en terrenos abiertos, esorrentías, drenajes y canaletas, hecho que causa la contaminación del agua y el suelo desde hace más de 50 años atrás. La eliminación inadecuada del aceite de motor gastado es una de las principales fuentes no puntuales de contaminación del petróleo en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo, generando consecuencias negativas en el medio ambiente como en la salud del humano a pesar de que los HAP como tal son biológicamente inertes y requieren una activación metabólica para que expresen su genotoxicidad, incluida mutagenicidad y carcinogenicidad (Fu et al., 2012)

La absorción de HAP por el organismo humano se realiza principalmente por el tracto respiratorio, gastrointestinal o la piel. Su mecanismo de adsorción está íntimamente ligado a su alto carácter lipófilo, que facilita su difusión por los lípidos y lipoproteínas de las membranas celulares. Una vez absorbidos se distribuyen por todo el organismo, pero muestran preferencia por los tejidos grasos. Esto hace que sean compuestos con tendencia a ser acumulados en la cadena trófica (Van der Oost et al., 2003). Dentro del organismo son compuestos biológicamente inertes pero para facilitar su excreción son metabolizados a compuestos más solubles (epóxidos, fenoles, dioles, fenol-dioles, diol-epóxidos, quinonas y tetroles) y conjugados con sulfato, glutatión o ácido glucurónico para ser finalmente excretados por las heces vía ácidos biliares y en la orina. Sin embargo, la metabolización de HAP produce metabolitos electrofílicos reactivos capaces de formar aductos con el ADN, estos daños si no se reparan pueden generar mutaciones que a su vez pueden constituir la base para la iniciación de cáncer (Fu et al., 2012).

Fuera de los organismos vivos, también pueden ser activados por efecto de la radiación solar dando lugar al favorecimiento de la aparición de cáncer de piel (Fu et al., 2012).

Aunque la carcinogenicidad de los HAP sea la toxicidad más reportada y reconocida en la literatura, estos compuestos también poseen otros tipos de toxicidad (IARC, 2010) como son:

- Impacto en el desarrollo del feto humano disminuyendo el peso, longitud y tiempo de gestación.
- Disminución de la capacidad reproductora de los machos (ratas) por daños en el espermatozoides.
- Toxicidad a altas dosis en hígado y riñón.

A pesar de que son los principales contaminantes del aire, el suelo actúa como depósito de estos compuestos. En el suelo los HAP son retenidos por la fracción orgánica (Gholamalizadeh A. 2010; Huang et al., 2003) e inorgánica como las arcillas (Hundal et al., 2001) o los oxihidróxidos de hierro (Tunega et al., 2009).

Además, los contenidos peligrosos del aceite de motor pueden acumularse en los tejidos de las plantas, órganos de animales que afectan a toda la cadena alimentaria y provocan daños a largo plazo en la salud humana (Soltani N. et al 2015). Como también, la contaminación del aceite del motor gastado produce un impacto negativo en la economía, debido a que afecta a la agricultura que depende de los países al reducir el rendimiento de los cultivos (Nwite & Alu, 2015; Odjegba & Sadiq, 2002; Okonokhua, 2007).

#### 4.2.3. [Remediación de suelos y sedimentos contaminados con derivados de petróleo](#)

Entre algunas de las tecnologías para la recuperación de suelos impactados con derivados de petróleo, se encuentran la extracción con solventes, la incineración, la electroremediación y la biorremediación. Esta última ha tenido aceptación por su bajo costo en comparación con otras tecnologías, ya que se basa en el uso de microorganismos

(bacterias, hongos, levaduras y algas) o enzimas para producir una transformación parcial o total de contaminantes orgánicos. También se ha reportado que las bacterias como los hongos son de naturaleza heterótrofa y están relacionados con un gran número de géneros taxonómicos que pueden utilizar hidrocarburos como fuentes de energía y carbono para su crecimiento (Rahman K. et al 2009).

#### 4.2.3.1 Atenuación natural

Entre los mecanismos de remediación se incluye a la atenuación natural, esta se ha definido como la dependencia de los procesos naturales para lograr los objetivos de remediación específicos del sitio, y tiene el menor impacto ecológico adverso. La atenuación natural reduce las concentraciones del contaminante en el ambiente con los procesos biológicos, los fenómenos físicos (advección, dispersión, dilución, difusión, volatilización, sorción/desorción) y las reacciones químicas (intercambio iónico, complejación, transformación abiótica) (Ramírez & Iturres, 2005).

#### 4.2.3.2. Métodos biológicos

Aunque los HAP liberados en el medio ambiente pueden sufrir oxidación química, fotólisis, volatilización y adsorción sobre el sedimento y partículas del suelo, principal vía de eliminación es probablemente a través de la transformación y degradación microbiana. De tal manera se ha informado que los consorcios de aislados de bacterias degradan la TPH por varios autores, pero la ventaja de usar hongos de supera con demasía este ajuste por parte de las bacterias (Tirado D. et al., 2015).

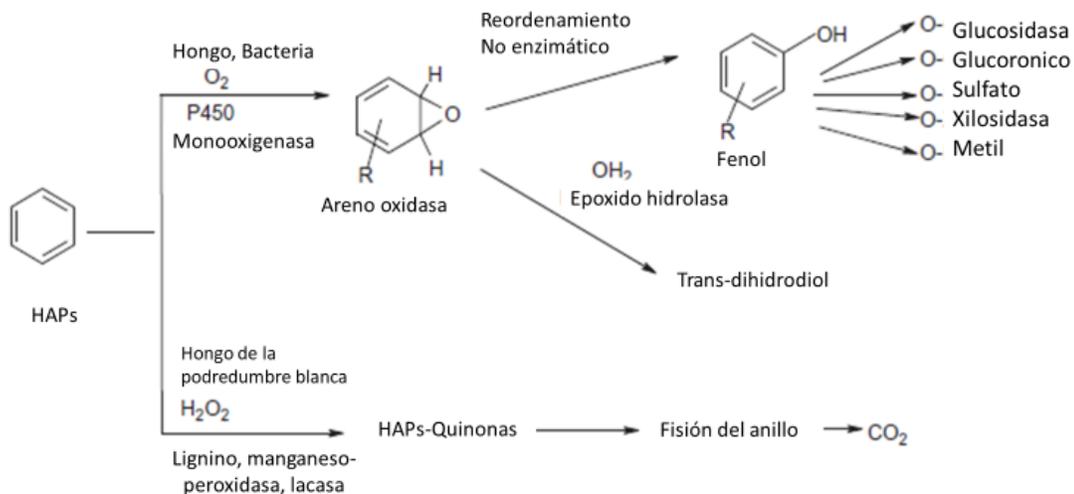
##### 4.2.3.2.1. Degradacion de PAH por hongos

Los hongos son organismos eucarióticos uni o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células de los hongos pluricelulares se agrupan en filamentos

llamados hifas que en conjunto reciben el nombre de micelio (Hudson H., 1986). Los hongos filamentosos poseen algunos atributos que les permiten actuar como buenos agentes potenciales de degradación, estos microorganismos se ramifican rápidamente en el sustrato donde se desarrollan, y llegan a digerirlo, a través de la secreción de enzimas extracelulares. Además, los hongos son capaces de crecer en condiciones ambientales de estrés, por ejemplo: medio ambiente con valores de pH bajos o pobres en nutrientes y con baja actividad de agua. Entre los microorganismos más estudiados en la degradación de compuestos recalcitrantes como petróleo y sus derivados los Ascomicetos y Basidiomicetos (Guimarães L. et al. 2006).

#### 4.2.3.2.2. Micorremediación

El uso de hongos en la remediación del suelo requiere un bajo mantenimiento de los sitios tratados con los hongos con un manejo mínimo. Además, requiere sustratos muy baratos como serrín y salvado de arroz utilizados en este estudio. Varios estudios han demostrado que un amplio espectro de hongos taxonómicos y filogenéticos tiene la capacidad de transformar los TPH co-metabólicamente utilizando su maquinaria enzimática. Un grupo diverso de hongos ligninolíticos y no ligninolíticos puede oxidar los TPH. Dos grupos principales de enzimas están involucrados en el ataque inicial a los TPH por hongos: el sistema enzimático que degrada la citocromo P-450 mono oxigenasa y las enzimas ligninolíticas (Chang et al, 2003), como se muestra en la figura 1, la biodegradación fúngica de hidrocarburo poliaromático.



**Figura 1.** Biodegradación fúngica de hidrocarburos poliaromáticos

#### a. Hongos no ligninolíticos

La mayoría de los hongos son no ligninolíticos (carecen de enzimas ligninolíticas). Su principal ruta de degradación es la oxidación de anillo aromático vía citocromo P-450, el primer paso implica la incorporación de un átomo de oxígeno en el anillo aromático mediante una enzima monooxigenasa del citocromo P450 para formar un óxido de areno (Sutherland et al., 1995). El siguiente paso consiste en la reacción de hidratación para formar un trans-dihidrodiol a través de una reacción catalizada por epóxido-hidrolasa (Bamforth y Singleton, 2005). Además, el óxido de areno sufre isomerización para formar metilato o fenol (que puede actuar como un sustrato para la posterior sulfatación). El óxido de areno también se puede conjugar con glucosa o ácido glucurónico. Tales conjugados de HAP producidos son en su mayoría menos tóxicos y más solubles que los compuestos de HAP originales. *Chrysosporium pannorum*, *Aspergillus niger* y *Cunninghamella elegans* son algunos ejemplos de hongos no ligninolíticos que utilizan la vía oxidativa mediada por enzimas P450 monooxigenasa para la degradación de la HAP (Bamforth & Singleton, 2005). Kanaly et al. (2000) han reportado la transformación de varios HAP, incluyendo benzo [a]

pireno, pireno y. crisenos compuestos menos tóxicos, más polares y por lo tanto solubles en agua que el HAP de partida.

#### b. Hongos ligninolíticos

Al ser la lignina un heteropolímero muy recalcitrante, los hongos ligninolíticos mineralizan la lignina basados en la producción de radicales libres, principalmente por medio de las enzimas extracelulares ligninoperoxidasa, manganesoperoxidasa y lacasa (transformándola hasta dióxido de carbono y agua) (Torres C., 2001).

Los hongos ligninolíticos, también llamados hongos de podredumbre blanca, han sido ampliamente estudiados para biorremediación de suelos. Las especies más utilizadas en estos estudios de biorremediación han sido *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*. Su propagación sobre suelos contaminados, la producción de enzimas ligninolíticas y la biodegradación de contaminantes, se favorece cuando estos hongos se inoculan en el suelo mezclados con materiales lignocelulósicos que les suministran la fuente de carbono necesaria para sostener su crecimiento e inducir la producción del complejo enzimático (Cordova & Cultid, 2015).

Los basidiomicetos son una clase de hongos con aparato vegetativo formado por hifas tabicadas o anastomosadas y caracterizadas por sus esporas de origen sexual en el exterior de las células madres, que reciben el nombre de basidios, y el de basidiósporas las esporas formadas por ellas. Tienen gran importancia por su actividad sapróbica como descomponedores, principalmente de la sustancia leñosa (celulosa y lignina) (Lee H., 2010). Los basidiomicetos que descomponen la madera pueden ser de los siguientes tipos: blanca o corrosiva (Degradan la lignina de la pared celular), parda o destructiva seca, parda o destructiva húmeda y blanda (Hatakka A. & Hammel K. 2010).

En el caso de los hongos de la podredumbre blanca los estudios evaluados para detectar la capacidad de degradación de TPH cuando se cultivan en condiciones de cultivo ligninolítico y no ligninolítico, demostraron la biodegradación de los TPH empleando los géneros de *Phanerochaete*, *Trametes*, *Bjerkandera* y *Pleurotus* (Hestbjerg et al., 2003). La biodegradación con hongos de podredumbre blanca es una de las formas más novedosas de eliminar los contaminantes del suelo, especialmente los hidrocarburos del petróleo y sus derivados (Cadena, 2016).

Además se reporta que las peroxidasas ligninolíticas (LiP, MnP y VP) producidos por hongos de pudrición blanca oxidan el polímero de lignina, que genera radicales aromáticos (Martínez, A. et al., 2005).

#### c. Sistema enzimático implicado en la degradación de la lignina.

La biodegradación de la lignina es un proceso complejo catalizado por enzimas que muestran una gran inespecificidad. El sistema enzimático ligninolítico extracelular está formado por dos tipos de actividades enzimáticas, peroxidasas y oxidasas. Estas enzimas son capaces de actuar directamente sobre el polímero de lignina, como las peroxidasas o las lacasas, o bien cooperar en el proceso generando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), como en el caso de las oxidasas (Dashtban M. et al., 2010).

Los hongos de pudrición blanca participan en la biodegradación de la lignina (polímero estereoirregular) mediante mecanismos oxidativos. El sistema enzimático ligninolítico, como ya se mencionó, es poco específico, ya que las peroxidasas y oxidasas actúan al azar sobre la molécula de lignina, generando radicales libres que son inestables y tienden a polimerizarse. Las principales enzimas que actúan directa o indirectamente sobre la lignina

son: lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas. Ciertos hongos de pudrición blanca producen las tres enzimas, algunos sólo dos y pocos producen una (Janusz G., 2017).

#### d. Enzimas oxidorreductasas

Una oxidorreductasa es un grupo de enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde una molécula donante (el agente reductor) a otra aceptora (el agente oxidante).

Desde una perspectiva evolutiva. Nuestra comprensión actual del papel de las diferentes oxidorreductasas generalmente se ha visto involucrada en la conversión de lignocelulosa. a partir de estudios de la descomposición de la madera, evidenciada por Basidiomicetos comúnmente clasificados como hongos de podredumbre blanca o de putrefacción marrón.

Las enzimas oxidorreductasas extracelulares incluyen Lignino peroxidasa (LiP), Manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa entre otras que son generalmente producidas por microorganismos degradadores de la madera (Balaji et al., 2013).

#### e. Enzimas ligninolíticas

Los hongos de la podredumbre blanca para ser capaces de degradar la lignina, utilizan diversas enzimas extracelulares con baja especificidad y fuerte actividad oxidativa. Las principales enzimas extracelulares que participan en la degradación de la lignina son hemo que contiene lignina-peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), MnP (EC 1.11.1.13) y que contiene Cu lacasa (EC 1.10.3.2) (Hatakka, 2011). Además, enzima implicada en la producción de peróxido de hidrógeno tal como alcohol oxidasa arilo (AAO, EC 1.1.3.7) se considera que pertenecen al sistema ligninolítico. A partir de los estudios realizados con hongos ligninolíticos en los años setenta, se comprobó que la degradación de la lignina daba lugar a

productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos. Por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina. Algunos años después, tres grupos reportaron de manera independiente, el descubrimiento de una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo, y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno. A esta enzima se le denomina ahora como Lignino peroxidasa (LiP). A partir de este hallazgo, se encontró la producción de dos hemoperoxidasas más: el manganeso peroxidasa (MnP) que oxida el  $Mn^{2+}$  a la especie oxidante  $Mn^{3+}$ , mientras que recientemente en los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* se ha descrito una MnP versátil (VP). Esta enzima conjuga las propiedades catalíticas de LiP y MnP (Pogni R. et al., 2005).

Además de estas peroxidasas, se detectó la producción en estos hongos ligninolíticos de una cuarta enzima, una fenoloxidasa denominada lacasa. Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua, y a través la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina (Potthast, A. et al., 1996 ). Estas enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más (Andlar et al., 2018).

#### 4.2.4. Fitotoxicidad

Con respecto a los roles directos en procesos de biorremediación, generalmente se evidencia la recuperación del suelo mediante el empleo de plantas o la evaluación de la fitotoxicidad. Las plantas pueden utilizar diferentes mecanismos eliminar eficientemente como también asimilar tanto contaminantes orgánicos como inorgánicos de un medio

ambiente contaminado: a) rizofiltración; b) absorción; c) Concentración y precipitación de pesado metales en la raíz; d) fitoextracción, es decir, Extracción y acumulación de contaminantes en tejidos de plantas incluyendo raíces y hojas; e) fitodegradación, es decir, degradación de moléculas orgánicas complejas en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y su incorporación en planta tejidos f) rizodegradación o planta asistida biorremediación, es decir, estimulación de degradación microbiana y fúngica por el liberación de enzimas de la raíz y exudados en la rizosfera y g) la fitoestabilización, es decir, adsorción y precipitación de contaminantes (principalmente metales) con consecuente reducción de su movilidad un fenómeno interesante es el interacción sinérgica entre plantas y microorganismos que se producen específicamente en el ambiente del suelo influenciado por las plantas, o rizosfera (Rao M. et al. 2010).

## 5. MARCO CONCEPTUAL

**Manganeso peroxidasa:** La enzima es secretada al exterior de la célula y necesita de dos iones calcio y un grupo hemo B (hierro-protoporfirina IX) por cada subunidad. El producto, Mn<sup>+3</sup> actúa como agente redox difusible y es capaz de oxidar una gran variedad de compuestos de la lignina.

**Lacasa:** Son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul. Catalizan la oxidación de un substrato orgánico o inorgánico y la reducción de oxígeno molecular a agua, por medio de un mecanismo de transferencia de un electrón.

**Basidiomiceto:** (Basidiomycota) son una división del reino Fungí que incluye los hongos que producen basidios con basidiósporas. Contiene a las clásicas setas y hongos con sombrero

**Biorremediación:** Surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el diseño de microorganismos capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrios en el medio ambiente.

**Micorremediación:** La eliminación, destrucción o supresión de contaminantes activos que causan efectos adversos o cualquier tipo de efectos nocivos para el medio ambiente mediante el uso de hongos o tecnología de hongos se conoce como micorremediación. Simplemente, también se puede definir como descontaminación del medio ambiente mediante el uso de tecnología basada en hongos que se conoce como micorremediación

**Lubricante:** Es una sustancia que, colocada entre dos piezas móviles, no se degrada, y forma asimismo una capa que impide su contacto, permitiendo su movimiento incluso a elevadas temperaturas y presiones. Derivado del petróleo es un producto procesado en una refinería, usando como materia prima el petróleo. Según la composición del crudo y la demanda, las refinerías pueden producir distintos productos derivados del petróleo.

## 6. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

El establecimiento de tratamiento microbiano con cepas fúngicas de fácil mantenimiento como los basidiomicetos y actinomicetos sean capaces de degradar los aceites sucios de motor en suelos contaminados *in vitro*, comprobando dicho tratamiento a través del cultivo de semillas de *Chenopodium quinoa wild* (Quinoa).

### **Hipótesis nula.**

El establecimiento de tratamiento microbiano con cepas fúngicas de fácil mantenimiento como los basidiomicetos y actinomicetos no son capaces de degradar los aceites sucios de

motor en consecuencia no se podrá comprobar el crecimiento de *Chenopodium quinoa wild* (Quinoa).

**Hipótesis alternativa.**

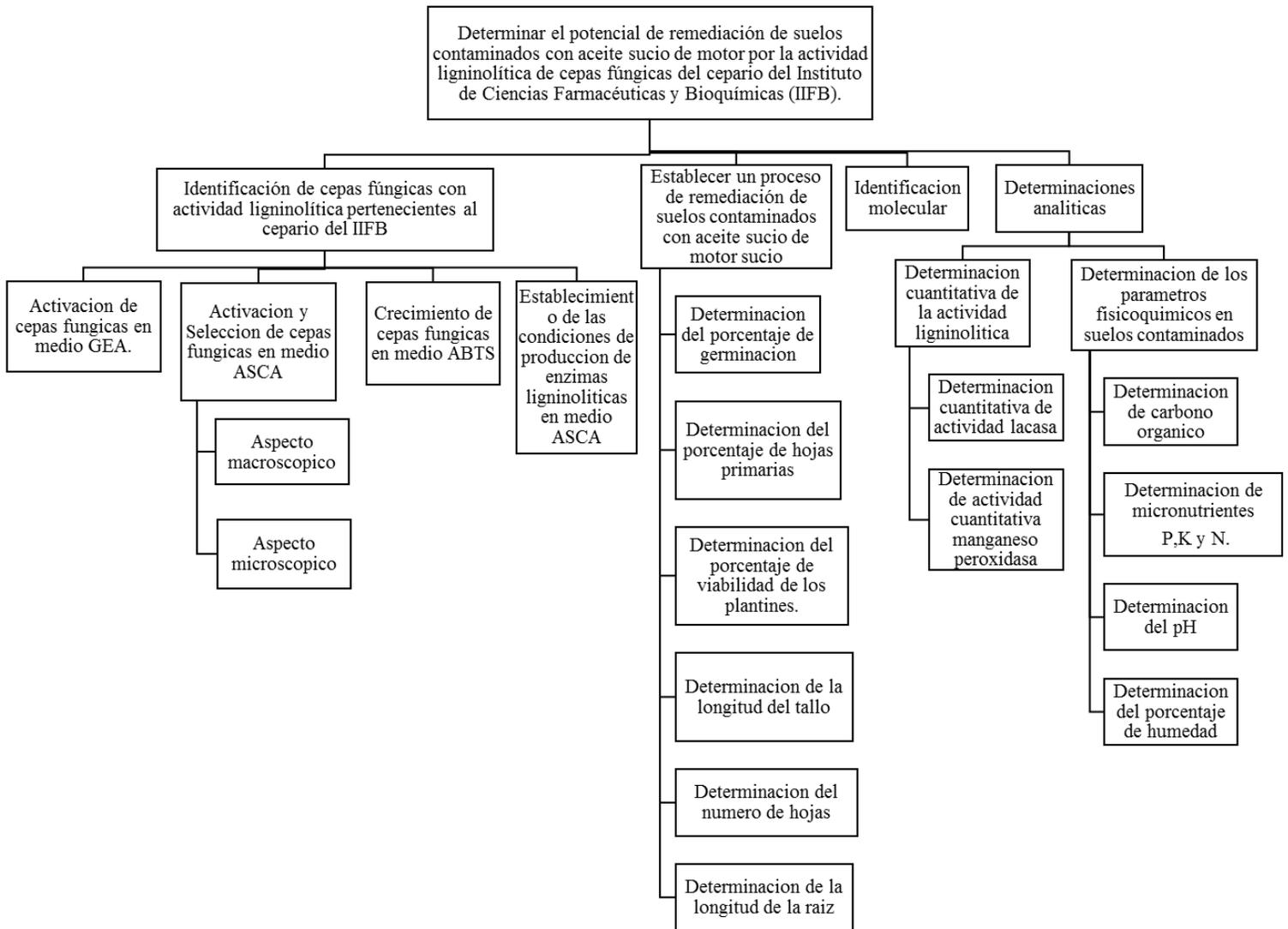
El establecimiento de tratamiento microbiano con cepas fúngicas de fácil mantenimiento como los basidiomicetos son capaces de degradar los aceites sucios de motor en suelos contaminados *in vitro*, comprobando dicho tratamiento mediante del cultivo de semillas de *Chenopodium quinoa wild* (Quinoa).

**7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES EN ESTUDIO**

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA	ESCALA	TIPO DE VARIABLE
Medio ASCA	Medio a base de sustrato ligninocelulósico, aserrín y cascarilla de arroz	El crecimiento de cepas fúngicas sobre sustrato ligninocelulósico funciona como inductor para la producción de enzimas ligninolíticas.	Actividad enzimática cualitativa en ASCA	Presencia del desarrollo micelial	SI/NO		Cualitativa
Medio ABTS	Medio base con ABTS 2,2 - azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), indicador de actividad ligninolítica	El crecimiento de cepas fúngicas en medio de ABTS, provocaran el viraje de transparente a verde si presentan actividad ligninolítica.	Actividad enzimática cualitativa en ABTS	Positivo/Color	- negativo + débilmente verde ++ verde +++ intenso verde		Cualitativa
Actividad Lacasa	La lacasa (EC 1.10.3.2; benzenediol: oxigen oxidoreductasa) es una enzima que cataliza la oxidación de aminas aromáticas y fenólicas.	Se determino espectrofotométricamente mediante la oxidación de ABTS, usando como sustrato el catión radical.	Actividad enzimática cuantitativa con ABTS	Positivo/color	UI/mL	Intervalo	Cuantitativa
Actividad Manganeso peroxidasa	El manganeso peroxidasa (E.C. 1.11.1.13: Mn (II):H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidoreductasa) son glicoproteínas, su proceso catalítico es dependiente de la difusibilidad de iones manganeso y la oxidación de compuestos aromáticos se hace de forma indirecta.	Se determino espectrofotométricamente mediante la oxidación de 2,6 dimetoxifenol	Actividad enzimática cuantitativa con 2,6 dimetoxifenol	Positivo/color	UI/mL	Intervalo	Cuantitativa
Micronutrientes P, K y N	Los micronutrientes son sustancias indispensables para los organismos fúngicos ya que intervienen en los diferentes procesos metabólicos.	El kit combinado HI-3895 permite medir el nitrógeno, el fósforo y el potasio, componentes importantes para la calidad del suelo.	Micronutrientes P, K y N del suelo	Escala colorimétrica	Bajo, intermedio, alto		Semicuantitativo
pH	El pH indica el estado ácido o alcalino donde se desarrollan las cepas fúngicas con actividad ligninolítica	El pH es medido por Kit Hanna 3895 para análisis de suelos	pH del suelo	Escala colorimétrica	Bajo, intermedio, alto		Cuantitativo

Humedad	La humedad presente en el suelo afecta a los procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelos	La humedad del suelo se calcula por la diferencia de peso, para obtener un peso constante	Humedad del suelo	Diferencia del suelo húmedo y suelo seco	Porcentaje		Cuantitativo
TPH	La determinación de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) es usada para la evaluación de sitios contaminados por hidrocarburos.	Para la determinación del porcentaje de hidrocarburos se utiliza el solvente diclorometano	TPH del suelo	Diferencia de la densidad óptica de las muestras	Porcentaje		Cuantitativo
Germinacion	La germinación es el proceso mediante el cual un embrión se desarrolla hasta convertirse en una planta. Para lograr esto, requiere de elementos básicos para su desarrollo	Se realiza el conteo de los brotes visibles sobre la superficie del suelo	Presencia de brotes	Conteo de brotes de 5cm de altura	Porcentaje		Cuantitativo
Generacion de hojas primarias	Las hojas verdaderas o primarias, se forman después de la germinación y a partir del meristema apical del tallo, que es responsable de la generación posterior de las partes aéreas de la planta.	Se cuantifica el número de brote que llegaron a formar las hojas primarias.	Presencia de hojas primarias	Conteo de brotes con presencia de hojas primarias	Porcentaje		Cuantitativo
Sobrevivencia	Conservación de la vida de la planta, con la contaminación con ASM	Se cuantifica el número de plantines que se conservaron tras cierto tiempo de desarrollo	Presencia de plantines tras 3 meses, en suelos contaminados con ASM	Conteo de presencia de plantines	Porcentaje		Cuantitativo
Longitud del tallo	El crecimiento en longitud del tallo se debe a la actividad de los meristemas apicales y al alargamiento subsecuente de los entrenudos y se denomina crecimiento primario.	Se mide la longitud del tallo en cm con una regla métrica desde el suelo hasta la punta del ápice	Longitud de tallo	Tallo variable	Cm		Cuantitativo

## 8. DISEÑO METODOLÓGICO



### 8.1.Población de estudio

Se estudiaron hongos que presenten actividad ligninolítica del cepario de Biotecnología fúngica IIFB.

### 8.2.Ámbito de estudio

El estudio fue realizado a nivel de laboratorio en el Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas (IIFB), en la unidad de Biotecnología Microbiana Fúngica.

### 8.3.Periodo de investigación

Quince meses

### 8.4.Tipo de investigación

Experimental

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1.Material biológico

Se utilizaron 7 cepas del cepario del IIFB cuyas características morfológicas se hallan detalladas a continuación:

**Tabla 1. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de las cepas fúngicas en estudio**

Cepa	Características macroscópicas	Características microscópicas	Clasificación de acuerdo a las características macro y microscópica	Origen
Cepa BOL 13 <i>Bjerkandera sp.</i>	Cepa de micelio blanquecino no denso de crecimiento radial.	Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy gruesas, parecidas a esqueléticas, pero ramificadas, tabicadas y con gruesas hifas en asa.	Basidiomiceto	Aislado de paja brava en el altiplano.
Cepa HL9	Cepa fúngica de micelio blanquecino disperso, de crecimiento radial	Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy delgadas, aseptadas, pero ramificadas, tabicadas y con delgadas hifas	Basidiomiceto	Aislado de seta fúngica en Irupana – La Plazuela.
Cepa HL10	Cepa fúngica de micelio blanquecino algodonoso aéreo denso, de crecimiento radial.	Hifas aseptadas no ramificadas, con paredes gruesa, hialinas	Basidiomiceto	Aislado de seta fúngica en Irupana – La Plazuela.
Cepa YL13,	Cepa fúngica de micelio ligeramente amarillenta dispersa, de crecimiento irregular.	Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy gruesas, septadas, ramificadas, y con delgadas hifas	Basidiomiceto	Aislado de seta fúngica en Irupana – La Plazuela.
Cepa YL13.1	Cepa fúngica de micelio blanquecino algodonoso denso, de crecimiento radial.	Hifas aseptadas no ramificadas, con paredes gruesa, hialinas	Basidiomiceto	Aislado de seta fúngica en Irupana – La Plazuela.
Cepa YL12	Cepa fúngica de micelio plomo verdoso arenoso disperso, de crecimiento irregular.	Conidióforos hialinos de pared rugosa. Cabezuela radiada, uniseriada, vesículas esféricas.	Ascomiceto	Aislado de seta fúngica en Irupana – La Plazuela.
Cepa HLR	Cepa fúngica de micelio blanquecino afelpado compactado, de crecimiento radial.	Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy gruesas, septadas, ramificadas, y con delgadas hifas	Basidiomiceto	Aislado de seta fúngica en Irupana – La Plazuela.

## 9.2. Identificación de cepas fúngicas con actividad ligninolítica pertenecientes al cepario del IIFB

### 9.2.1. Activación de cepas en medio GEA

El medio GEA constituido por extracto de levadura 0,5 g/L, glucosa 1 g/L, agar 15 g/L a pH 5,35 fue empleado para la activación de cada una de las 7 cepas fúngicas del IIFB. Estas cepas fúngicas fueron replicadas en el medio descrito anteriormente (Siles, Enrique et al, 2005) (Gutierrez A. et al., 2017) mediante la inoculación de un taco inóculo procedentes de tubos donde se tenían criopreservadas (- 20 °C). Las placas así inoculadas, fueron incubadas por un lapso de tiempo de 5 días a 30 °C ± 1 con 60 % de humedad y en condiciones de oscuridad (Kravetz S., et al, 2016).

### 9.2.2. Activación y selección de cepas en medio ASCA

Dos tipos de sustratos lignocelulósicos fueron empleados en la formulación del medio ASCA: 1) Aserrín, que fue facilitado por el aserradero (Av. Montes - La Paz) con un tamaño aproximado de 2 mm. y 2) Cascarilla de arroz, obtenida de la peladora de arroz de Palos Blancos. Esta última, fue molida y tamizada obteniendo partículas de 1,52 mm aproximadamente.

El medio de cultivo ASCA constituido por agar - agar 15 g/L y 20 % de material lignocelulosico (aserrín y cascarilla de arroz en una proporción 1:1) fue preparado en frascos de vidrio con cierre hermético y los mismos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, 15 psi, 15 min, tras la esterilización y enfriamiento del medio el medio fue distribuido en volúmenes de 20 mL en placas petri de 20 cm de diámetro.

Para evaluar la actividad enzimática ligninolítica de los microorganismos fúngicos se sembró en el medio ASCA (Ruiz W., et al, 2017), un taco micelar de 5mm a partir del crecimiento hifal establecido en el medio GEA y se incubaron los medios a 30°C con 60 % de humedad por 15 días en condiciones de oscuridad (Angarita C., 2014).

Una vez concluido el tiempo de incubación en medio ASCA se procedió a la identificación morfológica mediante 1) Aspecto macroscópico de la colonia y 2) Aspecto microscópico de los micelios.

### 9.2.2.1. Aspecto macroscópico

Se estableció la caracterización morfológica macroscópica de las cepas fúngicas en base a la observación y descripción de las características del crecimiento fúngico en la tabla siguiente:

**Tabla 2. Descripción de características macromorfológicas de colonias fúngicas**

Desarrollo	Color	Superficie	Borde	Consistencia	Aspecto	Forma	Elevación	Margen
Pobre		Lisa	Liso	Blanda	Creoso	Puntiforme	Plana	Entero
	Anverso	Acuminada	Radiado	Filante	Yesoso	Circular	Elevada	Ondulado
Regular		Crateriforme	Festoneado	Adherente	Cerebriforme	Filamentosa	Convexa	Lobulado
		Radiada	Lobulado	Leñosa	Algodonoso	Irregular	Pulvinada	Erosionado
Abundante	Reverso	Cerebriforme			Afelpado	Rizoide		Filamentoso
					Aterciopelado	Fusiforme		Rizado

Forma	Elevación	Margen o borde	Superficie
circular 	plana y extendida 	liso o entero 	plegada 
irregular 	elevada y limitada 	ondulado 	sectorizada 
filamentosa 	convexa umbilicada 	lobado 	cerebriformes 
rizoidal 		desflechado 	con surcos radiales 

**Figura 2. Características macroscópicas del crecimiento fúngico**

#### 9.2.2.2. Aspecto microscópico

Con dicho fin, muestras de micelio hifal (entre el cuarto y quinto día de crecimiento del frente hifal) fueron colectadas a través de la aplicación de la técnica de **Montaje mediante cinta adhesiva**. Esta técnica consiste en adherir una cinta adhesiva transparente sobre la superficie del micelio de la colonia crecida en la caja petri, y posteriormente colocar la cinta adhesiva sobre un portaobjetos con una gota de azul de metileno (Las paredes de las esporas toman una tonalidad azul oscuro por las que se las denomina CIANÓFILAS) para su posterior observación a 40X (Rojas., 2011). Mediante esta técnica se puede evidenciar las estructuras sin que pierda su disposición natural y sin perturbar mucho su morfología. De tal manera se pueden describir: tipo de hifa (generativas, esqueléticas y envolventes), tabicaciones miceliales, presencia de esporas formas vegetativas, conidios, esporangiforos, fialides, hifas cenocíticas y septadas.

### 9.2.3. Crecimiento de cepas en medio ABTS

El ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) es un compuesto utilizado para determinar la actividad oxidoreductasa presente en distintos especímenes. El ABTS ha sido utilizado en la formulación de medios selectivos para determinar la capacidad de hongos en la síntesis de enzimas ligninolíticas, siendo utilizado como sustrato e inductor enzimático (Morales R., et al, 2016).

El medio de cultivo ABTS líquido constituido por Extracto de levadura 0,5 g/L, glucosa 1 g/L, ABTS 0,25 g/L (Siles, Enrique et al, 2005) fue esterilizado en autoclave a 121°C, 15 psi durante 20 minutos. Se colocaron 2 ml de este medio líquido por pozo (2cm de diámetro) en microplacas de 12 pozos. Cada pozo fue inoculado con un taco de micelio crecido en medio GEA y la microplaca fue incubada a 30 °C, 60% de humedad por 7 días en condiciones de oscuridad.

La determinación cualitativa de la actividad ligninolítica por la oxidación de ABTS que es evidente a través de la generación del cromóforo color azul/verde, debido a que el ABTS reducido transfiere un electrón a la enzima para activarla. Se relaciona la intensidad del color generado con la actividad ligninolítica presente (Tabla 3).

**Tabla 3. Actividad ligninolítica. Interpretación de la intensidad del cromógeno verde generado.**

<b>INTERPRETACIÓN</b>	
-	Negativo
+	Débilmente verde
++	Verde
+++	Verde azulado

9.2.4. Establecimiento de condiciones modificadas de cultivo en medio liquido ASCA para la determinación cuantitativa de enzimas oxidorreductasas de *Bjerkandera sp.* y *Aspergillus sp.*

Se realizó el establecimiento de las condiciones de producción de enzimas oxidorreductasas en medio liquido ASCA, cuyas características generales comprenden la adición de sustrato lignocelulósico, a partir de una mezcla de cascarilla de arroz pulverizada y aserrín en una relación 1:1 (50 g de aserrín y 50 g de cascarilla de arroz), sustrato añadido al medio liquido de cultivo descrito por (Siles, Enrique et al, 2005) , cuya composición del medio liquido de cultivo base en g/L es la siguiente: Asparagina 0,078 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,04 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,01 g/L, MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 0,05 g/L, Extracto de levadura 2 g/L, glucosa 1 g/L y NH<sub>4</sub>Cl 5 g/L. En este sentido se prepararon medios de cultivo que contenían ya sea 10 y 20% p/v de esta mezcla de aserrín y cascarilla de arroz. Los medios así preparados fueron inoculados con tres tacos miceliales por cada cepa fúngica seleccionada previamente, y las condiciones de cultivo fueron establecidas de acuerdo a la tabla 4:

**Tabla 4. Establecimiento de las condiciones de producción de enzimas oxidorreductasas en medio liquido ASCA al 10% y 20%.**

Composición del medio de cultivo	Condiciones de cultivo
Medio liquido con 10% ASCA (1:1)	Agitación a 100 rpm
	Humedad 60%
Medio liquido con 20% ASCA (1:1)	Sin agitación, sin humedad ambiente

Para evaluar la producción de enzimas oxidorreductasas bajo estas condiciones de cultivo, se colectaron muestras de 3 mL de cada medio de cultivo, inoculado ya sea con la cepa BOL13 o YL12, cada dos días durante 10 días de cultivo.

Las muestras fueron filtradas (tamaño de poro 11 µm) y a cada 15 µL de filtrado se añadió 985 µL de la solución de 5mg/mL ABTS en acetato de sodio 0.1 M (volumen de 1 mL). La absorbancia se registró a una longitud de onda de 414 nm en un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK ( $\epsilon_{\lambda 414\text{nm}}=36000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El blanco para esta medición consistió en el reactivo (solución de ABTS en acetato de sodio) sin la adición de muestra.

$$A = \epsilon * c * L$$

A= Absorbancia

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción

C= Concentración molar

L= Longitud de celda

### 9.3. Establecimiento de un proceso de remediación de suelos contaminados con aceite de motor sucio

Se trabajó con muestras de suelo que fueron recolectadas de la zona de Pampahasi en la ciudad de La Paz. Las mismas fueron tomadas de una profundidad de 5 a 15 cm. y transportadas en bolsas herméticas esterilizadas mediante calor húmedo. El aceite sucio de motor fue obtenido de un taller automotriz ubicado en la zona de Cotahuma en la ciudad de La Paz.

Las condiciones de cultivo fueron establecidas de acuerdo a lo descrito por (Olanipekun, 2014) y modificado de la siguiente manera: se pesaron 400 g de suelo y 40 g de sustrato

lignocelulosico (Aserrín y cascarilla de arroz esterilizados en una relación 1:1) en cajas petri de 20 cm de diámetro y luego se mezclaron a fondo con aceite sucio de motor al 0%, 4,6%, 9,8 %, 15,5 %, 21,8 %, 29,1% y 37,2% p/p respectivamente y finalmente se esterilizaron a 121° C y 15 psi por 15 minutos. A continuación, cada tratamiento así establecido en cajas petri, fue inoculado con 6 tacos de 0.5 cm con micelio fúngico, distribuidas de forme equidistante. El control positivo del experimento consistió en suelo con sustrato lignocelulósico e inoculado con micelio fúngico, de la manera descrita anteriormente. Como controles negativos se emplearon suelos adicionados con sustrato lignocelulósico y la respectiva concentración de aceite sucio de motor. El modelo de experimento se resume en la tabla 5.

**Tabla 5. Establecimiento de proceso de remediación en suelos contaminados con aceite sucio de motor, suplementado con material lignocelulosico.**

Porcentaje (% p/p) (g. de aceite lubricante sucio de motor / 100 g. de suelo)	TRATAMIENTOS	
	<i>Cepa fúngica</i>	CONTROLES
0	-	Sin inoculo
0	+	Con inoculo
4,6	+	
9,8	+	
15,5	+	
21,8	+	
29,1	+	

Todos los tratamientos establecidos por duplicado, de este diseño experimental de tipo aleatorio, fueron incubados a 30 °C con 60% de humedad, en condiciones de oscuridad durante 3 meses. Al cabo de ese tiempo, los micelios residuales fueron removidos de los

suelos y se determinaron los parámetros fisicoquímicos de los suelos tratados biológicamente.

#### 9.4. Establecimiento de ensayos de ecotoxicidad en *Chenopodium quinoa*

Las semillas de *Chenopodium quinoa wild*, variedad quinua real, fueron adquiridas en el Mercado Rodríguez en la ciudad de La Paz. En bolsas negras de polietileno para vivero (15x20cm), se llenaron con 400 g de suelo según el acápite de adaptación de microorganismos en suelos contaminados, datos detallados en la tabla 4 (referente a los tratamientos empleados). El experimento fue establecido por duplicado.

##### 9.4.1. Determinación del porcentaje de germinación

Se contabilizaron las semillas germinadas para cada tratamiento a los cinco días de experimentación y se evaluó su capacidad germinativa utilizando el índice de porcentaje de la germinación relativa de semillas (% GRS) de acuerdo con lo reportado por (Pérez E., et al, 2017), utilizando la siguiente fórmula modificada:

$$\% \text{ GRS} = \frac{\text{Número de semillas germinadas con la muestra con aceite}}{\text{Número de semillas germinadas en composta}} \times 100$$

##### 9.4.2. Determinación del porcentaje de hojas primarias

Según el método de (Díaz M. et al, 2017), se registró el número de semillas de *Chenopodium quinoa wild* que al cabo de 5-7 días desarrollaron hojas primarias.

$$\% \text{ HPS} = \frac{\text{Número de semillas con hojas primarias con la muestra de aceite}}{\text{Número de semillas con hojas primarias en composta}} \times 100$$

#### 9.4.3. Determinación del porcentaje de la viabilidad de los plantines

Se realizó el seguimiento de la viabilidad de los plantines de quinua, esta fue evaluada a través de la determinación y comparación del porcentaje de desarrollo de los plantines expuestos a contaminación de acuerdo a los tratamientos efectuados y suelo sin tratamiento, al cabo de 4 meses de desarrollo.

#### 9.4.4. Determinación de la longitud del tallo

La determinación de la longitud del tallo fue registrada al cabo de cuatro meses de crecimiento de los plantines de quinua. Esta medición fue efectuada utilizando una regla milimetrada desde el nivel del suelo o hipocotíleo hasta la punta de la yema terminal (Olivero A., et al. 2013). La circunferencia del tallo fue determinada a 2 cm sobre el nivel del suelo mediante el uso del calibrador vernier.

#### 9.4.5. Determinación del número de hojas e índice de área foliar

El número de hojas fue determinado al cabo de los 4 meses del desarrollo de los plantines y el área de la hoja fue determinada por el método de (Hoyt & Bradfield 1962) (Vidal, 2012)

donde:  $A_{\text{Hoja}} = (L) \times (H) \times (0,75)$

$A_{\text{Hoja}}$  = Área de la hoja

L = Longitud de la hoja

H = Ancho de la hoja

(0,75) = Factor de corrección para el área foliar

#### 9.4.6. Determinación de la longitud de la raíz

Se determinó la longitud total de la raíz principal según el método de (Vargas G., et al, 2009), utilizando una regla milimétrica midiendo la distancia desde el nivel del suelo o epicotíleo hasta la punta de la raíz.

### 9.5. Identificación molecular

Se realizó la identificación molecular de las cepas aisladas mediante PCR. En esta etapa se procedió a realizar el lavado de esporas con solución fisiológica de las muestras en estudio. Seguidamente se procedió a centrifugar a 8500 rpm por 5 min en la centrifugadora refrigerada. El sobrenadante obtenido se desecha y al pellet se le adiciona 500 µL de TSE (Tris 0,5 M; sucrosa 0,35 M; EDTA 0,1M) , se vuelve a centrifugar a 8500 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se repite este proceso dos veces más. Seguidamente se añadió 500 µL de solución de lisis (Tris 0,5 M; NaCl 0,1 M; SDS 10%) y se incubo a 65 °C por una hora. Luego se añadirá 50 µL de solución TRIS (2 M) y 150 µL de NaCl (5 M). La solución se mezclará suavemente por inversión. Centrifugar a 8500 rpm por 10 min. Para luego extraer el sobrenadante a un tubo de centrifuga estéril al cual se le adicionara 850 µL de etanol absoluto, mezclar por inmersión e incubar en una cama de hielo a -20 °C por 20 min. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min, desechar el sobrenadante. Luego se procedió adicionar 100 µL de buffer de lavado y centrifugar a 13000 rpm por 3 min, se desechó el sobrenadante y se repitió este pasó 3 veces. Y por último se deja con la tapa vuelta hasta que el buffer de lavado se haya evaporado, luego se añade 100 µL de agua tridestilada y se guardara a 4 °C.

La identificación molecular de *Aspergillus spp.* Se realizo mediante amplificación de secuencias de las regiones ITS del DNA ribosomal, por medio de PCR convencional, utilizando cebadores como ITS 1 y el cebador universal ITS4. Las condiciones óptimas de la reacción de PCR siguen el perfil térmico a continuación: Desnaturalización inicial de 94°C x 15 min, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 1 min (Desnaturalización), 57°C x 1 min (Alineamiento), 72°C x 1 min (Extensión), y una elongación final de 72°C por 7 minutos.

Para la electroforesis horizontal los amplicones obtenidos fueron previamente corridos en un gel de agarosa al 2% para presencia o ausencia de banda, posteriormente se hizo una corrida electroforética en un gel de agarosa al 3 %, durante 3 horas conjuntamente con el marcador de peso molecular. El tamaño del amplicon de interés oscila entre 500 a 550 pares de base según (Garzon N., 2013)

## 9.6.Determinaciones analíticas

### 9.6.1. Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica

#### 9.6.1.1.Determinación de actividad Lacasa

La actividad de la enzima lacasa se determinó mediante la oxidación de ABTS (Ácido 2,2'-azino bis(3-etilbencen-tiazolina-6-sulfónico)) al catión radical  $ABTS^+$ . El ensayo se realizó adicionando con una micropipeta directamente en una celda de cuarzo de 10 mm, 1050  $\mu$ L de buffer acetato de sodio ( $CH_3COONa$ ) 0,1 M pH 5,0, 2100  $\mu$ L de extracto enzimático y 350  $\mu$ L de ABTS 1 mM, para un volumen de reacción de 3,5 ml (Cordova & Cultid, et al. 2015) Se generó una coloración azul debido a la oxidación del ABTS, para apreciar mejor la reacción los reactivos se adicionaron en el orden mencionado. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK ( $\lambda_{420nm}=36000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El blanco para esta medición se preparó a través de la adición de 1050  $\mu$ L de buffer acetato de sodio ( $CH_3COONa$ ) 0,1 M pH 5,0, 2100  $\mu$ L de extracto enzimático y el ABTS se reemplazó por 350  $\mu$ L de agua destilada.

Una unidad de lacasa se define como un  $\mu$ mol de producto formado por minuto ( $U= \mu\text{mol}/\text{min}$ ), bajo las condiciones del ensayo. Las unidades enzimáticas (U/L) de lacasa se calculan utilizando la ecuación 1.

$$Lac \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times L} \right) = \frac{\Delta\text{ABS} \times V_r \times f_d}{t \times \xi \times L \times V_m}$$

Ecuación 1.

Donde,  $\Delta\text{ABS}$  es la diferencia entre la lectura de absorbancia final - lectura de absorbancia inicial,  $V_r$  es el volumen total de la reacción (mL),  $f_d$  es el factor de dilución,  $\xi$  es el coeficiente de extinción molar (unidades  $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $L$  es la longitud de la celda (cm),  $V_m$  es el volumen de la muestra (mL). (Troya S., et al, 2017).

#### 9.6.1.2. Determinación de la actividad Manganese Peroxidasa

La actividad de MnP se determinó a partir de la oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP). El ensayo se realizó adicionando con una micropipeta directamente en una celda de cuarzo de 10 mm, 175  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) 0,4 mM, 1750  $\mu\text{L}$  de 2,6-DMP 10 mM en buffer acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0,1 M pH 5,0, 1575  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 105  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 22 mM, para un volumen de reacción de 3,6 mL, los reactivos se deben adicionar en el orden mencionado. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 468 nm en un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK ( $\lambda_{468\text{nm}} = 10 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El blanco para esta medición se preparó con la adición de 175  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) 0,4 mM, 1750  $\mu\text{L}$  de 2,6-DMP 10 mM en buffer acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0,1 M pH 5,0, 1575  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se reemplazó por 105  $\mu\text{L}$  de agua destilada (Cordova & Cultid, et al. 2015)

Una unidad de actividad representa 1  $\mu\text{mol}$  de producto oxidado de DMP por minuto. Las unidades enzimáticas (U/L) de MnP se calculan empleando la ecuación 2.

$$MnP \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times L} \right) = \frac{\Delta ABS \times Vr \times fd}{t \times \xi \times L \times Vm}$$

Ecuación 2.

Donde,  $\Delta ABS$  es la lectura de absorbancia final-lectura de absorbancia inicial,  $Vr$  es el volumen total de la reacción (mL),  $fd$  es el factor de dilución,  $\xi$  es el coeficiente de extinción molar,  $L$  es la longitud de la celda (cm),  $Vm$  es el volumen de la muestra (mL). (Troya S., et al, 2017).

## 9.6.2. Determinación de los parámetros físico químicos en suelos contaminados

### 9.6.2.1. Determinación de carbono orgánico

La determinación de carbono orgánico fue realizada por el método estequiométrico de Walkley y Blackh, que se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado. Después de un cierto tiempo de espera, la mezcla se diluye y se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de  $\text{Fe}^{3+}$  y el dicromato de potasio residual (que no reaccionó) es valorado con sulfato ferroso, utilizando difenilamina como indicador. Por este procedimiento se detecta entre 70–84% del carbón orgánico total, por lo que es necesario introducir un factor de corrección, el cual varía dependiendo del suelo. Se

puede utilizar el valor obtenido para el carbono orgánico total, multiplicando este valor por el factor de Van Bremelen (1.724) (Felix J. & Garcia C. 2015).

Se pesó 0.5 g de muestra tamizada (0.5 mm) y se añadió 10 mL de  $K_2Cr_2O_7$  1 N y se homogeneizó mediante el uso de vortex por 30s a 1 min; posteriormente se agregó 20 mL de  $H_2SO_4$  concentrado y se agita con el uso de vortex. Se dejó en reposo 30 min sobre una lámina de asbesto o sobre una mesa de madera, con el fin de aprovechar al máximo el calor generado de la reacción. Se añadió 200 mL de  $H_2O$  destilado y 5 mL de  $H_3PO_4$  concentrado para eliminar las interferencias por hierro, para después adicionar de 5 a 10 gotas de indicador de difenilamina, dando una coloración rojo oscuro (ladrillo) a la solución, que al proceder con la titulación con sulfato ferroso vira a verde claro. Simultáneamente, se preparó un blanco por cada serie para obtener el factor de corrección, para lo cual se tomaron 10 mL de  $K_2Cr_2O_7$  y se le agregó 20 mL de  $H_2SO_4$ , finalmente se tituló con sulfato ferroso valorado. Para calcular el porcentaje de carbono orgánico se utiliza la siguiente fórmula:

$$\%C_{\text{orgánico}} = \left( \frac{V_{SF_{\text{Bco}}} - V_{SF_M}}{\text{Peso muestra}} \right) (N_{FeSO_4 \cdot 7H_2O}) (0.39) (mcf)$$

$V_{SF_{\text{Bco}}}$  = Volumen de sulfato ferroso usado en el blanco (mL).  
 $V_{SF_M}$  = Volumen de sulfato ferroso usado en la muestra (mL).  
 $N_{SF}$  = Normalidad del sulfato ferroso.  
 $\text{Peso}_{\text{muestra}}$  = peso de la muestra empleada (g).  
 $mcf$  = factor de corrección de humedad =  $\left( \frac{100}{\text{peso seco}} \right)$

$$\%Materia\ orgánica = (C_{\text{orgánico}})(1.724)$$

#### 9.6.2.2. Determinación de micronutrientes P, K y N

El contenido de fósforo, potasio y nitrógeno fue determinado utilizando Kit colorimétrico HI-3895 (HANNA) de prueba de suelo para Fósforo, Potasio y Nitrógeno.

Para la evaluación de los micronutrientes se pesaron 2 gramos de suelo al cual se le añadió 20 ml de agua destilada, luego se agito con vórtex durante un minuto la suspensión. Se dejo reposar por 24 horas la suspensión.

Para la evaluación de **potasio**, se colocaron 0.5 mL del extracto de suelo pre tratado en un tubo de ensayo limpio. Luego se añadió 2 mL de agua destilada, para finalmente agregar 1g de reactivo HI 3895-K, se tapó el tubo y agito durante 30 segundos con vórtex para disolver el reactivo, con la ayuda de la tarjeta de lectura de potasio se compara los valores de potasio presente en estos suelos.

Para la evaluación de **fósforo y nitrógeno**, se colocaron 2,5 mL del extracto de suelo en tubos de ensayo. Luego se les añadió por separado 1g de reactivo HI 3895-P y HI 3895-K, se tapó el tubo y agito durante 30 segundos con vórtex para disolver el reactivo, con la ayuda de la tarjeta de lectura de potasio se compara los valores de potasio presente en estos suelos.

**Tabla 6. Interpretación de los rangos de concentración de nutrientes en el suelo y los niveles de muestras superficiales para la mayoría de los cultivos agronómicos**

Nivel en el Suelo	Potencial de Rendimiento Esperado <sup>†</sup>	P	K [Mayoría de Cultivos]
Muy Bajo <sup>§</sup>	<65%	<16	<61
Bajo <sup>§</sup>	65 - 85%	16 - 25	61 - 90
Medio <sup>§</sup>	85 - 95%	26 - 35	91 - 130
Optimo	100%	36 - 50	131 - 175
Arriba del Optimo	100%	>50	>175

### 9.6.2.3. Determinación del pH

Se usó el kit de suelos HANNA HI 3895. Para esta técnica se trabajó con 1.6 gramos de suelo en un tubo de ensayo y luego se le añadió 2.5 mL de agua destilada. Luego se agregó

1 g de reactivo HI 3895-pH, se agito suavemente por inversión el tubo de ensayo por un lapso de 30 segundos. Para luego dejar reposar el tubo durante 5 minutos. Con la ayuda de una tarjeta de colores de pH, se comparó el valor de pH de los suelos contaminados pre y post micorremediación.

#### 9.6.2.4. Determinación del porcentaje de humedad

El método NCh 1515 para determinar humedad o la cantidad de agua presente en la muestra se basa en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una estufa o horno, refiriendo su peso al peso total de la muestra y expresada como porcentaje (Gómez M. & Vidal S., 2007).

La humedad del suelo se calculó por la diferencia de peso entre una misma muestra húmeda y después del secado de las muestras en mufla, para obtener un peso constante. Se pesó un gramo de muestra sobre un papel de aluminio. Luego se colocó la muestra dentro de la estufa a 80 °C por 24 horas. Seguidamente se saca la muestra y se deja dentro de un desecador. Posteriormente se pesó la muestra para calcular los porcentajes de humedad en el suelo por la diferencia de pesos.

$$\% \text{ Humedad del suelo} = \frac{(\text{Masa húmeda} - \text{Masa seca})}{\text{Masa seca}} * 100$$

#### 9.6.3. Determinación del porcentaje de hidrocarburos totales (TPH)

Para la determinación del porcentaje de hidrocarburos policíclicos se empleó el método descrito por Mohammadi. Se colocó 1 gramo de suelo tanto de pre como de post tratamiento, respectivamente en tubos de ensayo conteniendo con diclorometano, se mezcló por agitación y se dejó reposar 15 minutos. Finalmente, la fase orgánica reunida se

dejó secar a temperatura ambiente hasta reducir su volumen. Los residuos se disolvieron en 5 ml de diclorometano y se procedió a la lectura de la densidad óptica a 495 nm (Mohammadi M., et al., 2017)

$$\% \text{TPH} = \frac{(\text{Abs inicial} - \text{Abs final})}{\text{Abs inicial}} * 100$$

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1. Activación, crecimiento y selección de cepas fúngicas con actividad enzimática oxidorreductasa – Medios GEA, ASCA, ABTS

Con la finalidad de remediar suelos contaminados con aceite sucio de motor, se consideró el uso de basidiomicetos y ascomicetos como agentes biológicos responsables de la biorremediación de potenciales compuestos orgánicos presentes en el aceite sucio de motor.

El presente estudio consideró un método ecológico y viable que aprovecha la capacidad metabólica de estos agentes fúngicos para transformar o mineralizar contaminantes orgánicos y compuestos recalcitrantes. En este contexto, siete cepas fúngicas pertenecientes a las phyla Basidiomycota y Ascomycota depositadas en el cepario del IIFB fueron reactivadas en medio de cultivo GEA, obteniéndose en el caso de basidiomicetes el desarrollo micelial y en el caso de ascomicetes formación de ascosporas.

Una vez reactivadas las cepas, se procedió a determinar la capacidad de las mismas para crecer en medio sólido con aserrín y cascarilla de arroz como sustrato ligninocelulósico (ASCA), como también la capacidad de producir enzimas oxidorreductasas a través del cultivo en medio líquido ABTS (Anexo 2). La descripción macroscópica y microscópica de las cepas fúngicas activadas se halla descrita en el Anexo I. Tanto el crecimiento en función

a la utilización de material lignocelulósico, como aserrín y la cascarilla de arroz que son considerados como inductores enzimáticos y fuente de carbono para microorganismos fúngicos; como también la reducción del ABTS son características propias de agentes biológicos con potencial productor de actividades enzimáticas ligninolíticas, celulolíticas y hemicelulolíticas (Cabezas, 2014) .

En la tabla 7, se observa la coincidencia en la determinación de una posible actividad oxidorreductasa debida al crecimiento de las 7 cepas fúngicas en el medio de cultivo con cascarilla de arroz y aserrín (ASCA) y la reducción de ABTS.

**Tabla 7. Crecimiento en medio con residuos lignocelulósico y la determinación cualitativa de la actividad oxidorreductasa de las 7 cepas fúngicas reactivadas.**

<b>CEPA/CÓDIGO</b>	<b>Crecimiento en medio ASCA</b>	<b>Crecimiento en medio ABTS</b>
<b>Basidiomicetos</b>		
<i>Bjerkandera sp.</i> Bol 13	+	+
QD		
HL9	+	-
HL10	+	-
YL13	+	-
YL 13.1	+	-
<b>Ascomicetos</b>		
HLR	+	-
<i>Aspergillus sp.</i> YL12	+	+

Solamente las cepas de *Bjerkandera sp.* y de *Aspergillus sp.* YL12 fueron capaces de desarrollar en medio solido con material lignocelulósico y presentar actividad oxidorreductasa determinada a través de la oxidación del ABTS (viraje de color de transparente a verde) (Arboleda & Mejia, 2010). De tal manera, ambas fueron seleccionadas para posteriores ensayos.

*Bjerkandera sp.* es un basidiomiceto al igual que *Pleurotus* y *Trametes*, involucrada en la pudrición o descomposición de la madera (hongos de la podredumbre blanca) degradando la lignina en la naturaleza de una forma eficiente, son capaces de oxidar compuestos xenobióticos incluidos algunos contaminantes ambientales (Khelifa Bouacem, 2017), debido a que producen peroxidasas ligninolíticas (Ward G., 2003), la capacidad de estas enzimas ligninolíticas fue aprovechada en aplicaciones diversas de remediación e industria (Hong Sodaneath, et al., 2017), como ser la decoloración de los colorantes reactivos (rojo 120, azul 4, naranja 16 y negro 5) y colorantes ácidos (rojo 114, azul 62, naranja 7 y negro 172) (Aranda, 2018), colorantes industriales como el Turquesa Erionyl (Osorio, Juliana et al., 2018), como también existen reportes de la transformación por *Bjerkandera sp.* de residuos lignocelulósicos ricos en compuestos fenólicos, con carácter fitotóxico y microtóxico, (Mercedes Garcia, 2017).

Las cepas de *Aspergillus spp.* perteneciente al *phylum Ascomycota* se ha estudiado en procesos de biotransformación efectiva de compuestos tóxicos, producción de metabolitos secundarios, las aplicaciones ambientales y la producción de otros productos industriales (O.P. Ward, 2005). Entre sus aplicaciones (Srinu A, 2018) se han reportado la efectividad de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger* en la decoloración de azul brillante-R (RBBR) y azul ácido 25 (AB-25), además de degradar colorantes como metil naranja, colorante azul drimareno y el mordiente amarillo 1 en metabolitos no tóxicos resultando de manera consiguiente la mejora de la calidad de aguas residuales (Yanshun Kang, 2018), en otros estudios también se evaluó la eficiencia de *Aspergillus sp.* en procesos de bioacumulación para el tratamiento y eliminación del colorante Reactivo Black - 5 en los efluentes producidos por las industrias textiles. Además se estudió la actividad

efectiva de *Aspergillus sp.* como biofloculante para su posterior aplicación en procesos de potabilización de aguas de origen superficial y del tratamiento de aguas servidas domésticas, industriales y de la minería (Shengyan Pu, 2018). Entre otras de sus aplicaciones más interesantes se reportó que *Aspergillus terreus* fue capaz de degradar el 98.5% de naftalina y el 91% de antraceno en modelos de suelo, asociando este tratamiento a su producción elevada de enzimas ligninolíticas (Ali, Khalil, et al., 2012) (Srinu A, 2018). La aplicación de estas enzimas ligninolíticas también se vio implicada en el tratamiento de suelos contaminados con Diesel (Idowu et al 2018) y el potencial uso de consorcios fúngicos como agentes activos de biorremediación se ha visto que pueden ser útiles en el tratamiento del petróleo (Idowu, et al., 2017), además de degradar PVA, almidón y glicerol (Jecu L., et al. 2010). También se ha estudiado la efectividad de la aplicación de *Aspergillus* en consorcios microbianos, aumentando de esta manera la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo (Fernández L. et al 2011) (Escalante E. et al 2005).

Las enzimas ligninolíticas son la clave del metabolismo fúngico en la biorremediación, al ser extracelulares permiten a los hongos tolerar altas concentraciones de sustratos tóxicos (Mariem Ellouze, 2016). Este conocimiento podría transformarse en procesos confiables de tratamiento de residuos sólidos. Destacándose que las enzimas liberadas al medio por microorganismos fúngicos por medio de su crecimiento hifal pueden difundirse fácilmente al no estar vinculadas a la célula y por tanto pueden alcanzar, penetrar y degradar el suelo contaminado con hidrocarburos (Millan, 2015) (Venkatesagowda B. et al 2012).

### 10.1.1. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática oxidorreductasa de *Bjerkandera sp.* y *Aspergillus sp.* en condiciones modificadas de cultivo en medio líquido ASCA

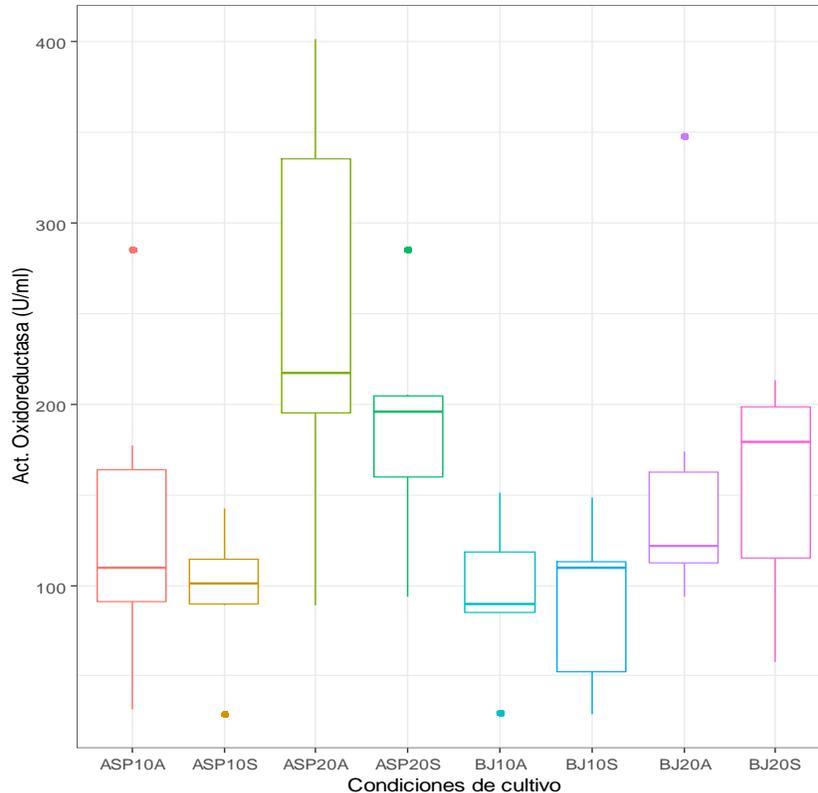
Una vez seleccionadas las cepas fúngicas *Bjerkandera sp.* BOL 13 y *Aspergillus sp.* YL12 que presentaron actividad oxidorreductasa en medio ABTS y crecieron en medio sólido con ASCA, se procedió a determinar cuantitativamente la actividad oxidorreductasa total. Para ello se evaluó la actividad enzimática oxidorreductasa de las mencionadas cepas fúngicas en cultivos en batch como modo de operación, utilizando medios base de cultivo líquido con la adición ya sea de 10 o 20% de la mezcla de aserrín y cascarilla de arroz (1:1) y sometidos a las siguientes condiciones de cultivo: a) Incubación a 37 °C sin agitación y humedad relativa del 9%, b) Sin agitación e incubación a 37 °C y humedad relativa del 60% y finalmente, c) Con agitación a 100 rpm e incubación a 37 °C . La actividad enzimática oxidorreductasa determinada en las condiciones de cultivo con ambas cepas fúngicas mostró un grado variable de oxidación de ABTS, en 10 días de incubación (Anexo 3). La tabla 8 muestra los resultados de las determinaciones cuantitativas de la actividad enzimática oxidorreductasa luego del ensayo enzimático con ABTS para cada una de las condiciones de incubación empleadas.

**Tabla 8. Actividad enzimática oxidorreductasa (UI/mL) de las cepas fúngicas BOL 13 y YL12 bajo diferentes condiciones de cultivo**

		Actividad Oxidorreductasa UI/mL	
		Cepas fúngicas	
Medio liquido de cultivo base + ASCA (%)	Condiciones de cultivo a 37 °C	BOL 13	YL12
<b>10</b>	<i>sin agitación y humedad 9%</i>	300	226
	<i>sin agitación y humedad 60%</i>	256	321
	<i>agitación a 100rpm</i>	325	407
<b>20</b>	<i>sin agitación y humedad 9%</i>	247	479
	<i>sin agitación y humedad 60%</i>	337	336
	<i>agitación a 100rpm</i>	554	554

ASCA = aserrín y cascarilla de arroz (1:1)

Estableciendo un análisis de ANOVA en los resultados de los tratamientos efectuados (Fig.2) se observa que la cepa de *Aspergillus sp.* crecida en 20% de ASCA en condiciones de agitación a 100 rpm muestra la mayor actividad oxidorreductasa comparada con los otros tratamientos.



**Figura 3. Actividad enzimática oxidoreductasa determinada en función a la oxidación del ABTS. Dos cepas fúngicas fueron inoculadas en el medio basal conteniendo ya sea 10 o 20% de aserrín/cascarilla de arroz e incubadas a 37 °C en condiciones de agitación o no a 100 rpm, con humedad de 19 % (humedad relativa del ambiente) o 60% (humedad controlada).**

La codificación refiere: *ASP10A*=*Aspergillus sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *ASP10S* *Aspergillus sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, *ASP20A* *Aspergillus sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *ASP20S* *Aspergillus sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, *BJ10A* *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *BJ10S* *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, *BJ20A* *Bjerkandera sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *BJ20S* *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%.

La actividad enzimática oxidoreductasa incrementó significativamente en función a la cantidad de sustrato presente en el cultivo para ambas cepas, concluyéndose que a mayor cantidad de sustrato existe una mayor saturación de la o las enzimas oxidoreductasas. Las enzimas oxidoreductasas extracelulares incluyen Lignino peroxidasa (LiP), Manganese peroxidasa (MnP) y Lacasa entre otras que son generalmente producidas por microorganismos degradadores de la madera (Balaji V. et al., 2013) cuya finalidad es la deslignificación del material vegetal (proceso de ablandamiento) para poder tener acceso a

la matriz de celulosa y hemicelulosa utilizando los extremos de las hifas fúngicas van produciendo enzimas activas para degradar la lignina y convertir la celulosa en azúcares más simples como asimilables para la cepa fúngica. el hongo se disemina de una partícula a otra mediante la ramificación y expansión hifal, por el consumo continuo del componente insoluble en fermentación sólida, dando como resultado mayor crecimiento de hongos (Osma JF., et al 2011). De tal forma que las enzimas oxidorreductasas se producen en el metabolismo secundario y las enzimas glucolíticas son sintetizadas a la par del crecimiento microbiano para facilitar el mismo por la liberación de azúcares menos complejos.

La agitación es determinante en cuanto se refiere a la actividad enzimática oxidorreductasa, debido a que en este grupo de enzimas se encuentran las oxidasas, peroxidasas y oxigenasas que son dependientes de aceptores de electrones como el oxígeno. Además, se ha asociado estas enzimas secretadas por Deutoromicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos con la degradación de los componentes de la pared celular de sustratos (Ángel T. Martínez, et al. 2005). Entre las condiciones afectadas por la contaminación por hidrocarburos se evidencio la disminución de la cantidad de oxígeno debido a que los espacios del suelo se llenan con hidrocarburo (Restrepo R., 2002) evitando de esta manera el intercambio de oxígeno y dificultando la biorremediación. Se ha demostrado que las cepas fúngicas disminuyen su producción enzimática oxidorreductasa significativamente en materia cruda donde los niveles de oxígeno son bajos o ausentes como el suelo. Sin embargo, existen reportes de que en condiciones microaeróbicas los hongos del suelo aún tienen la capacidad de transformar hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto y bajo peso molecular (Fernández L. et al. 2011). De esta manera la actividad de alguna de estas enzimas se estaría viendo favorecida por la transferencia de oxígeno en el medio a través de la agitación.

Los resultados muestran que existe diferencia significativa en la actividad enzimática oxidorreductasa ( $p > 0.01740$ ) (ver análisis de ANOVA Anexo 4), determinando que las características químicas del medio de cultivo 10 o 20% de la mezcla de aserrín y cascarilla de arroz (1:1), sumada a las condiciones de cultivo: agitación a 100 rpm; favorecieron esta actividad enzimática. Verificándose de esta manera que el empleo de cascarilla de arroz y aserrín como material lignocelulósico induce la actividad oxidorreductasa en estas cepas. Reportes anteriores también concluyen que la utilización de cascarilla de arroz y/o aserrín incrementan la actividad ligninolítica de hongos de la roya blanca (Teck A. 2013) (N. Pozdnyakova, et al. 2018) (Usnayo, Pamela. 2013). De igual manera, los hongos de la roya blanca involucrados en la biorremediación o tratamiento de contaminantes orgánicos, secretan enzimas peroxidasas involucradas en la degradación de lignina, que son capaces de oxidar una amplia gama de contaminantes orgánicos aromáticos altamente recalcitrantes, cuya estructura compleja se asemeja a esta (Viral C., et al. 2004).

En procesos de micorremediación, los hongos pueden alcanzar contaminantes en el suelo fácilmente en comparación a otros organismos, debido a su crecimiento hifal. En el presente estudio las cepas fúngicas:

- 1) *Bjerkandera sp.* presentó menor actividad enzimática oxidorreductasa, siendo esta afectada posiblemente por factores fisicoquímicos durante su desarrollo (temperatura, tiempo de incubación, adaptación limitada a un ambiente carente de los nutrientes necesarios para el desarrollo hifal), mencionado también por (Gill P.K. et al. 2003) además, de involucrar posibles factores en el proceso de reactivación mediante subcultivo y transferencia en serie utilizados durante el transcurso de los años de estudio de esta, pudieron afectar la actividad enzimática,

debido a el tiempo de preservación, las condiciones de preservación fúngica, siendo así que las condiciones de cultivo y subcultivo tuvieron repercusión en la fisiología fúngica y actividad de las enzimas oxidorreductasas. El efecto de subcultivo sobre la producción enzimática fue también mencionado por (Ansari M.A., et al. 2011). Generalmente al elegir estudiar los aspectos en el metabolismo de HAP por enzimas de cepas fúngicas de la pudrición blanca, en ocasiones se dificulta reproducir y comparar los datos de actividad enzimática ya publicados en la literatura debido a que esta depende en cierta medida también de la metodología de laboratorio.

- 2) *Aspergillus sp.* que es un hongo de la roya blanda, presentó una actividad oxidorreductasa mayor que *Bjerkandera sp.*, por lo que fue seleccionada para establecer los posteriores experimentos.

Los hongos de la roya blanda como *Aspergillus* y *Neurospora*, presentan potencialmente actividad oxidorreductasa, pobremente descrita puesto que aún se ignora si es que el mecanismo de estas enzimas es similar al de las enzimas ligninolíticas producidas por los hongos de la roya blanca (Andlar Martina, et al. 2018).

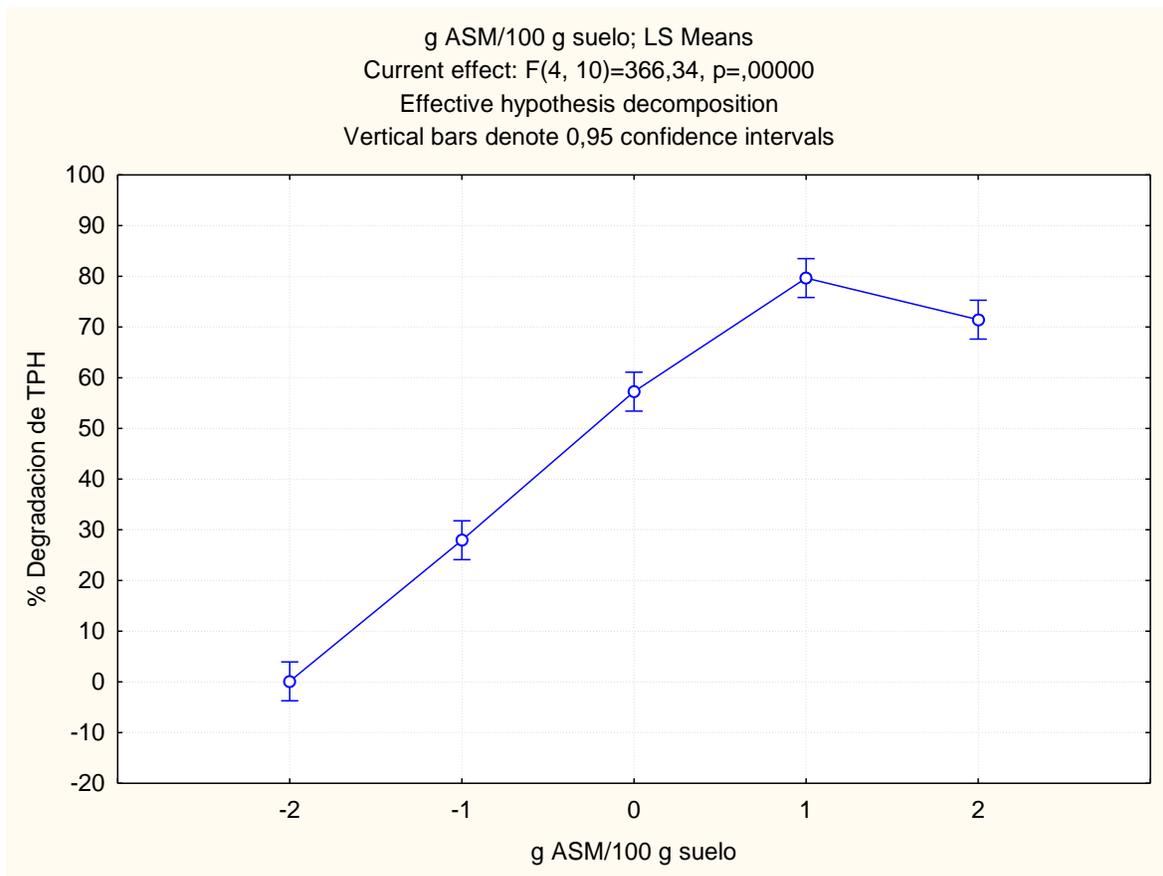
## 10.2.Micorremediación de suelos contaminados con Aceite Sucio de Motor (ASM)

### 10.2.1. Determinación de TPH en suelos contaminados con ASM y tratados con *Aspergillus*

En este estudio se evaluaron suelos contaminados con diferentes concentraciones de aceite sucio de motor (ASM) que además contenían una proporción de 20% de aserrín y cascarilla

de arroz (relación 1:1) y fueron inoculados con *Aspergillus sp.* La figura 4 muestra el porcentaje de degradación de Hidrocarburos policíclicos totales (TPH) en función a la cantidad en gramos de ASM por cada 100 gramos de suelo (g ASM /100 g suelo) luego del establecimiento de cultivos bióticos (tratamiento con *Aspergillus sp.*).

Los porcentajes de degradación pueden reflejar sólo la degradación fúngica de TPH sin embargo, la inclusión de controles abióticos por cada concentración ensayada de aceite sucio de motor (tratamiento sin la adición de *Aspergillus sp.*), podría facilitar el discernimiento de que porcentaje de degradación de TPH podría ser debida a factores abióticos. Los tratamientos establecidos no contemplaron la inclusión de controles abióticos.



**Figura 4. Porcentaje de degradación de TPH luego de 6 meses de tratamiento con *Aspergillus spp.* cepa YL12, en función a la cantidad de aceite sucio de motor añadido a 100 g suelo (g ASM/100 g suelo).** Categorización de concentraciones (g ASM/100 g suelo): -2= 0, -1= 4.6, 0= 9.2, +1= 15.5, +2= 19.1.

Se estableció una prueba de one way ANOVA (**Anexo 5**) demostrando que el tratamiento con *Aspergillus sp.* disminuye significativamente la cantidad de TPH presentes en el suelo contaminado con ASM ( $p \leq 0.0000$ ).

En la figura 4, se evidencia hasta un 80 % de degradación de los TPH cuando se estableció el tratamiento de 100 g de suelo conteniendo 15.5 g de aceite y habiendo sido inoculado con la cepa YL12 *Aspergillus sp.*, luego de seis meses de tratamiento. Estos hallazgos también son concordantes con reportes previos donde cepas de hongos filamentosos en particular *Aspergillus* son capaces de degradar un amplio rango de compuestos hidrocarbonados debido a la síntesis de enzimas (Singh H. 2006) (Kannangara S, 2016) (Peng R., et al.2008). De igual manera, (Thenmozhi R. et al. 2013) menciona la posibilidad de que gracias a la liberación de enzimas extracelulares y ácidos producidos por cepas de hongos filamentosos de las divisiones Ascomycota y Zigomicota, a mencionar *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.*, se produce la desestabilización y desmantelamiento de largas cadenas hidrocarbonadas, convirtiendo así el petróleo en formas más simples o productos que pueden ser absorbidos o empleados para el crecimiento y nutrición de los hongos. La capacidad de degradación de TPH en el lapso de un mes reportada por Thenmozhi fue de 40.5% y 51.6%. Sin embargo, en la literatura también se reportan porcentajes de degradación de TPH de hasta 99% (Adeniyi A. Sanyaotu, et al. 2018), luego de 6 meses de tratamiento de suelos contaminados con ASM (2 L/m<sup>2</sup> suelo) e inoculados con la cepa JQ675305.1 *Aspergillus oryzae* (micorremediación).

Tomando en cuenta que los hongos filamentosos pueden desarrollar crecimiento hifal extensivo, permitiéndole de esta manera penetrar el suelo contaminado con ASM, ofrece un potencial eficiente de micorremediación de suelos (Rhodes, 2014) (Singh M., et al. 2015). En este sentido, cepas de hongos pertenecientes a los generos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphotheca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Graphium* *Cunninghamella* y *Achremonium* han sido reportados por su capacidad de degradación de contaminantes persistentes y recalcitrantes incluida una amplia gama de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP (Adnan B. Al-Hawash, 2018) (Singh H., 2006) (Silva I., 2009).

Los resultados obtenidos se suman a la evidencia que demuestra la capacidad de *Aspergillus sp.* para micorremediar un ambiente contaminado con hidrocarburos de petróleo con la comparación de los resultados para los niveles iniciales y finales de TPH en el suelo con exclusión de cualquier otro factor, el grado de reducción alcanzado en el nivel final de TPH en el suelo se puede aducir directamente a la acción de *Aspergillus sp.* que se agregó al suelo contaminado por ASM. Este resultado concuerda con los hallazgos de (Thangarajan R. et al 2011) donde la reducción en el nivel de TPH como resultado de la bioaumentación de un suelo contaminado con hidrocarburos con el hongo *Scedosporium apiospermum* produjo de manera consistente un valor de TPH más bajo desde el día 0 al día 35 que los suelos naturalmente atenuados.

#### 10.2.2. Variaciones de las actividades ligninolíticas y factores

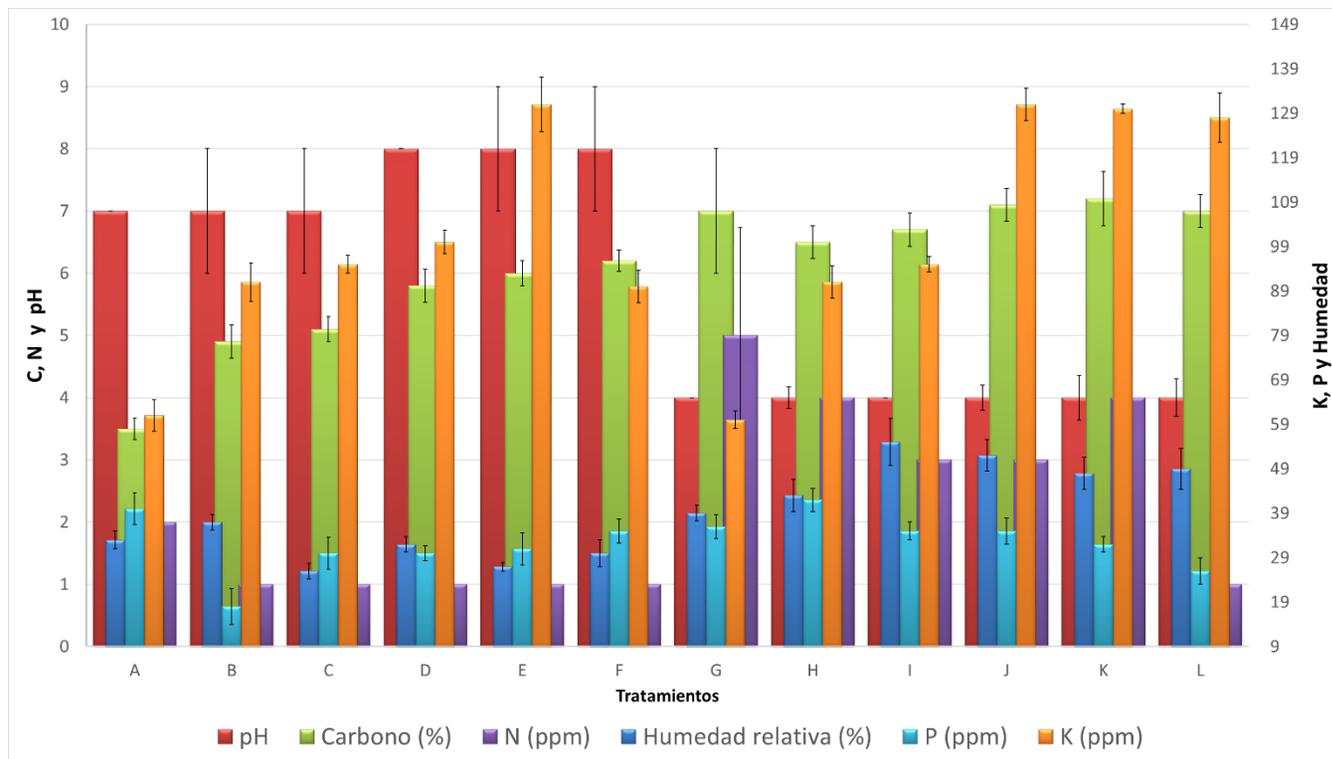
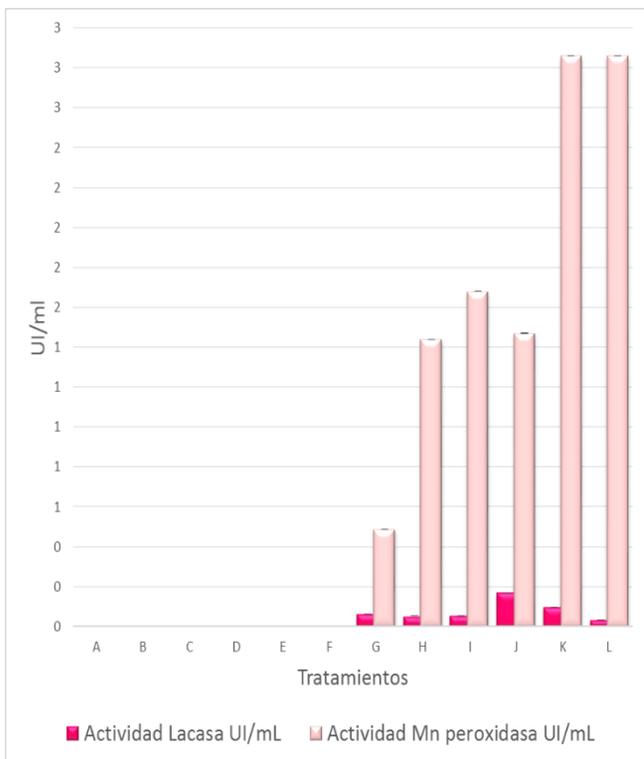
##### químicos y físicos del suelo debidas a la micorremediación

En el presente estudio, se evaluó el potencial de micorremediación de la cepa YL12 de *Aspergillus sp.* en cuanto se refiere al incremento de ciertos macro y micro nutrientes en el

suelo. La Tabla 9 y Figura 5, muestran las actividades enzimáticas Lacasa y Manganese peroxidasa además de los factores químicos y físicos han sufrido modificaciones como consecuencia del tratamiento efectuado con la cepa YL12 de *Aspergillus sp.* y también como consecuencia de la contaminación con aceite sucio de motor en distintas concentraciones.

**Tabla 9. Actividades enzimáticas ligninolíticas y Factores químicos y físicos establecidos luego de 30 días de tratamiento del suelo contaminado con ASM e inoculado con la cepa YL12 de *Aspergillus sp.***

Condiciones de suelo a tratar	Actividad ligninolítica		Factores químicos y físicos establecidos luego de 30 días de tratamiento del suelo contaminado con ASM, empleando la cepa YL12 <i>Aspergillus sp.</i>					
	Actividad Lacasa UI/mL	Actividad Manganese peroxidasa UI/mL	Humedad relativa (%)	pH	%C Orgánico	N (mg/L)	P (ppm)	K (ppm)
Suelo	0	0	33 ± 2	7 ± 0	7 ± 0,17	2 ± 0,50	40 ± 3,61	61 ± 3,61
Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo	0	0	37 ± 1,73	7 ± 1	6,5 ± 0,26	1 ± 0,36	18 ± 4	91 ± 4,36
Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo	0	0	26 ± 1,73	7 ± 1	6,7 ± 0,2	1 ± 0	30 ± 3,61	95 ± 2
Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo	0	0	32 ± 1,73	8 ± 0	7,1 ± 0,26	1 ± 0,36	30 ± 1,73	100 ± 2,65
Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo	0	0	27 ± 1	8 ± 1	7,2 ± 0,20	1 ± 0,53	31 ± 3,61	131 ± 6,08
Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo	0	0	30 ± 3	8 ± 1	7 ± 0,17	1 ± 0,26	35 ± 2,65	90 ± 3,61
Suelo + <i>Aspergillus sp.</i>	0,063 ± 8,98E-6	0,5 ± 6,06E-06	39 ± 1,73	4 ± 0	6,2 ± 1	5 ± 1,73	36 ± 2,65	60 ± 2
Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo + <i>Aspergillus sp.</i>	0,053 ± 6,5E	1,4 ± 2,9E-04	43 ± 3,61	4 ± 0,17	6,1 ± 0,26	4 ± 1	42 ± 2,65	91 ± 3,61
Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo + <i>Aspergillus sp.</i>	0,056 ± 2,6E-05	1,7 ± 3,5E04	55 ± 5,29	4 ± 0	6 ± 0,26	3 ± 1,73	35 ± 2	95 ± 1,73
Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo + <i>Aspergillus sp.</i>	0,17 ± 1,5E-05	1,5 ± 7,7E-04	52 ± 3,61	4 ± 0,2	5,8 ± 0,26	3 ± 1	35 ± 3	131 ± 3,61
Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo + <i>Aspergillus sp.</i>	0,097 ± 1,03E-05	2,8 ± 1,2E-04	48 ± 3,61	4 ± 0,36	5,9 ± 0,44	4 ± 1	32 ± 1,73	130 ± 1
Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo + <i>Aspergillus sp.</i>	0,034 ± 2,8E-05	2,6 ± 2,9E-04	49 ± 4,58	4 ± 0,3	6,2 ± 0,26	1 ± 0	26 ± 3	128 ± 5,57



I

II

**Figura 5. (I) Actividades enzimáticas ligninolíticas: Lacasa y Mn Peroxidasa y (II) Factores químicos y físicos establecidos luego de 30 días de tratamiento del suelo contaminado con ASM e inoculado con la cepa YL12 de *Aspergillus sp.***

**Tratamientos:** A. Suelo, B. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo, C. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo, D. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo, E. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo, F. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo, G. Suelo + *Aspergillus*, H. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, I. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, J. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, K. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, L. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*.

1. Solo se evidencian las enzimas en los tratamientos con hongo y de ellas, la actividad Manganese peroxidasa muestra un incremento a mayores concentraciones de ASM como contaminante del suelo. Se puede evidenciar que el tratamiento del suelo contaminado con 15,5 g ASM/100 g suelo y tratado con *Aspergillus sp.* existe una ligera disminución de la actividad Manganese peroxidasa, sin embargo la actividad lacasa incrementa hasta 0,171 UI/mL siendo estos valores menores a los reportado por (Balaji V. et al 2013) donde se evidencia una actividad máxima lacasa de 73 U/mL por *Aspergillus fumigatus*. deduciendo de esta manera que la actividad lacasa varía entre las especies de *Aspergillus* como también de acuerdo a la fuente de carbono disponible en el medio.
2. Se observa que las concentraciones de Carbono orgánico y Nitrógeno total incrementan en todos aquellos tratamientos con hongos y esto podría ser debido a la presencia de enzimas extracelulares entre ellas las oxidorreductasas determinadas. Lo cual podría determinar que las enzimas Manganese peroxidasa y Lacasa estarían involucradas en el proceso de micorremediación. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de la influencia de otras enzimas ligninolíticas como la Lignino peroxidasa y/o Versátil peroxidasa entre otras, o bien enzimas hidrolíticas que no fueron determinadas en el presente estudio.

Para determinar si es adecuado un determinado tratamiento biológico se necesita evaluar el comportamiento de las poblaciones microbianas, la degradación del contaminante por estos y las condiciones medioambientales más favorables para el sistema creado. La biodegradación se lleva a cabo si existe población microbiana adaptada al sustrato en el que se desarrolla, es decir, si posee las enzimas que catalizan las reacciones de degradación de los hidrocarburos. La disponibilidad de nitrógeno y fósforo en el medio es un factor

limitante en la degradación microbiana de hidrocarburos (Valencia, 2016). Se ha demostrado que las fuentes de nitrógeno juegan un papel importante en la síntesis de lacasa (Osma, 2007). Se ha reportado una mayor actividad de lacasa utilizando los medios de cultivo ricos en nitrógeno, en lugar de los medios de cultivo con nitrógeno limitado que son generalmente empleados para la inducción de las oxidorreductasas (Kunamneni, 2007).

3. Se ha demostrado que las principales enzimas en el sistema de lignina incluyendo peroxidasas de lignina, manganeso peroxidasa dependiente, oxidasas fenol (lacasas y tirosinasas) y enzimas  $H_2O_2$  productoras, degradan HAPs (Janusz G. et al., 2017). Estos criterios indican que el papel importante de los hongos en la biorremediación de medio ambiente contaminado por el hombre.

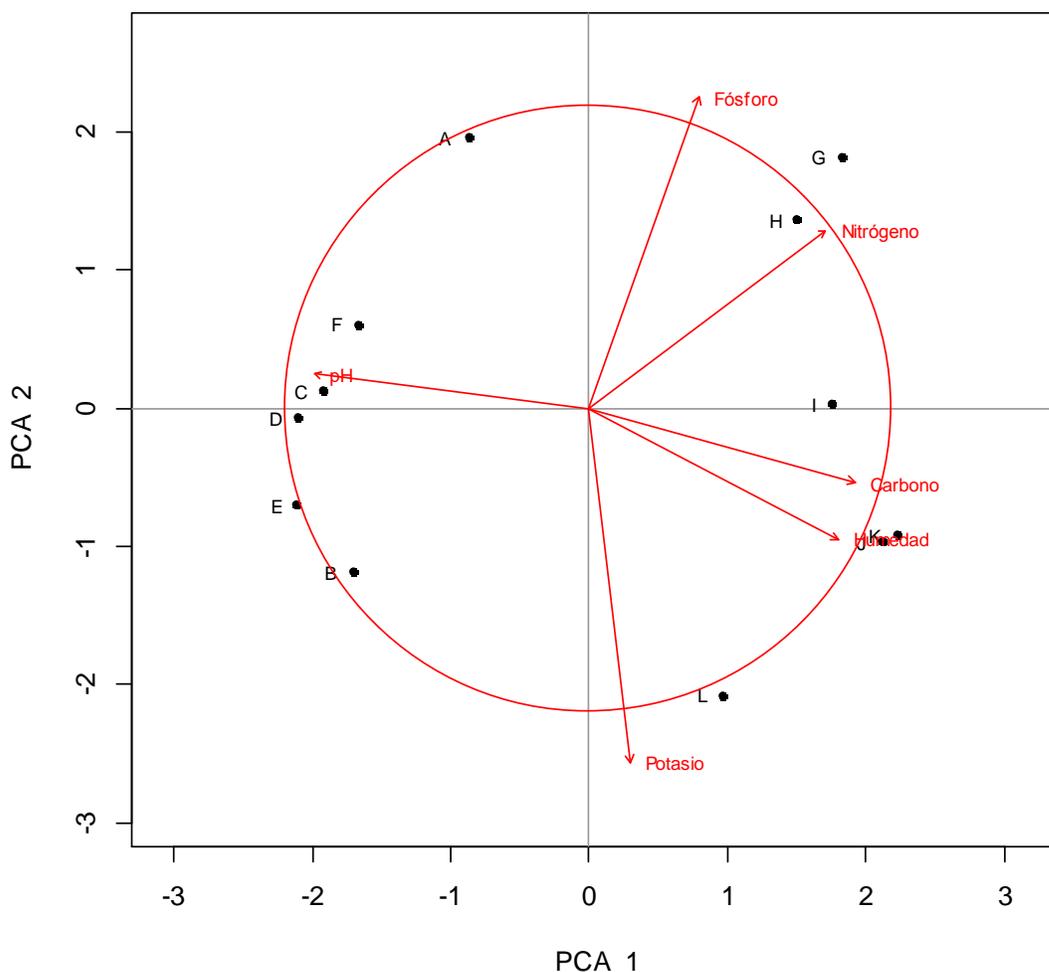
En estudios realizados por (Dhakar et al 2015) se ha reconocido el predominio y la contribución de hongos ascomicetos para diversos procesos biológicos en ambientes. Las enzimas ligninolíticas, un grupo de enzimas altamente versátiles, son conocidas por su papel en la degradación del complejo y la lignina de polímero recalcitrante. La actividad ligninolítica se asocia con tres enzimas principales, a saber, la peroxidasa de lignina (LiP), la peroxidasa de manganeso (MnP) y las peroxidasas de lacasa tienen una estructura hemo y requieren  $H_2O_2$  para la catálisis, mientras que el LiP tiene la capacidad de oxidar estructuras no fenólicas relacionadas con la lignina. Además, MnP facilita la descomposición al generar radicales fenoxi a partir de anillos fenólicos.

La presencia y actividad de estas enzimas extracelulares son altamente dependientes de manganeso y nitrógeno en el medio, y estos materiales bioquímicos pueden ser activados por nitrógeno del medio con el fin de explorar si la degradación fue

afectado por MnP y / o LiP, se utilizó medio limitado de nitrógeno en el cultivo de *A. fumigatus*.

Con la finalidad de determinar las posibles variaciones de minerales nutrientes tales como Carbono orgánico, Nitrógeno, Potasio y Fosforo además de factores físicos como ser pH y Humedad relativa, debido al efecto ya sea de la contaminación del suelo con ASM o al efecto de la micorremediación de suelos contaminados con ASM, se realizó un análisis de componentes principales (PCA – Figura 6-Anexo 6) de los resultados mostrados en la gráfica II de la figura 5, estableciendo previamente una estandarización de variables (Gotelli & Ellison, 2004).

### PCA biplot - Scaling 1



**Figura 6. Análisis de Componentes Principales (C, N, P, K, pH y Humedad relativa) en función a los tratamientos de suelo contaminado con ASM. Tratamientos: A. Suelo, B. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo, C. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo, D. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo, E. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo, F. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo. G. Suelo + *Aspergillus*, H. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, I. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, J. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, K. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, L. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*.**

De acuerdo al análisis efectuado, las variables que contribuyen más a la variación y por lo tanto las más importantes son: Fósforo y Potasio (sus vectores están fuera del círculo de contribución de equilibrio) (Borcard G. et al 2011).

Los suelos con y sin tratamiento se separan claramente a lo largo del Componente Principal 1 (PCA1) que está correlacionado positivamente con: Carbono, Nitrógeno, Fosforo, Potasio, humedad relativa, presente en el suelo y negativamente con el pH del suelo. Es decir, el tratamiento con *Aspergillus sp.* incremento las concentraciones de Carbono, Nitrógeno, Fosforo, Potasio y la humedad relativa, mientras que el pH disminuyo de 7 a 4.

Los suelos tratados con *Aspergillus sp.* se separan de acuerdo a la cantidad de contaminante a lo largo del Componente Principal 2 (PCA2) que está correlacionado de manera positiva con la cantidad de Fósforo y Nitrógeno y de manera negativa con la humedad relativa y las cantidades de Potasio y Carbono. A menor cantidad de ASM se evidencio mayor cantidad de Fósforo y a mayor cantidad de contaminante se evidencio mayor cantidad de Potasio.

#### ***Variaciones en las concentraciones de Carbono, Nitrógeno, Fosforo y Potasio***

Se ha visto que el efecto de los nutrientes en el suelo y su variación tiene influencia de manera importante en la micorremediación como también sobre las características de un suelo fértil. Esta característica tambien fue reportada por (Abioye, 2012) donde se evidencia que la micorremediación puede estar limitada por nutrientes como fosforo y nitrógeno

#### ***Carbono***

De acuerdo al análisis de PCA el carbono orgánico incrementa en el suelo tratado con *Aspergillus sp.*, este incremento de carbono orgánico también fue descrito por (Lesser I., 1995), afirmando que el 75% del carbono del petróleo es oxidable además que gran parte de los componentes de ASM generalmente son rápidamente removidos por cepas fúngicas si las condiciones son óptimas, sin embargo, todos los valores con el tratamiento con *Aspergillus sp.* no mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) dentro de los tratamientos,

pero mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en comparación con el control. no ha determinado un incremento progresivo de las concentraciones de carbono a lo largo del estudio.

En un tiempo inicial se observa el incremento de carbono orgánico tras la adición de las diferentes concentraciones de ASM en aquellos suelos sin *Aspergillus sp.* (Figura 6), siendo el porcentaje de carbono orgánico proporcionalmente directo al incremento de ASM añadido al suelo generando a mayores concentraciones efectos de toxicidad y efecto sobre los nutrientes del suelo, que repercuten en el equilibrio del ecosistema, tal evidencia fue reportada por (Tyagi M., 2011) quien describe que los nutrientes como fósforo y nitrógeno empleados por los microorganismos para su desarrollo generalmente se limitan en el medio por el exceso de carbono generado en el derrame de hidrocarburos, de manera semejante de acuerdo a los datos de PCA en el presente estudio se observa que a una concentración de 29,1% de ASM la concentración de nitrógeno y fosforo se ven disminuidas en comparación a una concentración de 4,6% de ASM de acuerdo a estos se podría tener presente la influencia de la concentración del carbono orgánico sobre la concentración de nitrógeno y fosforo disponible en el medio para el desarrollo de *Aspergillus sp.* y su micorremediación subsecuente. Además, se considera que la diferencia obtenida en el presente estudio del contenido de carbono en las categorías de tratamiento y el control podrían ser un resultado del carbono residual presente tras la degradación.

Posteriormente de realizado el tratamiento con la cepa YL12 *Aspergillus sp.* se observa el incremento del porcentaje de carbono orgánico en todos los suelos contaminados a con ASM, siendo notable el incremento del carbono en las concentraciones de 15,5%, 21,8% y 29,1%.

El incremento de carbono tras el tratamiento se debe a la acumulación de cadenas carbonadas producto de la oxidación y ruptura de los anillos aromáticos del Aceite Sucio de Motor llevada a cabo por las enzimas oxidorreductasa.

### ***Nitrógeno***

En el análisis de los niveles de nitrógeno presente en el suelo previamente a la micorremediación se observa la disminución del mismo luego de la adición de ASM y esta característica se repite con todas las concentraciones de ASM añadidas al suelo (Figura 6), como anteriormente se mencionó la limitación de nitrógeno se ve influenciada por la mayor concentración de carbono en el medio. La deficiencia en el suministro de nitrógeno es un obstáculo importante en la capacidad de un microorganismo para degradar activamente los hidrocarburos del petróleo (Jain P. et al, 2001).

Posteriormente del tratamiento por *Aspergillus sp.* se observa el incremento de nitrógeno en todos los suelos contaminados con ASM a excepción de la concentración de 29,1% de ASM, donde se observa una concentración semejante a la concentración inicial, posiblemente debida a la baja influencia de *Aspergillus sp.* sobre el suelo contaminado y la inhibición de su crecimiento por la toxicidad del medio. El incremento de nitrógeno tras la micorremediación fue también reportado por (Adeyini A. & Sanyaotu, A. et al 2018) donde se evidencia el aumento significativo en la cantidad de nitrógeno total en el suelo tras la adición de *Aspergillus oryzae* a suelos contaminados por SEO (a los 3 y 6 meses), de 0.07 a 0.11 y 0.12%. El incremento en las concentraciones de nitrógeno es subsecuente a la actividad enzimática, la cantidad de enzimas producidas se suman a la cantidad ya presente de nitrógeno en los suelos pues el nitrógeno es un requisito esencial para todas las formas de vida además de ser un componente de los aminoácidos que sintetizan proteínas. Las

enzimas, microorganismos, hormonas, tejidos humanos y animales están compuestos principalmente de proteínas (Adams G. et al 2014).

El incremento de nitrógeno en un suelo con 0% ASM puede deberse a la acumulación de nitrógeno orgánico por lisis celular debido al tiempo de desarrollo por *Aspergillus sp.* en suelos con nutrientes limitados que provocan estrés fúngico y la posterior formación de esporas como defensa y autopreservación o lisis celular.

### ***Potasio***

La concentración de potasio en los suelos contaminados con ASM no se vio alterada en concentraciones de 0 %, 4,6 % y 9,8% de ASM sin embargo, se observa el incremento de potasio en porcentajes de 15,5 % y 29,1% de ASM.

El potasio generalmente cumple el rol como cofactor en algunos sistemas enzimáticos, además está involucrado en el metabolismo de los carbohidratos y es importante en el mantenimiento del balance iónico de los hongos como regulador osmótico intracelular (Barreto, 2012).

### ***Fosforo***

La concentración de fosforo analizado en los suelos contaminados con ASM antes y después de la micorremediación, no presenta variaciones resaltantes en la micorremediación por *Aspergillus sp.*

La fuerte correlación entre TPHs, pH y porcentaje de humedad muestra la importancia de estos parámetros dentro del proceso de biodegradación. En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración que, dependiendo del tipo de hidrocarburo,

temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad de vertido pueden ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad (Arias, 2017). Asimismo, en el suelo, la adsorción inmoviliza el petróleo y disminuye su toxicidad, pero aumenta su longevidad y permanencia. A su vez, con su desplazamiento se alcanzan las aguas subterráneas, desfavoreciendo su uso para la agricultura y actividades humanas (Braibant, 2004).

### ***Humedad***

La liberación excesiva de hidrocarburos al medio y la disposición inapropiada de los residuos de petróleo en combinación con altos porcentajes de humedad y condiciones aeróbicas agilizan los procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelo. En la figura 6 se observa los porcentajes de humedad en los suelos contaminados con ASM antes y después del tratamiento con *Aspergillus sp.*, respectivamente, como se puede apreciar el porcentaje de humedad sin tratamiento oscila entre 26 a 37 % en cambio cuando se realiza la biorremediación empleando *Aspergillus sp.*, el porcentaje de humedad oscilo entre un 39 a 55 % en las diferentes concentraciones de ASM presentes en el suelo.

En cuanto a la capacidad de retención de agua y humedad, la biodegradación de hidrocarburos en ecosistemas terrestres puede ser limitada por la cantidad de agua disponible en el medio para el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Diferentes estudios realizados reportan que las tasas óptimas de biodegradación se dan cuando la saturación de agua en el suelo se encuentra en el rango de 30 a 90%, en valores menores la degradación se ve inhibida (Hains J., 1996). Además, (Wan C. et al 2012) describe que estos valores menores no llegan a proporcionar suficiente agua a la cepa fúngica, afectando el crecimiento de hongos y además el enfoque de los nutrientes. Junto con la superficie del solido que utiliza humedad y nutrientes de la película liquida, las hifas

van penetrando en las grietas y poros del sustrato insoluble para su metabolismo de esta fuente de carbono (Barrios, 2012).

## **pH**

La influencia del pH sobre la micorremediación puede verse expresada en tres niveles: Desarrollo microbiano, Influencia de la actividad enzimática y efecto sobre la biorremediación.

El potencial de hidrógeno del medio de cultivo donde crece un hongo se ha visto que tiene una influencia directa sobre éste, debido a su incidencia sobre el carácter iónico del medio que influye directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular; es decir, afecta directamente el metabolismo fúngico (Royse D. & Sanchez J. 2001).

En el presente estudio los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros fisicoquímicos (Figura 6) evidenciaron que el pH fue de 7 en suelos sin contaminación con ASM y suelos contaminados con bajas concentraciones de ASM e inoculados con la cepa YL12 *Aspergillus sp.* este pH neutro se mantuvo de igual manera hasta una concentración de 9,8 % con ASM sin embargo, en suelos contaminados a mayores concentraciones de ASM el pH incrementa hasta 8, siendo el pH ácido para el desarrollo de los hongos, para ello generalmente como alternativa se encuentra el modificar esta condición a una requerida por el microorganismo, sin embargo la aplicación del ajuste de pH en grandes áreas contaminadas genera un mayor costo en la biorremediación, por ello siguiendo un modelo análogo de tratamiento *ex situ* en el presente estudio no se realiza esta modificación de pH,

resultando aun así positivo el desarrollo fúngico evidenciado por la adaptación de *Aspergillus sp.* sobre estos suelos contaminados

Posteriormente en los suelos contaminados con ASM y tratados con *Aspergillus sp.*, el pH presento una disminución hasta un valor de 4 en todos los tratamientos (figura 6) debiendo esta disminución de pH al desarrollo fúngico sobre el medio, también descrito por (Royse D. et al 2001) donde se reporta que las fuentes de nitrógeno producen cambios importantes en el valor del pH del medio, de tal manera que las sales de amonio ocasionan que el medio en el que crece una cepa de *Pleurotus* se acidifique en un rango de 4 a 6. De igual manera se reporta este fenómeno por (Idowu F., 2018), quien menciona que los metabolitos ácidos producidos por los microorganismos podrían haber sido responsables de la reducción del pH en el aceite de diesel que se encuentra en un suelo en comparación con el suelo no contaminado.

Además, en el presente estudio se ha evidenciado la influencia del pH sobre la actividad enzimática *Aspergillus sp* por las enzimas ligninolíticas sobre los componentes orgánicos del aceite sucio de motor también reportado por (Sáez J. et al., 2015) quien describe que la influencia del pH varía de 3 a 8 sobre la actividad enzimática debido a que la oxidación de  $Mn^{+2}$  es óptimo a pH 5, mientras que para los compuestos aromáticos y colorantes el pH es de 3.

Por otra parte (Boonchan B. et al 2000) y (Joanne L. et al 2008), reportaron que el pH óptimo para la biorremediación se encuentra en un rango de 6.0 y 8.9, considerando que los cambios en los niveles iniciales de pH podrían ser el resultado de la liberación de productos intermedios ácidos y alcalinos además productos finales durante la biodegradación de hidrocarburos, lo que tiene un efecto sobre el pH.

La influencia de la micorremediación sobre los nutrientes del suelo en el presente estudio se correlaciona con estudios realizados en el trópico donde los géneros *Aspergillus*, están directamente implicados en los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (Beare, Reddy, & Srivastava., 1997) (Bastias, et al., 2009) además se ha comprobado por (Adeniyi A. Sanyaotu, 2018) que la contaminación de suelos por petróleo provoca la acumulación de elementos esenciales (carbono orgánico, fósforo, calcio, magnesio) en el suelo y su eventual translocación en los tejidos de las plantas. También se ha visto que los aumentos de los macronutrientes de los suelos contaminadas por ASM que tenían *Aspergillus sp.* agregado, pueden ser atribuibles a los grandes cambios en el potencial redox (oxidación y reducción) de los suelos contaminados con hidrocarburos, como se informó por primera vez por (Adams y Ellis 1960).

Esta evidencia probablemente explica la tendencia observada en los resultados obtenidos en este trabajo donde después de la línea de base obtenida, hubo un aumento general en el nivel de todos los elementos que se cuantificaron en los suelos que fueron contaminados con ASM más allá de los suelos de control que no fueron contaminados con ASM. Según (Speight J. 1991) y (Cleves I. & Sandoval M. 2001) ellos indicaban que algunos de los factores identificados en la biorremediación de TPH son: bajo pH (<5.0), bajo porcentaje de humedad, concentración de los TPHs (fracciones de difícil degradación), estos valores se correlacionan a los obtenidos en el presente estudio. Destacándose de esta manera el papel de los hongos en el proceso de mineralización del suelo reforzando, además mediante el empleo de *Aspergillus sp.* el papel de los hongos en la humificación de los suelos también descrito por (Covino S. et al. 2010). Como también se ha logrado evidenciar la influencia positiva del sustrato ligninocelulósico sobre la micorremediación, pues este proporciona el

carbono necesario para producir compuestos celulares, productos metabólicos (CO<sub>2</sub>, agua, enzimas) para el desarrollo de *Aspergillus sp.* y la posterior degradación del carbono extra proporcionado por el ASM, por contar con el sistema enzimático requerido en la degradación y/o transformación de este tipo de sustancias descrito también por (Mendoza J., 2004) (Novotny C. et al 2000)

La concentración de carbono ideal en suelos de acuerdo a la aplicación en agricultura o equilibrio y preservación del medio ambiente es variable, en el presente trabajo se propuso la recuperación de los suelos contaminados por ASM con la finalidad de obtener suelos ideales para el cultivo de quinua, entre otros productos agrícolas a través de la micorremediación sin embargo, para derrames de petróleo de mayor escala, se necesita una combinación de esfuerzos humanos microbianos para llevar a cabo una limpieza satisfactoria en un tiempo razonable (Mendoza J., 2004).

### 10.3. Ensayo ecotoxicológico con semillas de *Chenopodium quinoa wild* de suelos biorremediados

Con la finalidad de evidenciar la toxicidad de los suelos micorremediados por el tratamiento con la cepa YL12 *Aspergillus sp.*, se evaluaron factores de ecotoxicidad mediante la siembra de *Chenopodium quinoa wild*, debido al reducido tiempo de germinación y adaptación de esta especie en zonas generalmente áridas (Suelos deficientes en la disposición de macronutrientes). (Gandarillas H. 1979), menciona que la quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es una planta originaria de la región Andina de América del Sur como también la (FAO 2011) destaca que se la cultivo en estas regiones desde hace más de 7000 años, constituyéndose en uno de los principales cultivos de grano a pesar de las condiciones drásticas en las cuales se desarrolla.

Con la finalidad de evaluar el efecto toxico de los suelos micorremediados en la tabla 10 se describen dos características morfológicas periódicas durante el proceso de desarrollo de la quinua (Germinación y desarrollo de hojas primarias) además, del porcentaje de semillas que llegaron a la formación de plantines de quinua en un periodo de evaluación de 4 meses.

**Tabla 10:** Porcentaje de germinación, hojas primarias y viabilidad de plantines en suelos contaminados con ASM antes y después del tratamiento con *Aspergillus sp.*

% de ASM	Tratamiento	% Germinación	% de hojas primarias	% de viabilidad de plantines
<b>0</b>	Sin tratamiento	100	100	80
	<i>Aspergillus sp.</i>	100	100	60
<b>4,6</b>	Sin tratamiento	0	0	0
	<i>Aspergillus sp.</i>	100	100	20
<b>9,8</b>	Sin tratamiento	0	0	0
	<i>Aspergillus sp.</i>	100	100	20
<b>15,5</b>	Sin tratamiento	0	0	0
	<i>Aspergillus sp.</i>	100	100	20
<b>21,8</b>	Sin tratamiento	0	0	0
	<i>Aspergillus sp.</i>	100	100	10
<b>29,1</b>	Sin tratamiento	0	0	0
	<i>Aspergillus sp.</i>	100	100	0

En la tabla 10 se observa el 100 % de germinación de las semillas de *Chenopodium quinoa wild* y el 100 % del desarrollo de las hojas primarias en todos los tratamientos a los 5 días de sembradas las semillas, evidenciando de tal manera que ambas características no se vieron influenciadas por la contaminación por ASM como tampoco por el tratamiento con *Aspergillus sp.*, por ello se consideró que la germinación como el desarrollo de hojas primarias de la quinua no son parámetros determinantes de la fitotoxicidad de suelos contaminados con Aceite Sucio de Motor, a pesar que (Efsun D. et al 2015) informaron que estos compuestos hidrofóbicos actúan como una barrera física que impide o reduce el

acceso de las semillas al agua y al oxígeno, en el presente estudio las concentraciones empleadas no influyeron sobre la germinación.

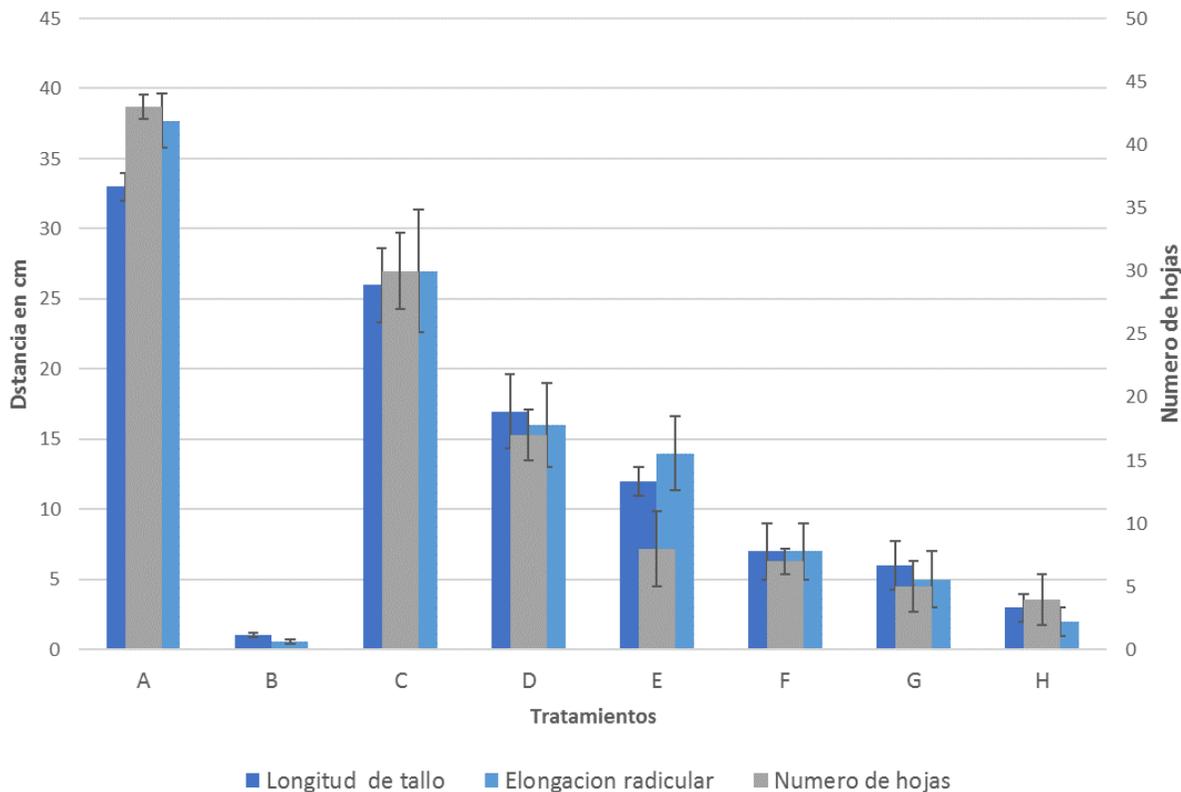
Para la determinación del porcentaje de viabilidad de los plantines de quinua se consideró como el 100 % de viabilidad al número de semillas germinadas en el tiempo inicial y al porcentaje de viabilidad de los tratamientos al número de plantines sobrevivientes luego de un lapso de 4 meses de desarrollo sobre suelos micorremediados. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se pudo evidenciar que el porcentaje de viabilidad (plantines sobrevivientes) en suelos sin contaminación con ASM y sin tratamiento fue del 80 %, mientras que la viabilidad en suelos contaminados con ASM a 4,6%, 9,8% y 15,5 % y tratados con *Aspergillus sp* fue del 20 %, a concentraciones del 21,8 % de ASM la viabilidad fue del 10 % y el desarrollo de los plantines se vio ausente en suelos a una concentración del 30 % de ASM, determinando de tal manera que la viabilidad de los plantines disminuye hasta un 60 %, además de ser inversamente proporcional a la concentración de aceite sucio de motor remanente en los suelos micorremediados. Además cabe resaltar que el desarrollo de la cepa de *Aspergillus sp*, en un medio sin la fuente de carbono en estudio (Aceite sucio de motor), motiva a la competencia por nutrientes con el plantin de quinua, considerandose un fitopatógeno en ausencia de su principal fuente de carbono el ASM.

De esta manera se evidencio la influencia del aceite sucio de motor remanente generado luego de la micorremediación sobre el desarrollo de *Chenopodium quinoa wild* además, del impacto de la contaminación con hidrocarburos de petróleo también descrito por (Mendez, Salazar, & Velasquez, 2006) quien reporta que esta contaminación ocasiona un desequilibrio ecológico de la rizosfera, de tal manera que: **1.** Cuando las concentraciones

son toxicas, los hidrocarburos del petroleo inhiben la masofauna del suelo; **2.** En casos de toxicidad aguda, se inhibe la germinacion, el rebrote de meristemas y la elongacion radicular disminuye, asi como los contenidos de clorofila y la fotosintesis. No obstante, tambien ha descrito que a bajas concentraciones, los hidrocarburos estimulan el crecimiento de los vegetales debiendo este efecto a la disponibilidad de macronutrientes generados por la biorremediacion, dicha afirmacion tambien se evidencio en el presente estudio ya que las concentraciones de macronutrientes obtenidas luego del tratamiento con *Aspergillus sp.* se asemejan a los macronutrientes presentes generalmente en cultivos de quinua. En estudios realizados en el altiplano boliviano (Sullcataca Baja, Choquenaira, Patacamaya, Cañaviri, Saitoco e Irpani) (Álvarez M. et al 2016) reporta 2,05 g/m<sup>2</sup> de nitrógeno, 96,5 ppm de fosforo y 27,89 g/m<sup>2</sup> de potasio en los suelos empleados para el cultivo de quinua, en comparacion con los resultados obtenidos en el presente estudio 3,8 g/L de nitrógeno, 34,2 ppm de fosforo y 110,83 ppm de potasio, los niveles de macronutrientes tienen relacion con los disponibles en campo, ademas (Orsag V. et al 2013) evidencia que los contenidos de nitrógeno total en la mayor parte de las parcelas con cultivo y en descanso son muy bajos (registran valores inferiores a 0,20%), de acuerdo a la clasificación empleada por Caricari (2008). De igual forma, la disminucion de fósforo disponible (ppm) en los suelos biorremediados de acuerdo a los estudios realizados por (Arce J. & Reyes P. 1996) dan cuenta que el fósforo no es un nutriente absorbido en grandes cantidades por la quinua debido a que es absorbido por la planta casi en su totalidad en las primeras fases de desarrollo, principalmente para la formación de un buen sistema radicular ademas del incremento del crecimiento vegetativo, la capacidad fotosintética de la planta; es decir determina el número de hojas, el número de semillas por inflorescencia y por lo tanto determina el potencial de rendimiento. De igual manera las concentraciones de potasio

determinadas influyen de manera positiva en el desarrollo de los plantines de quinua, pues esta absorbe potasio (K) en grandes cantidades y se puede apreciar que la mayor parte del potasio absorbido queda en el tallo (Gomez L. et al 2016).

Según estudios realizados por (Vwioto et al. 2006) la contaminación por aceite conduce a la acumulación de elementos esenciales (carbono orgánico, fósforo, calcio, magnesio) y no esenciales (magnesio, zinc, hierro, cobalto, cobre) en el suelo y su eventual translocación en los tejidos de las plantas por la influencia de las raíces de las plantas en el medio ambiente, de tal manera esta característica representa un ecosistema complejo con el potencial de acelerar la biodegradación de contaminantes orgánicos con el cultivo de *Chenopodium quinoa wild*. Por tal motivo se evaluaron características morfológicas Longitud del tallo, elongación radicular y numero de hojas (Anexo 7), que evidenciaron la influencia del aceite de motor remanente luego de la micorremediación,



**Figura 7. Características morfológicas del desarrollo de *Chenopodium quinoa wild*.** A. Suelo sin contaminación y sin *Aspergillus sp.* B. Suelo + ASM, C. Suelo + *Aspergillus*, D. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, E. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, F. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, G. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, H. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*.

En la figura 7 se detalla la longitud de los tallos de los plantines de *Chenopodium quinoa wild*, luego de 4 meses de crecimiento. La longitud del tallo fue de 33 cm en suelos sin contaminación y sin *Aspergillus sp.* comprobando la toxicidad de ASM sin tratamiento el tallo fue de 1,03 viéndose ausente el desarrollo de los plantines. En el caso de los suelos contaminados con ASM a la concentración de 0%, 4,6%, 9,8%, 15,5%, 21,8% y 29,1% y biorremediados con *Aspergillus sp.*, presentaron 26, 17, 12, 7, 6 y 3 cm de crecimiento longitudinal del tallo respectivamente, siendo evidente la similitud entre el tratamiento con *Aspergillus sp.* hasta concentraciones de 9,8% de ASM y el desarrollo de la quinua en un

suelo sin contaminación y sin tratamiento sin embargo, se evidenció que el incremento del porcentaje del ASM es inversamente proporcional a la longitud del tallo.

El efecto de los suelos remediados sobre el desarrollo del tallo fue también descrita por (Adenipekun C. et al 2013) quienes reportaron que al final de la sexta semana el diámetro del tallo fue de 2.678 mm en el suelo remediado con 0% de contaminación y 1.05 mm en el 5%, mencionando que la reducción en la circunferencia del tallo con el aumento de la concentración de aceite gastado en suelo reduce también la absorción de nutrientes por parte de las plantas.

Al finalizar los cuatro meses de prueba, el promedio de hojas de las plantas de *Chenopodium quinoa wild* (Figura 7), en suelos sin contaminación con ASM y sin *Aspergillus sp.* fue de 43 hojas en los plantines; en el caso de la micorremediación con *Aspergillus sp.*, el número de hojas fue de 30, 17, 8, 7, 5 y 4 en las diferentes concentraciones de ASM, de igual manera fue descrito por (Adenipekun C. et al 2013) quienes evidenciaron que los hongos efectuaron la remediación del suelo antes de la siembra de semilla de *C. olitorius* y en el proceso aumentó el contenido de nutrientes del suelo, mejorando la disponibilidad de nutrientes para el desarrollo foliar; también mostraron que a medida que el nivel de la contaminación aumentó en el suelo el número de hojas fue reducido de 13.50 a 0% de aceite a 4.33 a 5%, 2.33 a 10% y 2 con 15% de contaminación de petróleo al final de la sexta semana. Además, informaron que la insuficiente aireación resultante de la contaminación del petróleo en el suelo provoca pudrición del tallo, y consecuentemente la reducción del desarrollo foliar. Del mismo modo, (Adenipekun C. et al 2009) mostró que el aceite de motor gastado tiene efectos adversos en plantas de Okra, evidenciado por la reducción del número de hojas y el área

foliar de las plantas que se encontraban en suelos contaminados con aceite en comparación con el control.

(Olusola S.A. et al 2010) informaron un hallazgo similar empleando *P. pulmonarius* para la biorremediación de suelo contaminado con aceite crudo y *Amaranthus hybridus* como plantas de prueba. Los resultados evidenciaron que el área foliar en la planta de control (0%) al final de la tercera semana fue de 8.176 cm<sup>2</sup>, mientras que la de las plantas en suelo remediado fue de 10.910 cm<sup>2</sup>.

De igual manera se evidenció el efecto de la micorremediación con *Aspergillus sp.*, sobre el desarrollo de la elongación radicular de *Chenopodium quinoa wild*. En la Figura 7 se observa que la longitud radicular fue de 27, 16, 14, 7, 5 y 2 cm esta evidencio una tendencia inversamente proporcional respecto a las concentraciones de ASM incrementaban, 0%, 4,6%, 9,8%, 15,5%, 21,8% y 29,1%. El efecto decreciente de los plantines de quinua es debido posiblemente a que la presencia de ASM que no fue remediado en el suelo podría haber reducido la cantidad de agua disponible para la absorción de la planta, además, esta exclusión del aire y agua en los poros y espacios aéreos del suelo crea una tensión de oxígeno que conduce a la muerte de los pelos de la raíz en consecuencia limita la absorción de agua y desarrolla el crecimiento de raíces distorsionadas. (Adenipekun C., et al 2006) mostro resultados semejantes a los obtenidos, donde la longitud de la raíz de la planta en suelo remediado fue de 5,33 cm al 5%, 2,98 cm al 10% y 2,605 cm en 15% de nivel de contaminación. Por otra parte los trabajos realizados por (Xu J. & Johnson L., 1995) indicaron que la contaminación por hidrocarburos reduce el crecimiento de la planta debido a que los hidrocarburos pueden cubrir las raíces de las plantas generando un efecto de permeabilidad que llega a afectar la absorción de agua y nutrientes del suelo, además de

penetrar dentro de los tejidos vegetales, las moléculas de hidrocarburos dañan las membranas celulares y bloquean los espacios intercelulares reduciendo paulatinamente el transporte de metabolitos y la tasa de respiración.

#### 10.4. Identificación Molecular

Se realizó la amplificación de la cepa de *YL12* con los cebadores para las regiones ITS y  $\beta$ -tubulina. Estudios realizados por (Garzon N. et al., 2013) mostraron que para especies de *Aspergillus sp.* amplificadas con  $\beta$ -tubulina se obtuvieron fragmentos de 402 a 560 pb, en comparación con *Aspergillus* en el presente estudio, presentó un tamaño de 550 pb. Adicionalmente *Aspergillus tubingensis* en el estudio de (Garzon N. et al., 2013) presentó fragmento de 506 pb siendo menor de la cepa codificada como *Aspergillus niger* que dio 580 pb, en donde el tamaño sí pudo variar indicando que no son la misma cepa pero sí la misma especie.

## 11. CONCLUSIONES

En la actualidad los estudios reportados sobre micorremediación son variados, cubriendo desde el análisis de los microorganismos como tal, las rutas de biodegradación, la comparación con métodos convencionales, hasta las técnicas que incluyen organismos modificados genéticamente para su aplicación en sitios contaminados. Esta evidencia demuestra que el campo de acción e investigación de estos microorganismos (Bacterias y hongos) es bastante amplio y útil por la ventaja de poseer un poderoso pool enzimático que degrada, biotransforma y mineraliza los compuestos químicos asociados con los hidrocarburos. Para lograr la biorremediación, debe haber una presencia de hidrocarburos

de petróleo que utilicen microorganismos y también una disponibilidad óptima de nutrientes.

Con respecto a los ensayos de laboratorio en el presente estudio

- Solamente las cepas de *Bjerkandera sp.* y de *Aspergillus sp.* YL12 fueron capaces de desarrollar en medio sólido con material lignocelulósico y presentar actividad oxidoreductasa determinada a través de la oxidación del ABTS
- Se observa que la cepa de *Aspergillus sp.* crecida en 20% de ASCA en condiciones de agitación a 100 rpm presentó mayor actividad oxidoreductasa, en comparación con las otras condiciones de cultivo evaluadas.
- Se evidenció hasta un 80 % de degradación de los TPH cuando se estableció el tratamiento de 100 g de suelo conteniendo 15.5 g de aceite y habiendo sido inoculado con la cepa YL12 *Aspergillus sp.*, luego de seis meses de tratamiento.
- Solo se evidencian las enzimas en los tratamientos con hongo y de ellas, la actividad Manganese peroxidasa muestra un incremento a mayores concentraciones de ASM como contaminante del suelo.
- Se evidenció que el tratamiento con *Aspergillus sp.* incrementó las concentraciones de Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Potasio y la humedad relativa, mientras que el pH disminuyó de 7 a 4. .
- Se identificó por microscopía y PCR que la cepa YL12, corresponde a la cepa de *Aspergillus sp.*

El presente trabajo es una base teórica y de experimentación preliminar para el desarrollo de futuras investigaciones en el campo de la biorremediación de

hidrocarburos como el aceite sucio de motor, siendo este el primer trabajo que propone una metodología de aplicación en cultivos in vitro de microorganismos fúngicos para este tipo de residuos.

## 12. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la biorremediación mediante la técnica de bioaugmentación por ser un método eficiente para la degradación de TPH en suelos contaminados con hidrocarburo.
- Se recomienda realizar un estudio completo de suelos y contaminantes antes de realizar cualquier tipo de proceso.
- Se recomienda la completa identificación de los contaminantes de un derrame para evitar contaminaciones de mayor impacto como subproductos del proceso.
- Se recomienda mantener un cultivo activo de microorganismos utilizado en derrames anteriores de microorganismos autóctonos de cada región de los oleoductos para una fácil y rápida respuesta a los derrames.
- Se recomienda realizar la identificación Microbiológica de las cepas fúngicas con capacidad enzimática biorremediadora.
- Se recomienda hacer mayores estudios orientados a la reducción de metales pesados y otros contaminantes mediante la obtención de consorcios fúngicos nativos.
- Se recomienda hacer mayores estudios orientados a la determinación de metales pesados y otros contaminantes absorbidos por la especie vegetal empleada en ecotoxicidad.

### 13. BIBLIOGRAFIA

- Abioye, O. P. (2012). Bidegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments. *Biotechnology Research International*, 58-70.
- Adams, G., Fufeyin, P. T., & Ehinomen, I. (2014). Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. *Research Journal in Engineering and Applied Sciences* , 124-130 .
- Adams R. & Ellis R. (1960). Some physical and chemical changes in the soil brought about by saturation with natural gas. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*41-44
- Adenipekun CO and Kassim LQ. 2006. Effects of spentengine oil on some growth parameters and moisture content of *Celosia argentea* L. *Nigerian J Bot.* 318-324.
- Adenipekun CO, Oyetunji OJ Kassim LS, 2008. Effect of engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius* Linn, *Environmentalist.* 446-450.
- Adenipekun CO , Oyetunji OJ and Kassim LS ( 2009).Screening of *Abelmoschus esculentus*L.Moench for tolerance to spent engine oil. *Journ.Appl.Biosciences.* 1131-1137.
- Adenipekun CO, Ejoh OE, Ogunjobi, AA, 2011. Bioremediation of cutting fluids contaminated soil by *Pleurotus tuber-regium* Singer. *Enviromentalist.* 11-18.
- Adenipekun C.O , Ayanleye. O.O, Oyetunji O.J (2013). Bioremediation of soil contaminated by spent diesel oil using *Pleurotus pulmonarius* Fries (Quelet) and its effects on the growth of *Corchorus olitorius* (L). *Journal of Applied Biosciences.* 5366 –5373
- Adeniyi A. Sanyaotu, A. A. (2018). Bioremediation Potentials of a Petroleum Hydrocarbon Polluted Soil by *Aspergillus oryzae* (JQ675305.1) Isolated from Diseased *Irvingia gabonensis* Seeds. *Department of Botany and Ecological Studies.* 23-28
- Adnan B. Al-Hawash, M. A. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the enviroment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 71-76.
- Aguilar, D. V. (2014). Remoción de colorantes de aguas residuales de la industria textil, mediante el empleo de bagazo y microorganismos. *Universidad Martha Abrelli.* 45-53
- Ali, M. I., Khalil, N. M., & El-Ghany, M. N. (2012). Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus* . *Full Length Research Paper.* 3783-3790
- Álvarez, María T. O. V. (2016). Estudio del efecto del cambio climático sobre la biodiversidad microbiana de suelos donde se realizan cultivos de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.) procedente de distintos ecosistemas del altiplano. *Articulo en proceso de publicacion, perteneciente al Instituto de Invertigaciones Farmaco Bioquimicas*, 24-28.

- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*.
- Angarita., C. C. (2014). Incidencia del medio y de las condiciones de cultivo en el potencial como nutriceutico de tres especies del genero Pleorotus. *Universidad Nacional de Colombia*. 55-59
- Ángel T. Martínez, M. S.-D. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 195-204.
- Ansari M.A. (2011). Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Applied Microbiology*. 1364-5072
- Antriksh Gupta, A. K. (2017). Effects of wheat straw solid contents in fermentation media on utilization of soluble/insoluble nutrient, fungal growth and laccase production. *3 Biotech*. 1-13.
- Aranda, R. R.-S.-R. (2018). An Overview of Fungal Applications in the Valorization of Lignocellulosic Agricultural By-Products: The Case of Two-Phase Olive Mill Wastes. *Mycoremediation and Environmental Sustainability*, 213-228.
- Arboleda, C., & Mejia, A. (2010). Inducción de la actividad de lacasa en Ganoderma sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia*. 519-532.
- Arce, J. y P. Reyes. (1976). Ecofisiología de la quinua. En: Curso de quinua. Ministerio de Alimentación - IICA - Universidad Nacional Técnica del Altiplano, Puno, Perú.
- Arias, J. A. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Investigacion Agraria y Ambiental*. 151-169.
- Balaji, V., Arulazhagan, P., & Ebenezer, P. (2013). Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of Environmental Biology*. 521-530.
- Bamforth S. M., Singleton I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 723–736.
- Banks MK, K. P. (2003). Degradation of crude oil in the rhizosphere of Sorghum bicolor. . *Int J Phytoremediation* , 225-234.
- Barreto, S. M. (2012). Obtención de enzimas lignocelulolíticas y polisacáridos a partir de residuos lignocelulósicos del departamento de caldas empleando macromicetos de pudrición blanca por fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. *Ciencias Agropecuarias*. 37-44.

- Barrios, G. J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem*, 175-185.
- Bastias, B., Anderson, I., Rangel-Castro, I., Parkin, P., & Cairney., J. P. (2009). Influence of repeated prescribed burning on incorporation of <sup>13</sup>C from cellulose by forest soil fungi as determined by RNA stable isotope probing. *Soil Biology and Biochemistry*, 467-472.
- Beare, M., Reddy, M., & Srivastava., G. T. (1997). Agricultural intensification, soil diversity and agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota. *Applied soil ecology* , 87-108.
- Borcard D, Gillet F, Legendre P. 2011. Numerical Ecology with R. New York, Dordrecht London Heidelberg.
- Boonchan, S., Britz, M., & Stanley, G. (2000). Degradation and Mineralisation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co cultures. *Applied Environmental Microbiology*, 1007-1019.
- Braibant, C. (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. (*Informe de Práctica de Especialidad*). Instituto Tecnológico de Costa Rica.12.20 .
- Brijwani, K. R. (2010). Fungal laccases: Production, function, and applications in food Processing. *Enzyme Research*. 1-10.
- Cabezas, K. T. (2014). Obtencion de un extracto enzimatico con actividad lacasica por fermentacion liquida de *Pleurotus ostreatus* en un medio con bagazo de maiz a escala de laboratorio para decoloracion de colorantes textiles. *Escuela Politecnica Nacional*.1-20.
- Cadena, J. I. (2016). Importancia de la materia organica en el suelo. *Agroproductividad*.1-9.
- Caricari, J. (2008) “Caracterización de la fertilidad de los suelos con aplicación en la región del intersalar de los departamentos de Oruro y Potosí”. Tesis de grado. Universidad Técnica de Oruro, Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias y Veterinarias.
- Chang , B., Chang , W., & Yuan, S. (2003). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge. *Adv Environ Res*, 623-631.
- Cleves, I. & Sandoval, M. (2001). Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos presentes en suelos contaminados con lodos aceitosos de la industria petrolera (Huila-Colombia). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana.
- Cordewener , J., Busink , R., Boschloo , J., Visser , J., & Bos , C. (1987). Development of biocatalysts with monooxygenase activity: Pathway and characterisation of enzymes of benzoate degradation in *Aspergillus niger*. . *In: Neijssel OM, Van der Meer RR*,

Luyben KChAM (eds) *Proceedings 4th European Congress on Biotechnology*, vol 3. Elsevier, Amsterdam, 336.

- Cordova, R. G., & Cultid, G. R. (2015). Estudio comparativo de la actividad enzimática Lacasa (Lac), Lignino peroxidasa (LiP) y Mananeso peroxidasa (MnP) de *Pleurotus* cultivados en residuos ligninocelulosicos de Raquis de palma de aceite bagazo de fique y pulpa de café. *Universidad de Nariño*. 77-83.
- Cortés del Pino Adrià (2014). Proceso de refinado del petróleo para la obtención de combustibles marinos proyecto final de carrera ingeniería técnica naval. *Facultad de Náutica de Barcelona-UPC*. 34-40
- Covino, S. K. (2010). In vivo and in vitro Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Lentinus tigrinus* (Panus.) . *Bioresources Technology*, 3004-3014.
- Cuaical, S. D. (2016). Evaluación de la eficacia de *Trichoderma* y *Pseudomonas* para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Universidad Politécnica Salesiana*. 5-11
- Dashtban Mehdi , Schraft Heidi , Tarannum A. Syed, and Wensheng Qin (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol*. 36–50.
- Dhakar, K., Kooliyottil, R., Joshi, A., & Pandey, A. (2015). Simultaneous production of ligninolytic enzymes by a temperature and pH tolerant strain of *Aspergillus niger* under different cultural conditions. *Indian Journal of Biotechnology*, 81- 86 .
- Díaz, M. d., García, M. R., Martínez, J., Acosta, M., Serrato, M. Á., Colinas, M. T., & Villar., J. M. (2017). Fitotoxicidad de los extractos de *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* y *Brassica napobrassica*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*. 26-46
- Dominguez-Rosado E, P. (2004). Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: II. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies. *Environ Eng Sci* , 157-168.
- Escalante Espinosa E., M. G. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system . *Chemosphere* 59 , 405-413.
- Efsun Dindar, O. T. (2015). Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil . *International Biodeterioration & Biodegradation* , 268-275 .
- FAO, (2011). Quínoa cultivo milenario. Oficina Regional Chile.
- Felix, J., & Garcia, C. (2015). Técnicas de caracterización de suelos y abonos orgánicos. *ResearchGate*. 50-52

- Fernandez Luqueño F, V.-E. C.-S.-N. (2011). Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil-possibilities and challenges: a review. *Environ Sci Polluted*, 12–30.
- Figueroa, H. G., & Lozada, D. C. (2015). Evaluacion de tres residuos ligninocelulosicos para la produccion de *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones controladas en la finca Berlin, San Benito, Santander. *Universidad de la Salle*. 12-17
- Fu, P. P., Xia, Q., Sun, X., & Yu, H. (2012). Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)—Light-Induced Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *Journal of Environmental Science and Health*, 1–41.
- Fundación YPF (2017). Energía para aprender: un recorrido por el mundo de la energía. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Ed. Fundación YPF. 21-24
- Gallegos, L. B., & Romero, F. V. (2015). Diagnostico de la contaminacion ambiental causada por aceites usados provenientes del sector automotor y planteamiento de soluciones viables para el gobierno autonomo descentralizado del canton azogues. *Universidad Politecnica Salesiana*, 35-39.
- Gandarillas, H. (1979). Botánica. En: Quinoa y kañiwa, cultivos andinos. Publ. CIID, Bogotá, Colombia.
- Garzon, N. G. (2013). Caracterizacion e identificacion molecular de hongos de suelo aislado de los Paramos de Guasca y Cruz Verde, Cundimarca - Colombia. *Grupo de identificacion en fitoquimica Universidad Javeriana (GIFUJ) - Instituto de Errores innatos del Metabolismo*. 25-33.
- Ghim Hock, Ong, Cheng Cheng, Ho, Lim Vivian Bi Fang, Wong Yieng Yong, Wong Ling Shing (2018). Isolation and Identification of Potential Fungal for Spent Engine Lubrication Oil Remediation in Peninsular Malaysia. *Faculty of Health and Life Sciences, INTI International University*. 1-8.
- Gholamalizadeh Ahangar, Ahmad (2010). Sorption of PAHs in the Soil Environment with Emphasis on the Role of Soil Organic Matter: A Review. *World Applied Sciences Journal* 759-765,
- Gill, P.K.D. A. (2003). Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi . *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28-33.
- Gómez, M. S., & Vidal, S. A. (2007). Correlación de Determinación de Humedad de Suelos por Medio de Secado en Horno y en microondas. *Revista de la Construcción*, 28-34.
- Gómez P. Luz, E. A. (2016). Guía de cultivo de la quinua . *Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura* , 47-50.

- Gonzales, C. (2014). Propuesta de un plan de manejo de aceites lubricantes usados de automoviles para el estado de Carabobo. *Universidad de Carabobo*, 18-21.
- Gotelli, N.J., Ellison, A.M., 2004. A Primer of Ecological Statistics. *Sinauer Associates, Sunderland, MA*.
- Guimarães Luis Henrique S.; Peixoto-Nogueira Simone C.; Michelin Michele; S. Rizzatti Ana Carolina; Sandrim Valéria C.; Zanoelo Fabiana F.; M.M. Aquino Ana Carla; Junior Altino B.; T.M. Polizeli Maria de Lourdes (2006). Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 460-474
- Gutierrez, A. C., Galván, J. T., Manfrino, R. G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D'Alessandro, C., & Lastraa, C. C. (2017). Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 183-188.
- Hains, J. (1996). Measurement of high hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. *Journal of industrial microbiology*, 36-41.
- Hao, J., Tian, X., Song, F., He, X., & Zhang, Z. Z. (2006). Involvement of lignocellulolytic enzymes in the decomposition of leaf litter in a subtropical forest. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 193-198.
- Hatakka Annele, Hammel Kenneth E. (2010) Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. *Industrial Applications, 2nd Edition The Mycota X M. Hofrichter (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 320-340.
- Hatakka A, Hammel KE. (2011). Fungal biodegradation of lignocelluloses. *Industrial Applications. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*, 319-40.
- Hestbjerg, H., Willumsen, P., Christensen, M., Andersen, O., & Jacobsen, C. (2003). Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. *Environ Toxicol Chem*, 692-698.
- Hong Sodaneath, Jung-In Lee, Seung-Ok Yang, Hyekyeng Jung, Hee Wook Ryu, Kyung-Suk Cho. (2017). Decolorization of textile dyes in an air-lift bioreactor inoculated with *Bjerkandera adusta* OBR105. *Journal of Environmental Science and Health*. 1-13.
- Hoyt, P., Bradfield, R. (1962). Effect of varying leaf area by partial defoliation and plant density on dry matter production in corn. *Agronomy Journal*. 523-525.

- Huang, W., P. Peng, Z. Yu and J. Fu, 2003. "Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments". *Applied Geochemistry*. 955-972.
- Hudson H.J. (1986). *Fungal biology Cambridge University Press, Cambridge*. 67-77
- Hundal, L.S., M.L. Thompson, D.A. Laird and A.M. Camro, 2001. "Sorption of phenanthrene by reference smectites". *Environ. Sci. Technol.* 3456-3461.
- IARC, I. A. (2010). Some Aromatic Amines, Organic Dyes,. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 15-31.
- Idowu, F. C., & Ijah, U. (2017). Biorremediation of diesel oil polluted soil following amendment with fungal consortium. *Journal of Science, Technology, Mathematics and Education*. 1-12.
- Idowu, F. C., & U.J.J., Ijah. (2018). Changes in microbial pollution during mycorremediation of diesel oil contaminated soil. *Ife Journal of Science*. 325-334
- Imeh, U., & Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem*, 6301- 6306.
- INE, I. N. (2017). Estadísticas del Parque Automotor 2003-2017. *Instituto Nacional de Estadística*. 5-8
- Isis S. Silva, M. G. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 224–229.
- Jain P.K., G. V. (2009). Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Research Journal of environmental Toxicology* , 1-26.
- Janusz Grzegorz, Pawlik Anna, Sulej Justyna, Świdorska-Burek Urszula, Jarosz-Wilkolazka Anna and Paszczyński Andrzej (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev*. 941–962.
- Jecu L, G. A. (2010). Ability of fungal strains to degrade PVA based materials. *J Polym Environ* , 284–290.
- Jerina , D. (1983). Metabolism of Aromatic hydrocarbons by the cytochrome P-450 system and epoxide hydrolase. . *The 1982 Bernard B. brodie Award Lecture. Drug Metab Dispos*, 1-4.
- Joanne, W., Linda, S., & Christopher, W. (2008). Prescott, Harley and Kleins Microbiology. *McGraw Hill Publishers, New York* , 101-504.
- Juana M. Mendoza. (2004). Estado actual del conocimiento de la biorremedación en Mexico. *Instituto politecnico nacional*, 57-58.

- Kanally R. A., Harayama S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 2059–2067.
- Kannangara S, A. P. (2016). Polyaromatic hydrocarbon degradation of moss endophytic fungi isolated from *Macromitrium* sp. . *Journal of Agricultural Science and Technology*, 171–182.
- Khelifa Bouacem, H. R.-D. (2017). Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* strain CX-9. *International Journal of Biological Macromolecules*. 5-12
- Koduri, R., & Tien, M. (1994). Kinetic analysis of lignin peroxidase explanation for the mediation phenomenon by veratryl alcohol . *Biochemistry*, 4225 - 4230.
- Kravetz, S., Giorgi, A., & González, B. (2016). Evaluación de una matriz para decolorar efluentes textiles utilizando *Pleurotus ostreatus*. *Universidad Nacional de Colombia*, 252-263.
- Kunamneni, A. B. (2007). Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 233-242.
- Kupareva, A., Mäki-Arvela, P., & Murzin, D. Y. (2013). Technology for rerefining used lube oils applied in Europe: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1780–1793.
- Kusum Dhakar, R. K. (2015). Simultaneous production of ligninolytic enzymes by a temperature and pH tolerant strain of *Aspergillus niger* under different cultural conditions. *Indian Journal of Biotechnology*, 81-86.
- Laura, J., & Castellanos, P. (2009). Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Revista peruana de Biología*. 5-10
- Lee H, Choi YS, Kim MJ, et al. (2010). Degradation ability of oligocyclic aromates by *Phanerochaete sordida* selected via screening of white-rot fungi. *Folia Microbiologica*. 447–453.
- Lesser I. (1995). Prospección de contaminación de acuíferos por hidrocarburos. *Geologo*, 5-8.
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. . *Nova – Publicación Científica*, 82-90.
- Luna, J. F., Cordova, L. L., Gil, K. P., & Romero, I. B. (2013). Efecto de residuos agroforestales parcialmente biodegradados por *Pleurotus Ostreatus* (PLEUROTACEAE) sobre el desarrollo de plantulas de tomate. *Acta Biologica Colombiana*. 365-374.

- Mackay, D., & Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. . *Environmental Pollution.*, 375-391.
- Mariana Ferdes, M. D. (2018). Laccase enzyme production and biomass growth in liquid cultures of wood-degrading fungal strains. *ResearchGate*. 12-19
- Mariem Ellouze, S. S. (2016). White-Rot Fungi and their Enzymes as a Biotechnological Tool for Xenobiotic Bioremediation. *Management of Hazardous Wastes*, 978-953.
- Martina Andlar, T. R. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*.1-13
- Martínez, Ángel T., Mariela Speranza, Francisco J. Ruiz-Dueñas. Patricia Ferreira. Susana Camarero. Francisco Guillén. María J. Martínez, Ana Gutiérrez, José C. del Río (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology*. 195-204
- Medina, J., García, F., & Paricaguán, B. (2014). Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcón. *Revista INGENIERÍA UC*, 62-69.
- Mendez, J., Salazar, R., & Velasquez, A. (2006). Efecto del derrame petrolero simulado y la aplicacion de un remediador sobre la germinacion de semillas y desarrollo de plantulas en dos tipos de maiz (*Zea mays* I.). *Revista UDO Agricultura*, 102-108.
- Mendoza Juana (2004). Estado actual del conocimiento de la biorremedacion en Mexico. *Instituto politécnico nacional*. 57-58
- Mercedes Garcia, T. S. (2017). Risk element immobilization/stabilization potential of fungal-transformed dry olive residue and arbuscular mycorrhizal fungi application in contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, 110-119.
- Mester , T., & Tien , M. (2000). Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. . *Int Biodeterior Biodegradation* , 51-59.
- Millan, E. O. (2015). Evolución de la Actividad Enzimática de un Suelo Contaminado con Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos. *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia de Sevilla*. 5-8.
- Mohamed I. A. Ali, N. M.-G. (2012). Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus* . *Full Length Research Paper*.1-12
- Mohammadi, M., Assadi, M., Farazmand, A., Kianirad, M., Ahadi, M., & Ghahderijani, H. (2017). Bioremediation of soil contaminated crude oil by Agaricomycetes. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 1--13

- Morales, R. L., Gerardo, J. L., Navarro, K. G., & Sánchez, J. E. (2016). Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Microbiología*, 189-196.
- N. Pozdnyakova, S. A. (2018). Ligninolytic basidiomycetes as promising organisms for the mycoremediation of PAH-contaminated Environments. *Earth and Environmental Science*. 5-14.
- Nadhim, M. O.-S., Ali, I. A.-A., & Raman, J. (2015). Growth Performance and Cultivation of Four Oyster Mushroom Species on Sawdust and Rice Bran Substrates. *Journal of advances in biotechnology*, 424-429.
- Novotny, C. E. (2000). Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory micelium of white rot fungi. *Biodegradation*, 159-168.
- Nuñez, W. N. (2014). Estado situacional del manejo del aceite lubricante usado en la ciudad de ayacucho y propuesta de disposicion final. *Gestión y Auditorías Ambientales*, 22.
- Nwite, J., & Alu, M. (2015). Effect of different levels of spent engine oil on soil porperties, grain yield of maize and its heavy metal uptake in Abakaliki, Southeastern Nigeria. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 92-99.
- Obayori OS, Salam LB, Ogunwumi OS. (2014). Biodegradation of fresh and used engine oils by *Pseudomonas aeruginosa* LP5. *J Bioremediat Biodegrad*.200-213.
- Odjegba, V. J., & Sadiq, A. O. (2002). Effects of spent engine oil on the growth parameters, chlorophyll and protein levels of *Amaranthus hybridus*L *The Environmenta list*, 23-28.
- Okonokhua, B. O., Ikhajiagbe, B., Anoliefo, G. O., & Emede, T. O. (2007). The effects of spent engine oil on soil properties and growth of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 1-11.
- O.P. Ward, W. Q. (2005). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 55-69.
- Olanipekun, F. E. (2014). Comparative Studies on Biodegradative Abilities of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius* in Soils Contaminated with Crude and Used Engine Oils. *Scientific Research, Advances in Microbiology*, 849-855.
- Olusola SA, and Anslem EE, 2010. Bioremediation of a Crude Oil Polluted Soil with *Pleurotus pulmonarius* and *Glomus mosseae* using *Amaranthus hybridus* as a Test Plant. *J Bioremed Biodegrad*. 111.
- Olivero, A. d., Rodríguez, D. C., & Calcagno., M. P. (2013). Estandarización de un bioensayo para la búsqueda de compuestos fitotóxicos en extractos vegetales. *CIENCIA*, 187-202.

- Ong Ghim Hock, H. C. (2018). Isolation and Identification of Potential Fungal for Spent Engine Lubrication Oil Remediation in Peninsular Malaysia . *Faculty of Health and Life Science*. 13-24.
- Orsag C. Vladimir, L. L. (2013). Evaluación de la fertilidad de los suelos para la producción sostenible de quinua . *T'inkazos*, 89-112.
- Osma JF, M. U.-H.-C. (2011). Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 27-34.
- Osma, J. F. (2007). Effect of different organic nitrogen sources on laccase production by *Trametes pubescens*. 12-18
- Osorio, J., & Quintero, J. C. (2018). Decolorization of industrial dye Erionyl Turquoise by the white rot fungi *Bjerkandera* sp. R1. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 14-22
- Palaguachi, M. C., & Heredia, J. R. (2017). Propuesta de implementacion de una planta de regeneracion de aceites lubricantes usados en la ciudad de Cuenca empleando el proceso de extraccion con propano. *Universidad Politecnica Salesiana*, 25-28.
- Peng R, A.-S. X.-Y.-S.-H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. . *FEMS Microbiol Rev*, 927–955.
- Pérez, E. J., Soto, R. R., Sandoval, B. E., Castañeda, F. A., García, M. M., Contreras, J. E., & Franco., F. G. (2017). Evaluacion de la Fitotoxicidad de aceite automotriz usado con *Vicia faba* Y *Phaseolus coccineus*. *Revista Internacinal de Contaminacion Ambiental*. 1-6.
- Pogni, R., Baratto, M. C., Giansanti, S., Teutloff, C., Verdin, J., Valderrama, B., Basosi, R. (2005). Tryptophan-Based Radical in the Catalytic Mechanism of Versatile Peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry*, 4267–4274.
- Pothast, A., Rosenau, T., Chen, C. L., & Gratzl, J. S. (1996). A novel method for conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase-catalysed oxidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 5–9.
- Rahman, K. M., Street, G., Lord, R. K., & Banat., G. a. (2009). Bioremediation of hydrocarbon contaminated gasoline station soil by a bacterial consortium. *Transaction of the Wessex institute.*, 3-7.
- Ramirez, L. C., & Iturres, R. (2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 119-126.
- Rao M.A., Scelza R., Scotti R. and Gianfreda L. (2010). Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of soil science and plant nutrition*. 333- 353

- Restrepo, R. (2002). Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. , . *ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo*. 45-50
- Rhodes, C. J. (2014). Mycoremediation (bioremediation with fungi)growing mushrooms to clean the earth. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 196-198.
- Rojas., A. T. (2011). Conceptos y practica de microbiologia general. *Universidad Nacional de Colombia*, 111-113.
- Royse, D., & Sanchez, J. (2001). La Biología del cultivo de Pleurotus spp. *Ecosur*. 1-12.
- Ruiz, W. F., Nuñez, R. A., & Flores, J. P. (2017). Aislamiento, propagación y crecimiento de hongos comestibles nativos en residuos agroindustriales. *Scientia Agropecuaria*. 1-9.
- Sáez Jiménez Verónica, Fernández Fueyo Elena, Francisco Javier Medrano , Antonio Romero, Angel T. Martínez , and Francisco J. Ruiz-Dueñas (2015). Improving the pH-stability of Versatile Peroxidase by Comparative Structural Analysis with a Naturally-Stable Manganese Peroxidase. *PLoS One*. 1-10
- Sanchez, A. D. (2013). Identificación de los riesgos ambientales y sanitarios de la producción de gas mediante fracturación hidráulica y bases para una propuesta metodológica de estimación de vulnerabilidad de las aguas subterráneas. *Escuela Superior de Tecnicos de Minas*. 39-50
- Sanchez, J., & Royse, D. (2001). Biología y cultivo de Pleurotus spp. . *1ª ed. Uteha Ecosur, México.*, 290.
- Shengyan Pu, H. M. (2018). Isolation, identification, and characterization of an *Aspergillus niger* bioflocculant-producing strain using potato starch wastewater as nutrient and its application. *Plos one*. 1-12.
- Siles, Terrazas, E., Alvarez, T., Guieysse, B., & Mattiasson, B. (2005). Isolation and characterization of a white rot fungus *Bjerkandera sp.* strain capable of oxidizing phenanthrene. *Biotechnology Letters*, 845-851.
- Silva Isis S, Grossman Matthew, Durrant Lucia R. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 224–229
- Silva, C. A., Baker, D., Shepherd, A. W., Jenane, C., & Cruz, S. M. (2013). Agroindustrias para el desarrollo. *Organizacion de las Naciones Unidas para la alimentacion y la agricultura*. 25-37
- Silva, Waldyr Fong, Bolaños Quiñonez, Edgar, Tejada Tovar, Candelaria. (2017), Caracterización físico-química de aceites usados de motores para su reciclajePhysical-chemical characterization of spent engine oils for its recycling. *Prospect*. 135-144
- Singh., H. (2006). Mycoremediation: Fungal Bioremediation. *WileyInterscience*. 1-14

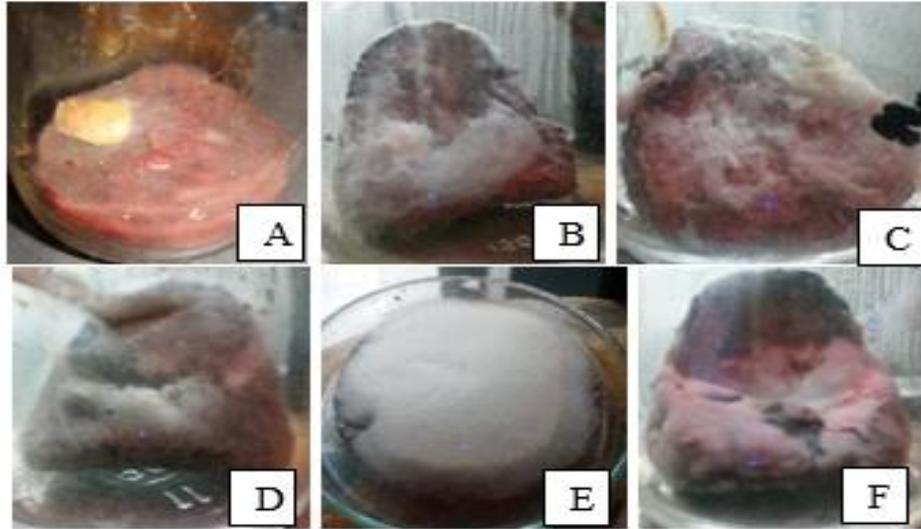
- Singh, M. P. S. (2015). Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. *Journal of Applied Microbiology*. 1278--1290.
- Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Tavakol, T., Lahijanzadeh, A. R., Jaafarzadeh, N., & Kermani, M. (2015). Ecological and human health hazards of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in road dust of Isfahan metropolis, Iran. *Science of the Total Environment*, 712-723.
- Song, N., Ma, J., Yu, Y., Yang, Z., & Li, Y. (2015). New observations on PAH pollution in old heavy industry cities in northeastern China. *Environmental Pollution*, 415-423.
- Speight, J. (1991). *The Chemistry and Technology of Petroleum*. New York-Marcel Dekker. 321-353
- Srinu A, L. K. (2018). Optimization of ligninolytic enzymes produced by *Aspergillus* strains in anthraquinone dye degradation . *International Journal of Recent Scientific Research*. 1-12.
- Sutherland J. B., Rafii F., Khan A. A., Cerniglia C. E. (1995). "Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation," in *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, 269–306.
- Tahir, N. M., Pang, S. Y., Hii, Y. S., & Simoneit, B. R. (2014). Distribution and Sources of Perylene and other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in South China Sea Sediments off Southern Terengganu Coast, Malaysia From Sources to Solution . *Springer*, 463-467.
- Tapia, E. T. (2013). Estudio juridico del impacto ambiental causado por las lubricadoras y lavadoras, en la provincia de Santo Domingo de los Tsachilas. *Universidad Autonoma de los Andes*. 25-43.
- Teck, A. N. (2013). Production of laccase enzyme using husk as substratae in fungal solid-state fermentation. *University of Malaya*. 56-60.
- Thenmozhi, K. A. (2013). Studies on Mycoremediation of used engine oil contaminated soil samples. *Advances in Applied Science Research*, 110-118.
- Thangarajan, R., Adetutu, E., Moore, R., Ogunbanwo, S., & Bali., A. (2011). Comparison Between Different Bio-Treatments of a Hydrocarbon Contaminated Soil from a Landfill Site. . *African Journal of Biotechnology*, 15151 – 15162.
- Tirado Torres David, Acevedo Sandoval Otilio, Romo-Gómez Claudia, Marmolejo-Santillán Yolanda, Gayosso Canales Martha (2015). Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 2334-2501
- Torres-Duarte Cristina (2001). Degradación de plaguicidas por el sistema lacasa-mediador de *Coriopsis gallica*, *Instituto de Biotecnología-UNAM*. 1-1.

- Troya-Santos, J., Ale-Borja, N., & Suárez-Cunza, S. (2017). Capacidad antioxidante in vitro y efecto hipoglucemiante de la maca negra, preparada tradicionalmente. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 40-51.
- Tunega, D., Gerzabek, M. H., Haberhauer, G., Totsche, K. U., & Lischka, H. (2009). Model study on sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to goethite. *Journal of Colloid and Interface Science*. 244–249.
- Tyagi, M. d. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Springer*. 231-241.
- Usnayo Gonzales, P. L. (2013). Optimización de medios de cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fungicas aisladas del altiplano boliviano. *Universidad Mayor de San Andres*. 39-47.
- Valencia, S. N. (2016). Estado del arte en la aplicacion de tratamientos biotecnologicos para la degradacion de residuos solidos grasos procedentes de efluentes metalmeconomicos. *Microbiologia agroindustrial*, 65-68.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57-149
- Vargas, G., Pire, R., & O, K. d.–d. (2009). Efecto de la longitud radicular al momento del trasplante sobre el crecimiento vegetativo del Cuijinicuil (Inga jinicuil Schtdl, & Cham. ex. Ge. Don) en invernadero. *Agrociencia*. 1-13.
- Vazquez Duhalt Rafael (1989). Environmental impact of used motor oil. *The Science of the Total Environment*. 1-23.
- Venkatesagowda, B., Ponugupaty, E., Barbosa, A., & Dekker, R. (2012). Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oilbearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. . *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 71-80.
- Vidal, P. (2012). Comparación de métodos de estimación del Índice de Área Foliar en el cultivo del algodón (*Gossypiumhirsutum*L.). *Universidad Nacional del Nordeste*. 21-38.
- Viral Christian, R. S. (2004). Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol Brilliant Blue R . *Enzyme and Microbial Technology* , 327-332.
- Vwioko, D., & G.O. Anoliefo, D. F. (2006). Metals Concentration in Plant Tissues of *Ricinus communis* L. (Castor Oil) Grown in Soil Contaminated with Spent Lubricating Oil”. *Journal of Applied Science and Environmental Management*, 127-134.
- Wan C, L. Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. . *Biotechnol Adv* , 1447–1457.

- Ward, Y. H. (2003). Mycology : Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. *Series Marcel Dekker Inc.* 15-20
- Xu, J. G. and R. L. Johnson (1995). Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil.* 3-10.
- Yanshun Kang, X. X. (2018). Decolorization of mordant yellow 1 using *Aspergillus* sp. TS-A CGMCC 12964 by biosorption and biodegradation. *Bioengineered.* 1-11.
- Zheng, Y. L., Li, H., Ge, Y., Zhang, W., Ye, Y., & Wang, X. (2014). Assessing the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollution of urban stormwater runoff: A dynamic modeling approach. *Science of the Total Environment*, 554-563.

## ANEXOS

### **ANEXO 1. Descripción de las características macromorfológicas y características microscópicas de las cepas fúngicas desarrolladas en medios con Aserrín y cascarilla de arroz.**



**Figura 1.** Cepas fúngicas que crecieron en el medio de cultivo ASCA. A). Cepa HL9, B). Cepa HL10, C). Cepa YL13, D). Cepa YL12, E). Cepa YL 13.1 y F). Cepa HLR.

Como se puede apreciar en la figura 1, el crecimiento micelial de los hongos difiere en cuanto a sus características macroscópicas. Estas se describen a continuación en la tabla 11.

**Tabla 1. Descripción de características macromorfológicas de colonias fúngicas**

CEPA	Desarrollo	Color	Superficie	Borde	Consistencia	Aspecto	Forma	Elevación	Margen
Bjerkandera	Pobre	Blanco	Radiado	Radiado	Filante	Algodonoso	Filamentosa	Plana	Ondulado
HL9	Pobre	Blanco	Lobulado	Radiado	Filante	Algodonoso	Filamentosa	Elevada	Entero
HL10	Regular	Blanco	Lobulado	Radiado	Filante	Algodonoso	Filamentosa	Elevada	Entero
YL13	Abundante	Gris	Radiado	Lobulado	Adherente	Algodonoso	Filamentosa	Plana	Lobulado
YL12	Abundante	Verde	Radiado	Radiado	Leñosa	Cerebriforme	Rizoide	Plana	Rizado
YL 13.1	Regular	Blanco	Festoneado	Lobulado	Filante	Algodonoso	Filamentosa	Elevada	Entero
HLR.	Abundante		Radiado	Festoneado	Filante	Algodonoso	Filamentosa	Elevada	Entero

El análisis microscópico de las siete cepas en estudio se describe a continuación:

Cepa BOL 13 (*Bjerkandera sp.*). Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy gruesas, parecidas a esqueléticas, pero ramificadas, tabicadas y con gruesas hifas en asa.

Cepa HL9. Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy delgadas, aseptadas, ramificadas y con delgadas hifas.

Cepa HL10. Hifas aseptadas no ramificadas, con paredes gruesa, hialinas.

Cepa YL13. Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy gruesas, septadas, ramificadas, y con delgadas hifas.

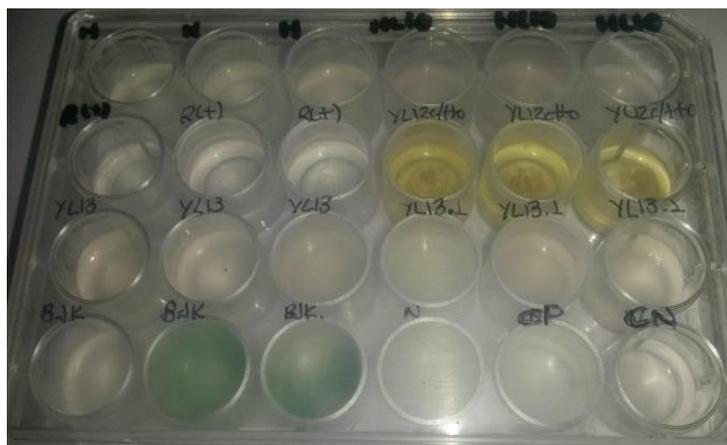
Cepa YL13.1. Hifas aseptadas no ramificadas, con paredes gruesa, hialinas.

Cepa YL12. Conidióforos hialinos de pared rugosa. Cabezuela radiada, uniseriada, vesículas esféricas.

Cepa HLR. Trama del carpóforo monomítica formada por hifas generativas de paredes muy gruesas, septadas, ramificadas, y con delgadas hifas.

De las siete cepas evaluadas solo dos cepas presentaron actividad enzimática oxidorreductasa. Las cepas seleccionadas fueron *Bjerkandera sp* cepa BOL 13 y *Aspergillus sp* cepa YL 12 como se observa en la figura, se evidenció la actividad oxidorreductasa por la formación de color verdoso debido a la oxidación del ABTS.

## ANEXO 2. Descripción del crecimiento de las cepas fúngicas en medios con ABTS



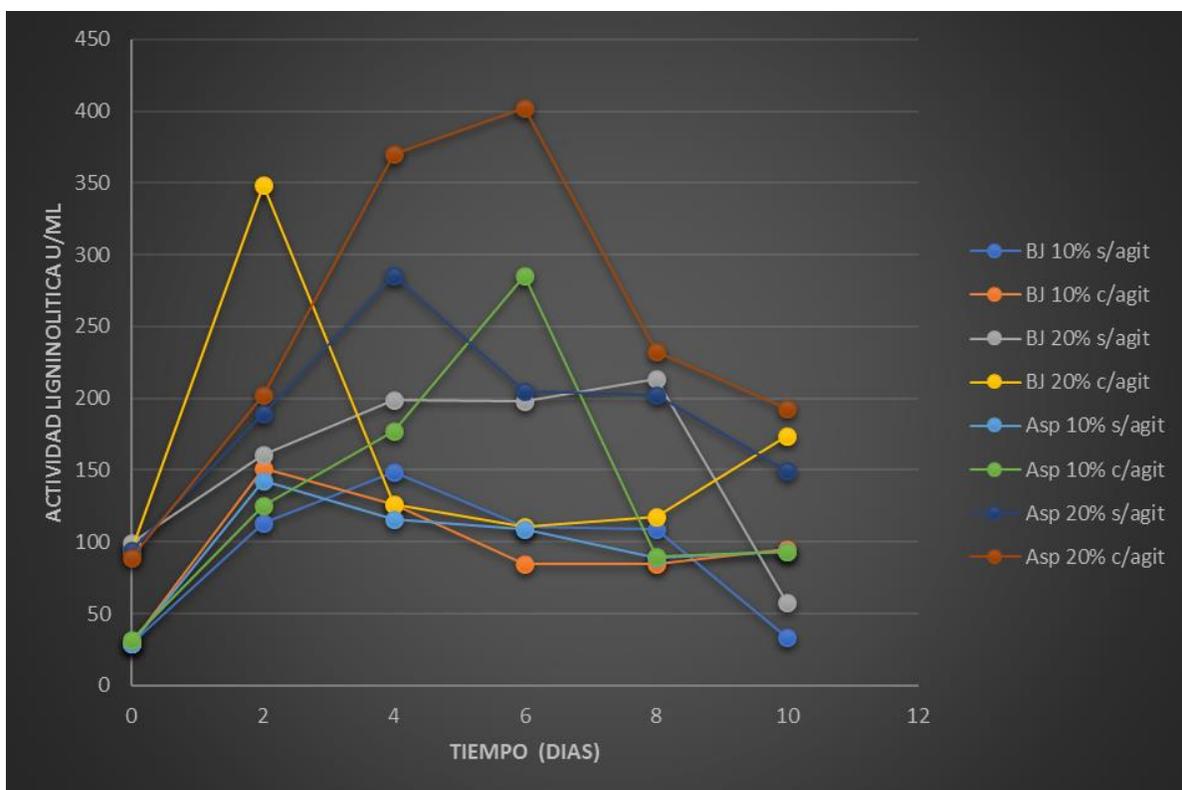
**Figura 1.** Screening enzimático con 7 cepas que presentaron desarrollo en medio ASCA

La determinación cualitativa de la actividad oxidorreductasa por la oxidación de ABTS que es evidente a través de la generación del cromóforo color azul/verde, debido a que el ABTS reducido transfiere un electrón a la enzima para activarla. Se relaciona la intensidad del color generado con la actividad oxidorreductasa presente (Tabla 12).

**Tabla 1.** Actividad oxidorreductasa. Interpretación de la intensidad del cromógeno verde generado.

CEPA/CÓDIGO	Crecimiento en medio ABTS
<b>Basidiomicetos</b>	
<i>Bjerkandera sp.</i> Bol 13	++
QD	
HL9	-
HL10	-
YL13	-
YL 13.1	-
<b>Ascomicetos</b>	
HLR	-
<i>Aspergillus sp.</i> YL12	+

**ANEXO 3. Descripción de la actividad enzimática oxidorreductasa determinada por la oxidación de ABTS, en 10 días de incubación.**



**Figura 1. Actividad enzimática oxidorreductasa (UI/mL) de las cepas fúngicas *Bjerkandera sp.* (BOL 13) y *Aspergillus sp.* (YL12) bajo diferentes condiciones de cultivo.** La codificación refiere: **ASPI0%A**=*Aspergillus sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, **ASPI0%S** *Aspergillus sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, **ASP20%A** *Aspergillus sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, **ASP20%S** *Aspergillus sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, **BJ10%A** *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, **BJ10%S** *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, **BJ20%A** *Bjerkandera sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, **BJ20%S** *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%

#### **ANEXO 4. Evaluación Oxidorreductasa ANOVA de medidas repetidas.**

Para evaluar la actividad oxidorreductasa de las dos cepas respecto a condiciones de agitación y cantidad de sustrato, se realizó un análisis de ANOVA de medidas repetidas.

Los resultados muestran que, si existe diferencia significativa en la Actividad oxidorreductasa, de las cepas dependiendo de las condiciones de agitación y cantidad de sustrato.

Error: DIAS

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)

Residuals 5 107629 21526

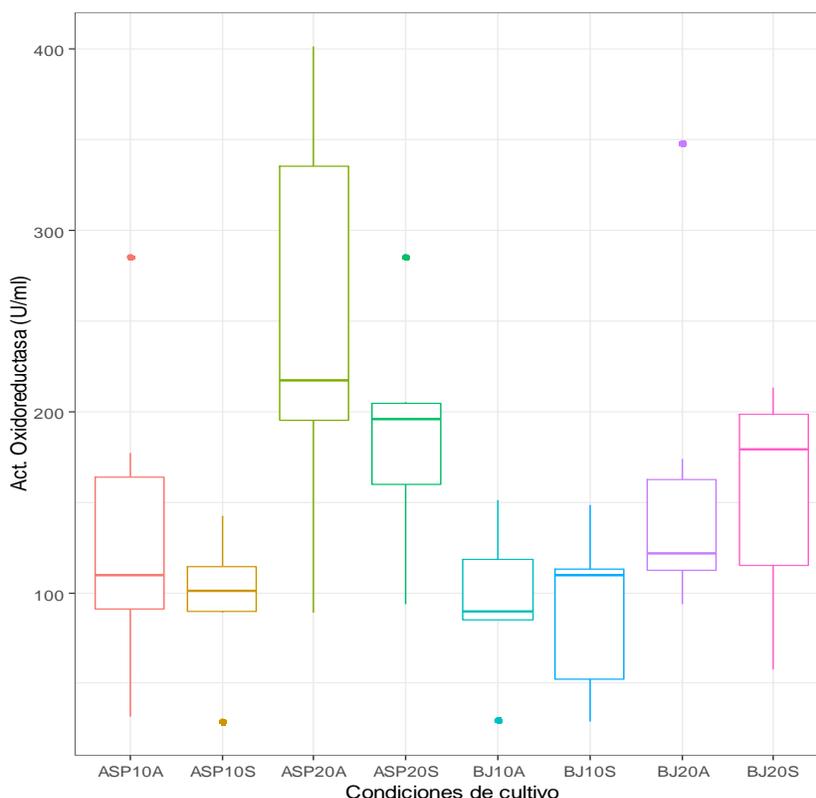
Error: DIAS:CEPA

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)

CEPA 7 124196 17742 5.461 0.000267 \*\*\*

Residuals 35 113706 3249

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1



**Figura 1. Actividad enzimática oxidorreductasa determinada en función a la oxidación del ABTS. Dos cepas fúngicas fueron inoculadas en el medio basal conteniendo ya sea 10 o 20% de aserrín/cascarilla de arroz e incubadas a 37°C en condiciones de agitación o no a 100 rpm, con humedad de 19 % (humedad relativa del ambiente) o 60% (humedad controlada).**

La codificación refiere: *ASP10A*=*Aspergillus sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *ASP10S* *Aspergillus sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, *ASP20A* *Aspergillus sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *ASP20S* *Aspergillus sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, *BJ10A* *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *BJ10S* *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%, *BJ20A* *Bjerkandera sp.* + 20% ASCA incubado a 37 °C en condiciones de agitación 100 rpm y humedad relativa del 9%, *BJ20S* *Bjerkandera sp.* + 10% ASCA incubado a 37 °C sin condiciones de agitación y humedad relativa del 9%.

Pairwise comparisons using paired t tests

data: datos\_tabla\_larga\$ACTLIG and datos\_tabla\_larga\$CEPA

	ASP10A	ASP10S	ASP20A	ASP20S	BJ10A	BJ10S	BJ20A
ASP10S	1.0000	-	-	-	-	-	-
ASP20A	0.0612	0.3046	-	-	-	-	-
ASP20S	1.0000	0.1142	1.0000	-	-	-	-
BJ10A	1.0000	1.0000	0.3654	0.1151	-	-	-
BJ10S	1.0000	1.0000	0.1528	0.0077	1.0000	-	-
BJ20A	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	-
BJ20S	1.0000	1.0000	0.9822	1.0000	1.0000	0.0817	1.0000

P value adjustment method: holm

Pairwise comparisons using paired t tests

data: datos\_tabla\_larga\$ACTLIG and datos\_tabla\_larga\$CEPA

	ASP10A	ASP10S	ASP20A	ASP20S	BJ10A	BJ10S	BJ20A
ASP10S	0.26463	-	-	-	-	-	-
ASP20A	0.00227	0.01385	-	-	-	-	-
ASP20S	0.11966	0.00457	0.09953	-	-	-	-
BJ10A	0.30530	0.81597	0.01740	0.00480	-	-	-
BJ10S	0.18933	0.69992	0.00664	0.00027	0.78215	-	-
BJ20A	0.63043	0.08673	0.25429	0.59948	0.06663	0.14008	-
BJ20S	0.52526	0.05605	0.04911	0.14031	0.06847	0.00314	0.88916

P value adjustment method: none

La Actividad oxidorreductasa disminuyo en el siguiente orden

ASP20A>ASP20S>BJ20A>BJ20S>ASP10A>ASP10S>BJ10A>BJ10S, las pruebas post

hoc nos permiten sacar las siguientes conclusiones

### **Conclusión 1**

*Aspergillus sp.* tiene mayor Actividad oxidorreductasa que *Bjerkandera sp.* En condiciones similares de agitación y cantidad de sustrato.

### **Conclusión 2**

En ambas cepas la cantidad de sustrato aumento significativamente la Actividad oxidorreductasa

### **Conclusión 3**

La agitación aumento la Actividad oxidorreductasa en condiciones similares de cantidad de sustrato y Cepa.

**ANEXO 5. Análisis One way ANOVA del porcentaje de degradación de TPH luego de 6 meses de tratamiento con *Aspergillus sp.***

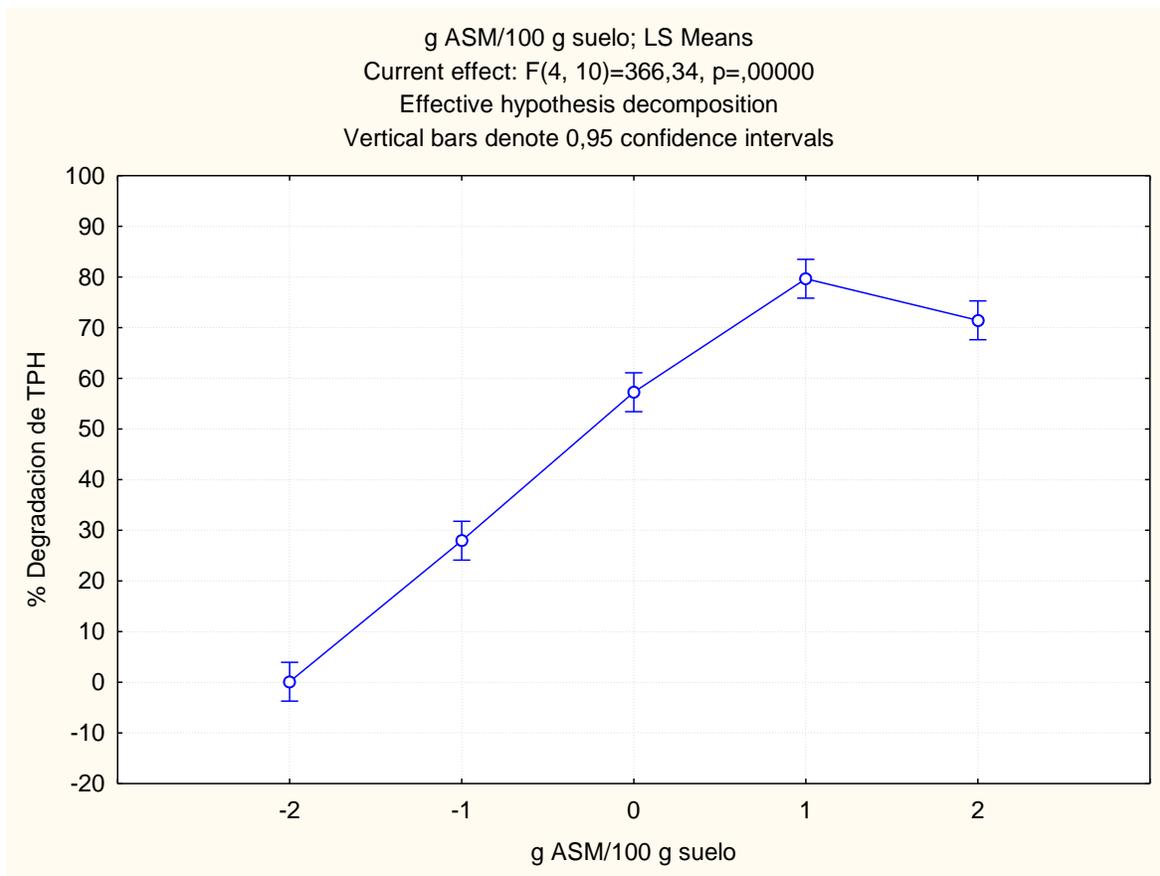
Se comparo la cantidad de aceite presente en el suelo con y sin tratamiento con *Aspergillus sp*

**Tabla1.** Porcentaje de degradación de TPH luego de 6 meses de tratamiento con *Aspergillus spp.* cepa YL12, en función a la cantidad de aceite sucio de motor añadido a 100 g suelo (g ASM/100 g suelo). Categorización de concentraciones (g ASM/100 g suelo): -2= 0, -1= 4.6, 0= 9.2, +1= 15.5, +2= 19.1.

Categorizacion	g Aceite/100		abs ini	abs fin	%TPH
	g Suelo				
-2	0		0,7986	0,818	0,0
-2	0		0,7567	0,8133	0,0
-2	0		0,7945	0,7919	0,3
-1	4,6		1,056	0,8151	22,8
-1	4,6		1,0788	0,802	25,7
-1	4,6		1,2345	0,7975	35,4
0	9,8		0,5006	1,1021	57,0
0	9,8		2,5029	1,0862	56,6
0	9,8		2,5287	1,0575	58,2
1	15,5		2,7471	0,5591	79,6
1	15,5		2,736	0,5558	79,7
1	15,5		2,7288	0,555	79,7
2	21,8		3,0262	0,8723	71,2
2	21,8		2,9725	0,8455	71,6
2	21,8		2,9861	0,8459	71,7

Analisis One way ANOVA

Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	D..	MS	F	p
g ASM/100 g suelo	130E2	4	3249.	366,3	,000*



**Figura 1. Porcentaje de degradación de TPH luego de 6 meses de tratamiento con *Aspergillus spp.* cepa YL12, en función a la cantidad de aceite sucio de motor añadido a 100 g suelo (g ASM/100 g suelo). Categorización de concentraciones (g ASM/100 g suelo): -2= 0, -1= 4.6, 0= 9.2, +1= 15.5, +2= 19.1.**

Se estableció una **prueba de one way ANOVA** demostrando que el tratamiento con *Aspergillus sp.* disminuye significativamente la cantidad de TPH presentes en el suelo contaminado con ASM ( $p \leq 0.0000$ ).

**ANEXO 6. PCA de las Condiciones finales, factores fisicoquímicos evaluados antes y después de la micorremediación con *Aspergillus sp.***

Para explorar si existe diferencia en las condiciones finales del suelo después de ser tratado con *Aspergillus sp.* se realizó un análisis de componentes principales, con las variables de la tabla 13

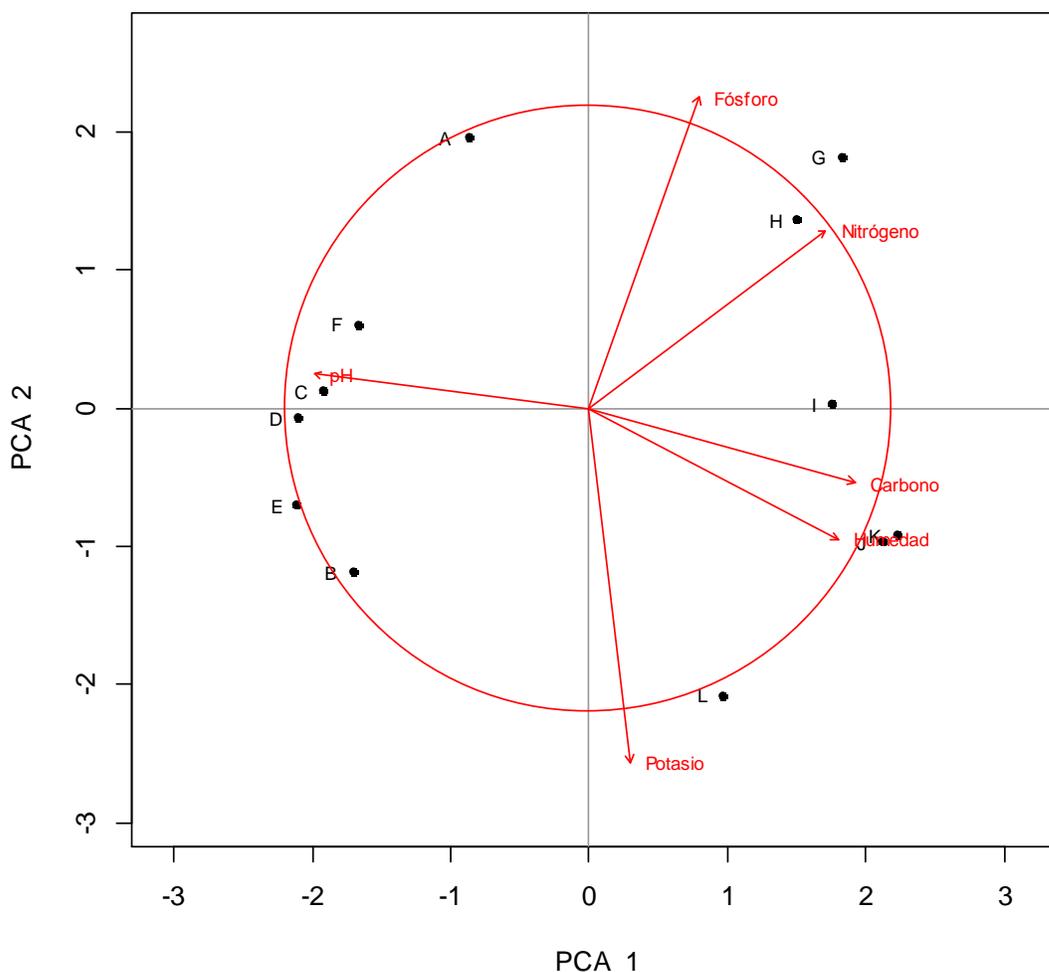
**Tabla 1.** Variables para análisis de PCA

CEPA	LAC	MNPEROX	HUM	PH	C	N	P	K
CON0	0	0	33	7	7	2	40	61
CON1	0	0	37	7	6.5	1	18	91
CON2	0	0	26	7	6.7	1	30	95
CON3	0	0	32	8	7.1	1	30	100
CON4	0	0	27	8	7.2	1	31	131
CON5	0	0	30	8	7	1	35	90
ASP0	0.063	0.48944	39	4	6.2	5	36	60
ASP1	0.053	1.44	43	4	6.1	4	42	91
ASP2	0.056	1.68	55	4	6	3	35	95
ASP3	0.171	1.47	52	4	5.8	3	35	131
ASP4	0.097	2.86	48	4	5.9	4	32	130
ASP5	0.034	2.66	49	4	6.2	1	26	128

Previamente al análisis de PCA se realizó una estandarización de las variables (Gotelli & Ellison, 2004).

Los resultados muestran:

## PCA biplot - Scaling 1



**Figura 1. Análisis de Componentes Principales (C, N, P, K, pH y Humedad relativa) en función a los tratamientos de suelo contaminado con ASM. Tratamientos: A. Suelo, B. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo, C. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo, D. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo, E. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo, F. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo. G. Suelo + *Aspergillus*, H. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, I. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, J. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo+ *Aspergillus*, K. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*, L. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo + *Aspergillus*.**

### Conclusión 1

Las variables que contribuyen más a la variación y por lo tanto las más importantes son: la cantidad de Nitrógeno, Fósforo y Potasio (sus vectores están fuera del círculo de contribución de equilibrio) (Borcard, Gillet, & Legendre, 2011).

De acuerdo al análisis efectuado, las variables que contribuyen más a la variación y por lo tanto las más importantes son: Fósforo y Potasio (sus vectores están fuera del círculo de contribución de equilibrio) (Borcard, Gillet, & Legendre, 2011) (Borcard G. et al 2011).

Los suelos con y sin tratamiento se separan claramente a lo largo del Componente Principal 1 (PCA1) que está correlacionado positivamente con: Carbono, Nitrógeno, Fosforo, Potasio, humedad relativa, presente en el suelo y negativamente con el pH del suelo. Es decir, el tratamiento con *Aspergillus sp.* incremento las concentraciones de Carbono, Nitrógeno, Fosforo, Potasio y la humedad relativa, mientras que el pH disminuyo de 7 a 4.

Los suelos tratados con *Aspergillus sp.* se separan de acuerdo a la cantidad de contaminante a lo largo del Componente Principal 2 (PCA2) que está correlacionado de manera positiva con la cantidad de Fósforo y Nitrógeno y de manera negativa con la humedad relativa y las cantidades de Potasio y Carbono. A menor cantidad de ASM mayor cantidad de Fósforo y a mayor cantidad de contaminante mayor cantidad de Potasio.

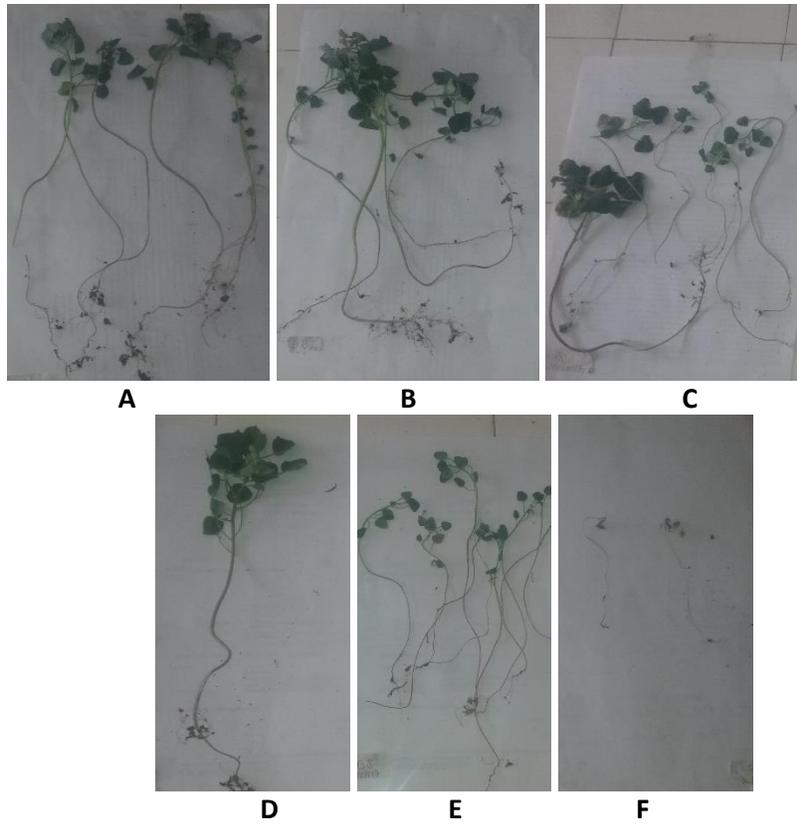
**ANEXO 7. Características morfológicas Longitud del tallo, elongación radicular y numero de hojas evaluados después de la micorremediación con *Aspergillus sp.***



**Figura 1. Desarrollo de los plantines de *Chenopodium quinoa wild* y ASM. A. Suelo, B. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo, C. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo, D. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo, E. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo, F. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo.**



**Figura 1. Desarrollo de los plantines de *Chenopodium quinoa wild* +ASM +YL12. A. Suelo, B. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo + YL12, C. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo + YL12, D. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo + YL12, E. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo + YL12, F. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo + YL12.**



**Figura 2. Desarrollo de los plantines de *Chenopodium quinoa wild*. A. Suelo, B. Suelo + 4,6 g ASM/100 g suelo, C. Suelo + 9,8 g ASM/100 g suelo, D. Suelo + 15,5 g ASM/100 g suelo, E. Suelo + 21,8 g ASM/100 g suelo, F. Suelo + 29,1 g ASM/100 g suelo.**