



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS
MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA



**Eficiencia de la biodegradación de
hidrocarburos totales de petróleo en
microcosmos por hongos aislados de suelo
contaminado**

Tesis presentada para optar el Grado Académico de Maestro en
Ciencias con mención en Microbiología

AUTOR

Blgo. Rafael Oliva Villalobos

ASESOR

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

LAMBAYEQUE, PERÚ

2018

Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos por hongos aislados de suelo contaminado

Blgo. Rafael Oliva Villalobos

AUTOR

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

ASESORA

Presentada a la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para optar el Grado de: MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA.

APROBADA POR:

Dr. Ántero Vásquez García

PRESIDENTE DEL JURADO

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

SECRETARIA DEL JURADO

M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo

VOCAL

Agosto, 2018

DEDICATORIA

*A mi Padre Rafael Oliva Arbulú que
me impulsó a ser un buen profesional
y ahora me guía desde el cielo.*

*A mi madre Domitila Villalobos Llanos,
por creer siempre en mí y por su apoyo
Incondicional en cada paso que doy en
mi vida.*

*A mi esposa Carmen del Pilar Vásquez
Fernández y a mis hijos Rafael, Camila
y Arely que son los motores de mi vida
que me impulsan a ser cada día una
mejor persona y profesional.*

AGRADECIMIENTOS

*A mi familia por darme su apoyo y
Ser comprensiva por la dedicación
que daba a la realización de esta
Tesis.*

*A la Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
por ser siempre una gran maestra y un
ejemplo a seguir. Gracias por volver a
confiar en mí.*

*A mi Colega el Blgo. Hans Jonathán
Contreras Mogollón, por su apoyo
en el desarrollo de la presente tesis.*

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
2.1	Antecedentes de la investigación	3
2.2	Base teórica	7
III.	MARCO METODOLÓGICO	11
3.1	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	11
3.2	Población y muestra.....	11
3.3	Variables	13
3.4	Material biológico	13
3.5	Ubicación	13
3.6	Obtención de muestras de suelo experimental.....	15
3.7	Caracterización del suelo experimental.....	15
3.8	Obtención de cultivos de hongos filamentosos.....	21
3.9	Selección de hongos hidrocarbonoclásticos.....	24
3.10	Biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos	26
3.11	Análisis estadístico de los datos.....	29
IV.	RESULTADOS.....	30

4.1	Características químicas, microbiológicas y toxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	30
4.2	Hongos filamentosos aislados e identificados en el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	30
4.3	Hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos seleccionados	34
4.4	Cinética de la población microbiana y fitotoxicidad de los hidrocarburos totales de petróleo del suelo durante la biodegradación en microcosmos	41
4.5	Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo con menor toxicidad	48
V.	DISCUSIÓN	50
VI.	CONCLUSIONES.....	56
VII.	RECOMENDACIONES	57
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
IX.	ANEXOS	66

Índice de tablas

Tabla 1.	Contenido de hidrocarburos totales, unidades formadoras de colonias de hongos filamentosos y número más probable de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos en suelo contaminado con petróleo, 2018.....	31
Tabla 2.	Nivel de toxicidad de suelo contaminado con petróleo determinado en la germinación de <i>Raphanus sativus</i> L., 2018.....	31
Tabla 3.	Número de aislados de hongos filamentosos en muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en Puerto Eten, Lambayeque, 2018.....	33
Tabla 4.	Frecuencia (%) de géneros de hongos filamentosos cultivables aislados de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en Puerto Eten, Lambayeque, 2018.....	33
Tabla 5.	Rango de la diferencia en el diámetro de las colonias de hongos desarrollados con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono.....	36
Tabla 6.	Cultivos de hongos hidrocarbonoclasticos con la menor diferencia en el diámetro de las colonias desarrolladas en agar Czapek con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono.....	37
Tabla 7.	Biomasa de hongos hidrocarbonoclasticos formada en caldo Czapek con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono durante 20 días de incubación.....	39

Tabla 8.	Cultivos de hongos hidrocarbonoclásticos con la menor diferencia en el peso de la biomasa formada en caldo Czapek con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono.....	42
Tabla 9.	Número más probable de microorganismos totales (NMP g ⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos.....	43
Tabla 10.	Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclásticos (NMP g ⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos.....	44
Tabla 11.	Unidades formadoras de colonia de hongos filamentosos (UFC g ⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos.....	45
Tabla 12.	Índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> L. en microcosmos, en proceso de biodegradación por hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos.....	46
Tabla 13.	Niveles de toxicidad en el índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> L. en microcosmos, en proceso de biodegradación por hongos filamentosos....	47
Tabla 14.	Características del suelo de microcosmos biodegradado con <i>Aspergillus</i> sp.018 durante 90 días.....	49

Índice de figuras

Figura 1.	Diseño experimental completamente aleatorio para determinar la eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por diez cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos	12
Figura 2.	Vista satelital del lugar de muestreo en el distrito de Puerto Eten, región Lambayeque	14
Figura 3.	Muestras de suelo contaminado con petróleo	16
Figura 4.	Muestra de suelo lista para el submuestreo por “cuarteo y amontonamiento”	16
Figura 5.	Caldo nutritivo con microorganismos totales.....	18
Figura 6.	Caldo Bushnell Haas con microorganismos hidrocarbonoclásticos.....	18
Figura 7.	Prueba de germinación de semillas de <i>Raphanus sativus</i> L.....	20
Figura 8.	Submuestras de suelo contaminado con petróleo en caldo Czapek.....	22
Figura 9.	Colonias de hongos filamentosos desarrolladas en agar Czapeck con petróleo.....	22
Figura 10.	Medición del diámetro de la colonia crecido en agar Czapek con petróleo.....	25
Figura 11.	Crecimiento comparativo de hongos filamentosos en medio sólido con (a) y sin (b) petróleo.....	25
Figura 12.	Determinación del peso de la biomasa de hongo filamentoso.....	27
Figura 13.	Inóculo de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos seleccionados.....	27
Figura 14.	Suelo contaminado con petróleo distribuido en microcosmos.....	28

Figura 15. Diversos morfotipos de hongos filamentosos cultivables en agar Czapek con petróleo.....	32
Figura 16. Cultivos puros de hongos filamentosos aislados de suelo contaminado con petróleo.....	32
Figura 17. Frecuencia de hongos filamentosos desarrollados en agar Czapek con petróleo como fuente de carbono.....	35
Figura 18. <i>Aspergillus</i> sp.40 desarrollado en agar Czapek con petróleo (a) y sacarosa (b) como fuentes de carbono.....	35
Figura 19. <i>Cunninghamella</i> sp.53 cultivado en caldo Czapek con petróleo (a) y sacarosa (b) como fuentes de carbono.....	35
Figura 20. Observación microscópica (400x) de <i>Aspergillus</i> sp. 018	76
Figura 21. Observación microscópica (400x) de <i>Penicillium</i> sp. 012.	76
Figura 22. Observación microscópica (400x) de <i>Cunninghamella</i> sp. 092	77
Figura 23. Observación microscópica (400x) de <i>Paecilomyces</i> sp. 046	77
Figura 24. Observación microscópica (400x) de <i>Syncephalastrum</i> sp. 094.....	78

RESUMEN

Objetivo: Determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos por hongos aislados de suelo contaminado.

Método: En la fase descriptiva se determinaron las características químicas, microbiológicas y toxicidad del suelo contaminado, se aislaron e identificaron hongos filamentosos en agar Czapek suplementado con petróleo comercial 1% (CZP) y se seleccionaron los diez cultivos de hongos hidrocarbonoclásticos en base a la biomasa desarrollada en medio sólido y líquido con 1% de petróleo como fuente de carbono. En la fase explicativa se determinó la eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos por diez cultivos seleccionados, bajo un diseño completamente aleatorizado.

Resultados: El suelo contaminado presentó una concentración de TPH ($23\,146\text{ mgkg}^{-1}$), recuento de hongos filamentosos ($2,9 \times 10^4\text{ UFCg}^{-1}$), microorganismos totales ($>1,1 \times 10^7\text{ NMPg}^{-1}$), microorganismos hidrocarbonoclásticos ($1,1 \times 10^6\text{ NMPg}^{-1}$) y un nivel de toxicidad severo en el índice de germinación de rabanito. Se obtuvieron 106 cultivos de hongos filamentosos, identificándose: *Aspergillus* (16,0%), *Penicillium* (12,2%), *Cunninghamella* (11,3%), *Paecilomyces* (10,4%), *Cladosporium* (9,4%), *Syncephalastrum* (8,5%), *Fusarium* y *Rhizopus* (7,6%), *Periconia* (3,8%), *Bipolaris* y *Memnoniella* (2,8%), *Beauveria*, *Gliocladium*, *Monilia* y *Mucor* (1,9%). El 80% de los cultivos fúngicos demostraron hidrocarbonoclasticidad, seleccionándose los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Paecilomyces* y *Syncephalastrum*. En los microcosmos la máxima población de microorganismos totales se alcanzó a los 30 días, de hidrocarbonoclásticos y hongos filamentosos a los 60 días. Los índices de germinación en rabanito se incrementaron y los niveles de toxicidad disminuyeron conforme transcurrió el tiempo. Con *Aspergillus* sp.018 se alcanzó un nivel moderado de toxicidad a los 90 días y 70% de eficiencia en la degradación del TPH.

Conclusión: En microcosmos se demostró la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo por *Aspergillus* sp.018.

Palabras clave: Biodegradación, hongos filamentosos, hidrocarbonoclásticos, microcosmos.

ABSTRACT

Objective: Determine the biodegradation efficiency of total petroleum hydrocarbons in microcosms by fungi isolated from contaminated soil.

Method: In the descriptive phase, the chemical, microbiological and toxicity characteristics of the contaminated soil were determined, filamentous fungi were isolated on Czapek agar supplemented with commercial oil 1% (CZP) and ten cultures of hydrocarbonoclastic fungi were selected based on the developed biomass in solid and liquid medium with 1% oil as a carbon source. In the explanatory phase, the efficiency of the biodegradation of petroleum hydrocarbons in microcosms was determined for ten selected, under a completely randomized design.

Results: The contaminated soil showed a concentration of TPH (23 146 mgkg⁻¹), a filamentous fungus count (2,9 x 10⁴ CFUg⁻¹), total microorganisms (> 1,1x10⁷ NMPg⁻¹), hydrocarbonoclastic microorganisms (1,1 x 10⁶ NMPg⁻¹) and a severe level of toxicity in the radish germination index. 106 cultures of filamentous fungi were obtained, identifying: *Aspergillus* (16,0%), *Penicillium* (12,2%), *Cunninghamella* (11,3%), *Paecilomyces* (10,4%), *Cladosporium* (9,4%), *Syncephalastrum* (8,5%), *Fusarium* and *Rhizopus* (7,6%), *Periconia* (3,8%), *Bipolaris* and *Memnoniella* (2,8%), *Beauveria*, *Gliocladium*, *Monilia* and *Mucor* (1,9%). 80% of the fungal cultures showed hydrocarbonoclasticity, selecting the genders *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Paecilomyces* and *Syncephalastrum*. In microcosms, the maximum population of total microorganisms was reached at 30 days, hydrocarbonoclastic and filamentous fungi at 60 days. Germination rates in radish increased and toxicity levels decreased as time passed. With *Aspergillus* sp.018 a moderate level of toxicity was reached at 90 days and 70% efficiency in the degradation of TPH.

Conclusion: In microcosms the biodegradation of total petroleum hydrocarbons by *Aspergillus* sp.018 was demonstrated.

Keywords: *Biodegradation, filamentous fungi, hydrocarbonoclastic, microcosms.*

I. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos con importancia económica a nivel mundial; no obstante, la industria petrolera colateralmente genera problemas de contaminación del suelo, causados principalmente por falta de mantenimiento de las instalaciones petroleras, exploraciones de alto riesgo en instalaciones y fugas en las líneas de conducción (Díaz, Alarcón, Ferrera, Almaraz y García, 2013, p. 1039). En el suelo, los hidrocarburos del petróleo se acumulan y forman una capa hidrofóbica, reducen e inhiben la cobertura vegetal y modifican las poblaciones microbianas del ambiente edáfico (Adams y Morales, 2008, p. 481). Por esta razón, los hidrocarburos de petróleo deben ser eliminados mediante diversas técnicas como la extracción de hidrocarburos por vacío, lavado del suelo contaminado con agua, incineración y recuperación electrocinética, entre otras (Loya, 2013, pp. 25 - 27); sin embargo, el elevado costo económico es un obstáculo para su empleo.

La biorremediación es una tecnología viable para disminuir el deterioro de la calidad del suelo por el derrame de petróleo (Meneses, 2014, p.1). Consiste en el uso de plantas (Rivera et al., 2004) y microorganismos (Izquierdo, 2013, pp. 127 - 128; Petit, Colina, Yegres, Moran y Richard, 2013, pp. 297 - 298) para neutralizar los contaminantes, disminuyendo o eliminando su toxicidad para los seres vivos (Viñas, 2005, pp. 273 - 274). Entre los microorganismos, los hongos filamentosos mineralizan los hidrocarburos de petróleo hasta dióxido de carbono y agua (Vanishree, Thatheyus & Ramya, 2014, pp. 920 - 921); no obstante, su proliferación y actividad puede ser afectada por la población muy baja. En este contexto, se requiere aislar hongos filamentosos en zonas impactadas, para caracterizarlos, seleccionarlos, propagarlos y

posteriormente reintroducirlas, asegurando al máximo su eficiencia en la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo y biorremediación de los suelos contaminados.

El desarrollo de un proceso de biorremediación eficaz requiere de un protocolo que considera tres etapas: i) estudios básicos en laboratorio, ii) estudios en microcosmos, iii) evaluación del tratamiento en sistemas de mayor escala ya sea planta piloto o instalaciones in situ (Viñas, 2005, p. 156).

PROBLEMA

¿Cuál es la eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos por hongos aislados de suelo contaminado?

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos por hongos aislados de suelo contaminado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1. Caracterizar el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.
- 1.2. Obtener e identificar el género de los hongos filamentosos a partir del suelo contaminado.
- 1.3. Seleccionar los hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos.
- 1.4. Determinar la cinética de la población microbiana y fitotoxicidad de los hidrocarburos totales de petróleo durante la biodegradación.
- 1.5. Determinar la eficiencia de la biodegradación en el suelo del microcosmos de menor toxicidad.

HIPÓTESIS

Los hongos aislados de suelo contaminado degradan los hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos, alcanzando una eficiencia mayor de 50%.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Microorganismos hidrocarbonoclásticos, HCT's, se aislaron de suelo rizosférico de *Chamaecrista nictitans* y *Panicum* sp. para determinar la remoción de petróleo por efecto de la interacción *Phaseolus vulgaris* L. "frijol" - *Zea mays* L. "maíz" y bacterias - hongos hidrocarbonoclásticos. Los microorganismos se aislaron en medio mineral con petróleo como fuente de carbono y se identificaron fenotípicamente, obteniéndose dos consorcios formados por bacterias (5×10^{10} UFC mL⁻¹) y hongos (4×10^8 UFC mL⁻¹). Éstos se inocularon inmediatamente después de la siembra (dds) de semillas de frijol y maíz en suelo contaminado con petróleo y a los 28 y 48 días se cuantificaron las poblaciones microbianas y el TPH. Se seleccionaron cinco cepas de bacterias y tres de hongos HCT's para constituir los consorcios 1 (tres de *Pseudomonas* y dos de *Agrobacterium*) y 2 (dos de *Trichoderma*, uno de *Aspergillus* y uno de *Mucor* sp.). A los 28 días la mayor concentración de TPH degradado ($317 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se alcanzó con frijol- maíz-testigo y a los 48 días con frijol- maíz-bacteria ($256 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Las plantas y microorganismos HCT's incrementaron la remoción del petróleo en el suelo contaminado (Hernández et al., 2003).

La descontaminación de suelo con petróleo fue investigada sembrando *Echinochloa polystachya* "pasto alemán" junto a poblaciones autóctonas de bacterias y hongos rizosféricos. El ensayo se realizó en invernadero, con un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento; tres concentraciones de petróleo (98, 50 000, 100 000 mg kg⁻¹), cuatro tipos de inoculo (sin microorganismos, bacterias, hongos, bacterias-hongos) y dos de plantas (con y sin pasto alemán). Las

bacterias, hongos y bacterias - hongos presentaron las mayores poblaciones a los 120 días, con diferencias significativas en el tratamiento pasto alemán en suelo con 50 000 mg kg⁻¹ de TPH. Con el consorcio bacterias-hongos la población de bacterias disminuyó una unidad exponencial, pero los hongos aumentaron tres unidades exponenciales. La mayor degradación de TPH (48%) se alcanzó a los 120 días en el suelo con 100 000 mg kg⁻¹ y pasto alemán inoculado con bacterias-hongos. Se concluyó que la asociación de bacterias, hongos y pastos forrajeros es una alternativa para la limpieza de suelos contaminados con petróleo (Rivera et al., 2004).

El efecto de *Glomus intraradices*, un consorcio bacteriano, *Trichoderma viride* y la bioestimulación se investigó en el crecimiento de *Casuarina equisetifolia* en suelo con 7 500 mg kg⁻¹ de diésel. El experimento incluyó 30 tratamientos, en invernadero, durante 120 días. El inoculo de *G. intraradices* fue obtenido con raíces de *Plectranthus coleoides*, *T. viride* en agar papa dextrosa y el inóculo bacteriano en caldo nutritivo. La bioestimulación se realizó con los fertilizantes inorgánicos Triple 17 y Floranid. El diésel disminuyó significativamente la altura de las plantas (40%) y biomasa total (52%). *G. intraradices* y el consorcio bacteriano incrementaron significativamente la altura y biomasa total. La bioestimulación con Triple 17 junto a los tres microorganismos en conjunto estimuló el crecimiento vegetal en ausencia de diésel, mientras que en presencia del contaminante a la bioestimulación con el consorcio bacteriano o con *T. viride* les correspondió el mayor crecimiento vegetal. La bioestimulación y bioaumentación con bacterias y hongos proporcionaron mayor tolerancia a *C. equisetifolia* en presencia de diésel (Díaz et al., 2013).

La diversidad de bacterias y hongos se investigó en suelos impactados con petróleo. Se colectaron muestras en pozos con emanación de petróleo y en zonas no contaminadas y se contaron las UFC de bacterias y hongos en agar LB complementado (1 g L^{-1}) con Ciprofloxacina y Fluconazol, respectivamente y fijadoras de nitrógeno en agar Burk's. En las muestras de áreas impactadas el número de bacterias fue de $3,32 \times 10^4 - 4,85 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$; $1,33 \times 10^4 - 7,10 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$ de hongos y $2,58 \times 10^4 - 7,28 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$ de fijadoras de nitrógeno. En las áreas no impactadas los rangos fueron de $1,60 \times 10^4 - 9,77 \times 10^6$; $8,36 \times 10^4 - 1,46 \times 10^6$ y $1,19 \times 10^6 - 4,07 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$, respectivamente. Se demostró que la contaminación con petróleo impacta negativamente la densidad microbiana (Oropeza, 2010).

En suelos cercanos a pozos de extracción de petróleo se aislaron hongos, con el objetivo de seleccionar aquellos potencialmente utilizables para la biorremediación de aguas y suelos contaminados. Las muestras de suelo se sembraron en medio mineral suplementado con 0,1; 0,5 y 1% de petróleo, aislándose e identificándose fenotípicamente los hongos desarrollados a 22° C , durante 3 días. Con éstos se determinó el antagonismo entre ellos, el índice de actividad emulsificante y el contenido de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en microcosmos en agua y suelo inoculados con hongos con y sin nutrientes (100C:10N:1P). Transcurridos 25 días, se registró reducción en el TPH, alcanzado 27 - 45% con los hongos más nutrientes y 39% con el control suelo con nutrientes; 11 - 28% con los hongos sin nutrientes y 7% en el control suelo sin nutrientes. Se demostró la reducción del TPH por los hongos investigados y la adición de nutrientes favoreció la biodegradación (Vega, 2011).

Hongos aislados de aguas contaminadas y podredumbre de árboles, se investigaron en su capacidad para degradar antraceno, fluoranteno y pireno. Los hongos se cultivaron en agar Czapek (CZ) con una emulsión de diésel comercial 5%, durante 7 días, a 32° C y se seleccionaron por su capacidad para crecer en el mismo medio con 0,5 mL⁻¹ de antraceno, fluoranteno o pireno, incluyendo un control positivo con sacarosa y negativo sin alguna fuente de carbono. Después de seleccionar los tres hongos con mayor tamaño de la colonia se sembraron en medio CZ líquido complementado y a los 5, 10, 15 y 20 días de incubación se determinó el peso de la biomasa seca y cantidad del contaminante residual. El hongo con la mayor degradación se investigó en un ensayo en microcosmos y se cuantificó el contaminante residual a los 15, 30, 45, y 60 días. Se aislaron e identificaron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* y *Fusarium* sp. Todos los hongos, a excepción de *Fusarium* sp. crecieron en el agar CZ. *A. versicolor* alcanzó 15 - 20% de consumo de HPA y en microcosmos 5 y 10% de degradación para antraceno y fluoranteno, respectivamente, considerándose con potencial para la biorremediación de suelos contaminados con HPA (Petit et al., 2013).

En un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo se aislaron hongos, con el objetivo de investigar su potencial hidrocarbonoclástico. La actividad enzimática se investigó con agar mineral ABTS (lacasa), agar mineral ácido tánico (polifenol oxidasa) y agar mineral Orange Red (manganeso peroxidasa). Asimismo, se realizaron tres ensayos de microcosmos en recipientes de vidrio con 1 200 g de suelo, incluyendo: Bioaumentación (B) con 10⁴ esporas por gramo de suelo, Bioestimulación (BS) con agua 40% de la capacidad de campo del suelo y KNO₃ y K₂HPO₄ para lograr C:N:P de 600:10:1 y control (C) con suelo contaminado seco. Se tomaron muestras para el análisis químico y microbiológico a los 0, 30, 60 y 120 días. Se aislaron e identificaron

Penicillium sp., *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* sp. y *Fusarium oxysporum*. Se demostró actividad lacasa en *F. oxysporum* y *A. alternata* y polifenol oxidasa en *A. alternata*. El TPH disminuyó en 68,9% con bioaumentación; 28,1% con bioestimulación y 2,6% en el control. Se evidenció una reducción notable de la toxicidad con la bioaumentación, pero no con la bioestimulación (Medaura, Guivernau, Boldú, Moreno y Viñas, 2013).

Las propiedades de biodegradación de hidrocarburos por hongos se investigaron en suelos contaminados de la Amazonia. Los hongos se sembraron en agar papa dextrosa y se incubaron por 14 días. La capacidad para degradar el petróleo se investigó sembrando los hongos en caldo sales minerales con diferentes concentraciones de petróleo crudo y diésel y se determinó el efecto de la concentración de NPK (2, 4, 6 g L⁻¹), pH (3,4; 5,5; 7,8), temperatura (8, 25, 37, 55 °C) y porcentaje del contaminante (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5%). En el ensayo, con petróleo crudo se alcanzaron 9,4 x 10⁶ esporas mL⁻¹ con NPK 6; 11,1 x 10⁶ esporas mL⁻¹ a pH 7,0; 1,8 x 10⁷ esporas mL⁻¹ a 55 °C y 9,5 x 10⁶ esporas mL⁻¹ con 0,5% del contaminante. Con diésel se alcanzaron 2 x 10⁷ esporas mL⁻¹ con NPK 4; 4,24 x 10⁷ esporas mL⁻¹ a pH 3,0; 3,12 x 10⁷ esporas mL⁻¹ a 25 °C y 9,27 x 10⁷ esporas mL⁻¹ con 2,0% contaminante. Se demostró la capacidad hidrocarbonoclástica de *Penicillium* sp. (Montero, 2015).

2.2 Base teórica

La teoría de Infalibilidad Microbiana, sostiene que todo compuesto orgánico biológicamente sintetizado puede ser descompuesto por los microorganismos (Alexander, 1994, p. 491). En este contexto, la comunidad microbiana desempeña un papel importante en el flujo de energía, transformación de nutrientes y reciclaje de elementos en el ambiente (Filip, 2002, p.169) y los contaminantes como el petróleo, pueden ser degradados por los entes biológicos hasta dióxido de carbono y agua

(Coyne, 2000).

El crudo de petróleo es una mezcla de compuestos que se pueden separar en cuatro fracciones SARA: saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos (Pernía, Demey, Inojosa y Naranjo, 2012, p.25). El petróleo, es biodegradado en aerobiosis con mayor eficiencia, pero también en anaerobiosis. Los contaminantes, que pueden ser degradados o transformados por los seres vivos son susceptibles de ser eliminados mediante procesos de biorremediación cuyo fundamento está en la serie de reacciones de óxido-reducción que se producen en la cadena respiratoria o transportadora de electrones de la célula. La cadena la inicia el compuesto hidrocarbonado como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula lo consume y degrada. Los aceptores son el oxígeno, los nitratos, hierro III, sulfatos y dióxido de carbono en procesos respiratorios y anaerobios, respectivamente (Braibant, 2004, p.27; Ponce, 2014, p.55).

En un suelo con contaminación recurrente, generalmente las poblaciones microbianas autóctonas se seleccionan en favor de la metabolización del contaminante. La bioestimulación de esta población microbiana acelera la biodegradación de los contaminantes, siempre y cuando, éstos no sean recalcitrantes, en cuyo caso se requiere la bioaumentación o inoculación de microorganismos con capacidad degradativa especializada, propios del sitio contaminado e incrementados en el laboratorio (Viñas, 2005, p.142; Ortega, 2012, p.21). La bioinoculación es la incorporación de microorganismos comerciales en un lugar, para biodegradar un contaminante. Este proceso es una técnica de biorremediación; no obstante, la falta de adaptación de las poblaciones microbianas exógenas, no garantiza su supervivencia, por lo que se prefiere la bioaumentación. Con esta técnica, los microorganismos autóctonos son aislados, caracterizado e incrementados en laboratorio y luego

reintroducidos en los ambientes contaminados (Carreño, Mendoza, Mendoza y Villanueva, 2009; Ortega, 2012).

El primer reporte de crecimiento de hongos en hidrocarburos lo realizó Miyoshi en 1985, cuando observó *Botrytis cinerea* sobre parafina (Pernía et al., 2012, p.3). Posteriormente se ha demostrado la degradación de hidrocarburos por *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Mucor* (Hernández et al., 2003, p.495), *Rhizopus* (Lotfinasabasl, Gunale, & Rajurkar, 2012, p.187), *Cladosporium*, *Alternaria* (Chaudhry, Luhach, Sharma & Sharma, 2012, p.182), *Paecilomyces* (Petit et al., 2013, p.1), *Glomus* (Díaz et al., 2013, p.1039), *Fusarium* (Hasan, 2014, p.46) y *Penicillium* (Montero, 2015, p.65).

La implementación de una tecnología de biorremediación requiere de etapas: i) investigación del emplazamiento en relación con los contaminantes, el tipo de suelo y el entorno, es decir caracterización físico-química del suelo, estudio geotécnico e hidrogeológica y análisis de riesgos, ii) desarrollo de ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio, iii) desarrollo de ensayos a escala piloto e iv) implementación de la tecnología de biorremediación seleccionada. Los ensayos de tratabilidad son un conjunto de experimentos a escala de laboratorio previos a la implementación de cualquier tecnología de biorremediación. Su objetivo es determinar si un tratamiento es apropiado para la descontaminación, requiriéndose caracterizar las poblaciones microbianas y la biodegradabilidad de los contaminantes del suelo, así como también, se debe investigar la influencia de los parámetros físico-químicos y biológicos que afectan la biodegradación (Viñas, 2005, p.156).

En la fase I de los ensayos de tratabilidad se investiga la presencia de poblaciones microbianas, la actividad metabólica real y potencial y la biodegradabilidad de los contaminantes presentes en el suelo. En la fase II se optimizan las condiciones físico-químicas (húmedas, aireación, nutrientes inorgánicos) y biológicas (posibilidad

de inocular poblaciones microbianas autóctonas) que pueden condicionar el proceso de biodegradación durante la biorremediación de suelos contaminados. La información obtenida en la fase I permite decidir en un corto intervalo si es factible la aplicación de la biorremediación. La fase II permite establecer las condiciones óptimas de biorremediación en ensayos de microcosmos (Ponce, 2014, p.54).

Los microorganismos degradadores son inoculados en los suelos impactados con el objetivo de disminuir al máximo la concentración del contaminante y lograr la recuperación del suelo. Esta condición se puede evidenciar con los ensayos de ecotoxicidad, que corresponden a ensayos de toxicidad aguda y de genotoxicidad. Los primeros se realizan en bacterias (Microtox), invertebrados (Lumbrídeos) y plantas superiores como *Lactuca sativa* y *Lemna minor*. Los ensayos de genotoxicidad más comunes son el de teratogénesis en embriones de *Xenopus laevis* (FETAX), el “Comet test” que detecta lesiones en el ADN y los ensayos de mutagénesis como el Test de Ames (Lladó, 2012, pp. 53 - 54).

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. En la primera fase descriptiva se determinaron las características químicas, microbiológicas y toxicidad del suelo experimental contaminado con hidrocarburos de petróleo, se aislaron e identificaron hongos filamentosos y se seleccionaron los hongos hidrocarbonoclásticos. En la segunda fase explicativa se determinó la eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos por diez cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos seleccionados.

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental “Sólo Después” (Vásquez, Díaz, Vásquez y Vásquez, 2012) y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández, Fernández y Baptista, 2014). Los tratamientos fueron 12, correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2: Testigo abiótico (formaldehído), T3 a T12: cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos (Figura 1).

3.2 Población y muestra

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en el distrito de Puerto Eten, región Lambayeque y se investigaron 54 muestras probabilísticas de suelo colectadas durante febrero de 2017. El número de muestras fue calculado (Vásquez et al., 2012) tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada por el investigador en un muestreo piloto.

T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T1	T2
T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T1	T2	T3
T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T1	T2	T3	T4

T1: Testigo absoluto

T2: Testigo abiótico

T3 a T12: Cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos

Figura 1. Diseño experimental completamente aleatorio para determinar la eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por diez cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos.

En la investigación explicativa la población fueron los hongos hidrocarbonoclásticos aislados del suelo contaminado durante febrero de 2017 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por diez cultivos de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos.

3.3 Variables

a. Variables de la fase descriptiva

Variables cuantitativas: Hidrocarbonoclasticidad

b. Variables de la fase explicativa

Variable independiente: Diez cultivos de hongos hidrocarbonoclásticos

Variable dependiente: Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo.

3.4 Material biológico

Hongos filamentosos aislados de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo y semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito”.

3.5 Ubicación

En la periferia del terminal de ventas petrolera Eten, carretera Playa Lobos Km. 5, en el distrito de Puerto Eten (Figura 2), región Lambayeque, se colectaron 54 muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo. Puerto Eten está comprendido entre los paralelos 6° 56' 30" latitud sur y 82° 1' 24" longitud oeste. La zona presenta un clima desértico subtropical, con una temperatura media de 21°C (Instituto Nacional de Defensa Civil, 2003).



Figura 2. Vista satelital del lugar de muestreo en el distrito de Puerto Eten, región Lambayeque (<https://www.google.com.pe/maps/@-6.9545445,-79.8530504300a,35y,90h,39.45t/data=!3m1!1e3>).

3.6 Obtención de muestras de suelo experimental

Las muestras de suelo contaminado, de aproximadamente 1 kg se obtuvieron con una palana, eliminando los 2 cm superficiales y colectando el suelo a una profundidad de 5 cm en 54 puntos de muestreo ubicados aleatoriamente (Contreras y Carreño, 2018). Las muestras se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas y se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hacia el laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en Lambayeque.

3.7 Caracterización del suelo experimental

En cada una de las 54 muestras de suelo contaminado se colectaron 50 g, los que se mezclaron entre sí para constituir una muestra compuesta de 2 700 g con la que se realizó el análisis químico y microbiológico y se determinó la toxicidad de los contaminantes del suelo. La obtención de submuestras se realizó según el método de “cuarteo y amontonamiento” (Ayasta y Bernable, 2012). Las muestras de suelo se depositaron en un papel bond, para separar las piedras y disgregar los terrones. La masa del suelo del extremo inferior derecho se mezcló cinco veces con el superior izquierdo, el inferior izquierdo con el superior derecho, el superior con el inferior y el derecho con el izquierdo (Figuras 3, 4). Después de la mezcla se formó un “montón” con el suelo y se tomaron las submuestras requeridas.

El análisis químico del suelo contaminado se realizó en una submuestra de 1 kg, determinándose la cantidad de hidrocarburos totales (TPH mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un cromatógrafo de gases modelo 6890N (Net Work GC system) y un espectrómetro de masas modelo 5975 inert XL (Agilent Technologies).



Figura 3. Muestras de suelo contaminado con petróleo.



Figura 4. Muestra de suelo lista para el submuestreo por “cuarteo y amontonamiento”.

El análisis microbiológico se realizó en submuestras de 10 g cada una, con las que se determinó el número más probable (NMP g⁻¹) de microorganismos totales e hidrocarbonoclásticos y el número de unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹) de hongos filamentosos (Tapia, 2002). Las submuestras se depositaron en matraces con 90 mL de solución salina, NaCl 0,85% (p/v) obteniéndose suspensiones del suelo, con las que se realizaron diluciones decimales hasta 10⁻⁸.

Para determinar el número más probable de microorganismos totales, 1 mL de las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ se inocularon por triplicado en tubos de 150 x 20 mm conteniendo 5 mL de caldo nutritivo (Anexo 2). Para el número más probable de microorganismos hidrocarbonoclásticos, 1 mL de las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ se inocularon por triplicado en tubos con 5 mL de caldo Bushnell Haas (Anexo 2) e inmediatamente después en cada tubo se vertieron 0,025 mL (25 µL) de petróleo como fuente de carbono (Cabanillas y Pissani, 2015). Todos los tubos se incubaron a 30°C por 10 días y la turbidez del medio de cultivo se consideró positivo a la presencia de microorganismos totales (Figura 5) e hidrocarbonoclásticos (Figura 6), realizándose el cálculo correspondiente (Anexo 3) según el método estándar (Huapaya, 2011).

Para el recuento de hongos filamentosos, 0,1 mL de las diluciones 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ se sembraron por triplicado en placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA). Las placas de Petri se incubaron a 30°C durante 96 horas y se contaron las unidades formadoras de colonias en aquellas que presentaron 30 a 300 colonias. Con los valores obtenidos se realizó el cálculo correspondiente (Anexo 4), según International Standard Organization ISO 7218 (Fundación General Universidad de Salamanca, 2017) y el resultado se expresó en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC g⁻¹).



Figura 5. Caldo nutritivo con microorganismos totales.



Figura 6. Caldo Bushnell Haas con microorganismos hidrocarbonoclasticos.

La toxicidad de los contaminantes del suelo experimental se determinó por triplicado en submuestras de 10 g (Salas y Meza, 2011), utilizando semillas de rabanito, a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación (Flores y Benites, 2015). En cuatro placas de Petri con papel filtro esterilizado y humedecido con agua destilada se depositaron 25 semillas por placa (Figura 7), se taparon y mantuvieron a temperatura ambiental (28°C), humedeciéndolas interdiariamente, hasta obtener el máximo de germinación, que fue 100%, después de 120 horas.

Para el ensayo de toxicidad, en placas de Petri, se depositaron las submuestras de 10 g de suelo, se humedecieron con 12 mL de agua destilada y en cada placa, con una pinza se depositaron 25 semillas de rabanito. Todas las placas de Petri se cubrieron con papel metálico durante 120 horas, a 30°C, cada 48 horas se vertieron 5 mL de agua destilada para mantener la humedad requerida. A las 120 horas se contaron las semillas germinadas y se midió la longitud de las radículas emergidas, calculándose (Llanos, 2012) el porcentaje relativo de germinación (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG):

$$PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas en el suelo contaminado}}{\text{Número de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Longitud promedio de radículas en el suelo contaminado}}{\text{Longitud promedio de radículas en el testigo}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

La fitotoxicidad se determinó con el criterio de interpretación (Rodríguez, 2012): IG ≥ 80% indica que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración, 80% > IG > 50% se interpreta como presencia moderada de estas sustancias y un IG ≤ 50% indica fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo (Purisaca y Quevedo, 2015).

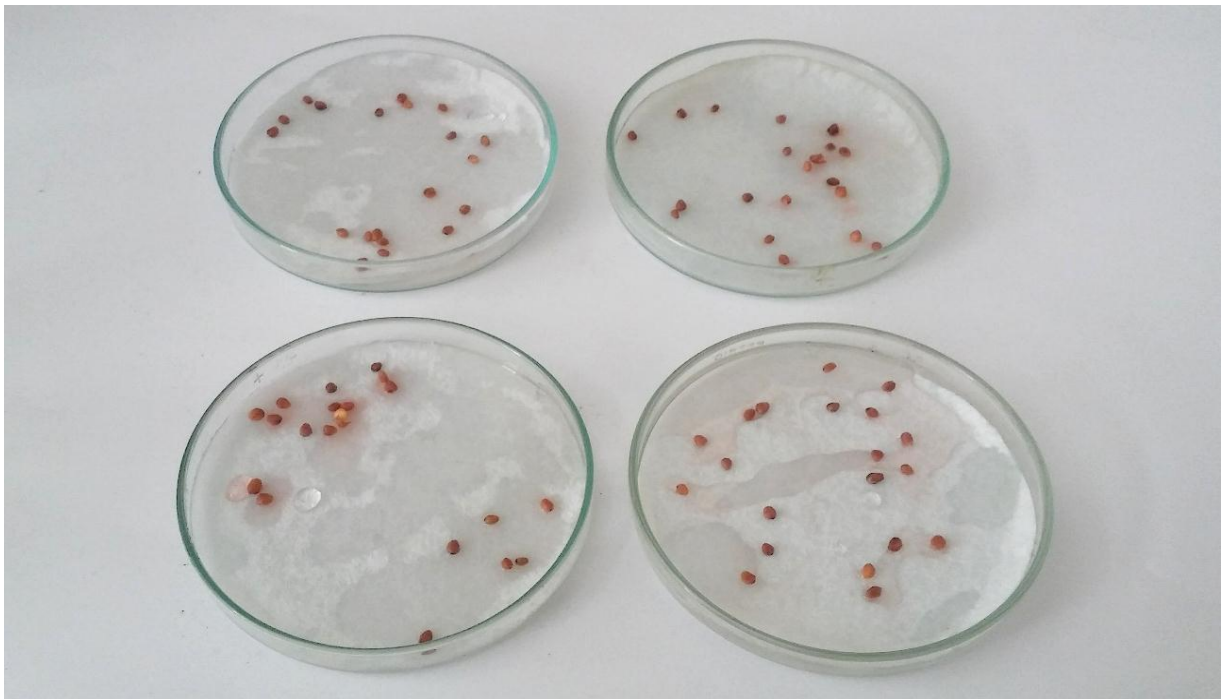


Figura 7. Prueba de germinación de semillas de *Raphanus sativus* L.

3.8 Obtención de cultivos de hongos filamentosos

Los hongos filamentosos de las muestras de suelo contaminado, se enriquecieron (Galindo y Llontop, 2015), depositando 10 g de cada muestra en 90 mL de caldo Czapek (Figura 8) e incubando a 30°C, por 72 horas (Petit et al., 2013), con agitación manual diaria durante 10 minutos. Después de la incubación, se tomaron alícuotas de 0,1 mL y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría en agar Czapek suplementado con petróleo comercial 1% (CZP) como fuente de carbono y energía y antibiótico Cloranfenicol (Anexo 2), incubándose a 30°C hasta por 10 días. Las colonias de los hongos desarrolladas (Figura 9) se agruparon según sus características macroscópicas, se seleccionó un representante de cada morfotipo, se cultivaron en PDA – 1% petróleo (Anexo 2) durante 7 días y constituyeron los cultivos puros de hongos filamentosos cultivables.

La identificación de los hongos se realizó con cultivos desarrollados de una espora o cultivos monospóricos (Arias y Piñeros, 2008). Un fragmento de 0,1 cm² del micelio del hongo cultivado en PDA durante 5 días se depositó en un tubo con 5 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v) y se homogenizó durante 1 minuto. Inmediatamente después se tomó 0,1 mL de la suspensión de conidios y se llevó a un segundo tubo con 5 mL de solución salina esterilizada, se homogenizó durante 1 minuto, se tomó una alícuota con el asa bacteriológica en anillo y se sembró por agotamiento y estría en placas de Petri con PDA. La incubación se realizó a 30°C y cada 6 horas, las placas de Petri se observaron bajo el microscopio óptico para detectar las esporas germinadas, que independientemente se transfirieron a tubos con PDA, continuando con la incubación hasta completar el desarrollo de la colonia.



Figura 8. Submuestras de suelo contaminado con petróleo en caldo Czapek.

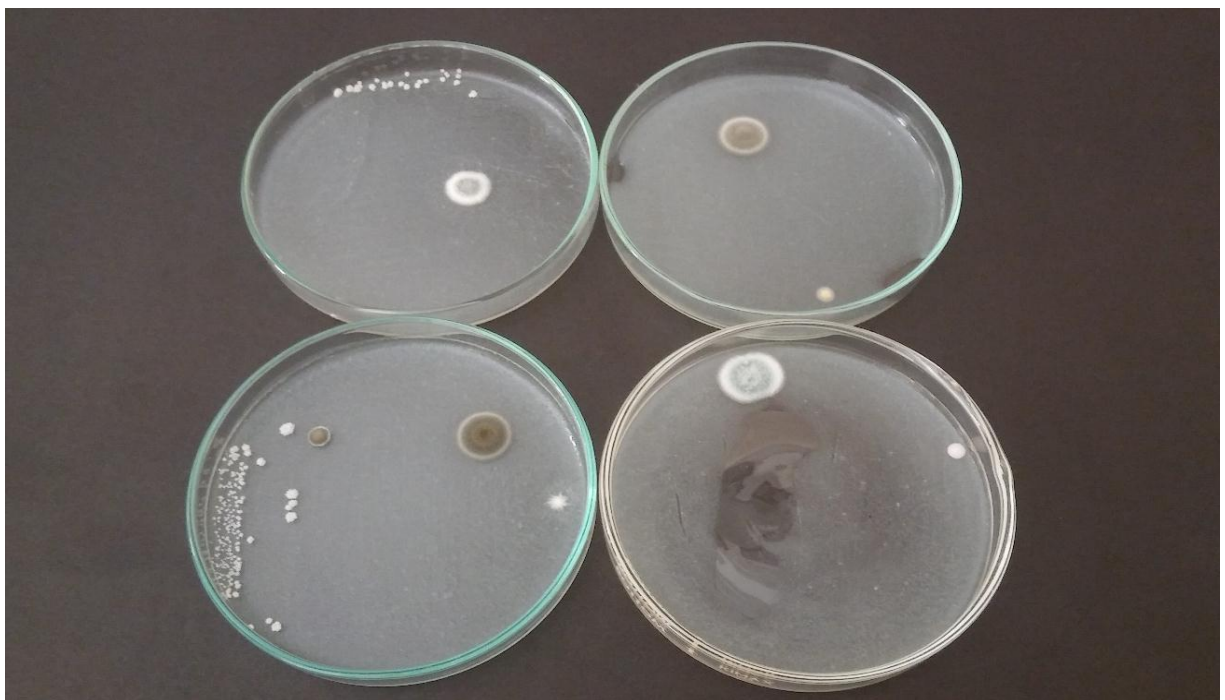


Figura 9. Colonias de hongos filamentosos desarrolladas en agar Czapeck con petróleo.

La identificación del género de los hongos filamentosos aislados se realizó en microcultivos, con ayuda de las claves taxonómicas de Barnett & Hunter (1998). Mediante tinciones con azul de lactofenol se determinó la morfología del micelio, tipo de conidio, fiálides y clamidosporas producidas. Asimismo, se observaron las características macroscópicas de las colonias: aspecto, color y producción de pigmento de los hongos en PDA (Corrales, Sánchez, Cuervo, Joya y Márquez, 2012).

La técnica de microcultivo en lámina (Arias y Piñeros, 2008) se realizó en una cámara húmeda, consistente en una placa de Petri esterilizado conteniendo un triángulo de vidrio como soporte de una lámina portaobjetos y en cuya parte central se colocó un bloque de PDA de 0,5 cm². Con el asa micológica se tomó una pequeña porción de cultivo del hongo monospórico y se depositó en el centro de uno de los lados del agar. El mismo procedimiento se repitió en los tres lados restantes. Posteriormente, el bloque de agar fue cubierto con una laminilla cubreobjetos, en el fondo de la placa de Petri se depositó un trozo de algodón esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada y se incubó a temperatura ambiente (25°C) por 4 días.

Para realizar el montaje, la lámina cubreobjetos se levantó con una pinza y se depositó sobre una lámina portaobjetos conteniendo en el centro una gota de azul de lactofenol. El exceso de colorante se eliminó con papel filtro y después de 5 minutos de reposo se observó con objetivo de 40X para identificar el género correspondiente (Barnett & Hunter, 1998). Los hongos se cultivaron en PDA inclinado, suplementado con petróleo 1%, a 30°C, por 7 días y constituyeron los cultivos puros de hongos filamentosos que se guardaron en refrigeración (8°C).

3.9 Selección de hongos hidrocarbonoclásticos

Los hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos fueron seleccionados con base al diámetro de la colonia desarrollada y la biomasa formada en medio de cultivo con y sin petróleo. Para la prueba comparativa en medio sólido, los hongos se cultivaron en agar Czapek con petróleo o CZP, a 30°C por 4 a 7 días, teniendo como control positivo al agar Czapek con sacarosa. Después de incubar a 30°C por 4-7 días se evaluó el crecimiento (Petit et al., 2013), midiendo el diámetro de la colonia y relacionándolo con el control positivo (Figuras 10, 11). De esta manera, para determinar la biomasa, se preseleccionaron los 30 cultivos de hongos que presentaron los diámetros de las colonias similares en agar CZP y agar Czapek con sacarosa y los que presentaron la menor diferencia entre éstos.

En medio líquido los hongos filamentosos preseleccionados fueron considerados hidrocarbonoclásticos o degradadores de hidrocarburos de petróleo, cuando utilizaron el contaminante como fuente de carbono y energía (Llanos, 2012). El inóculo de los hongos se obtuvo con cultivos de 10 días de crecimiento en PDA con 1% de petróleo (tubos de 150 x 20 mm) a los que se les agregaron 10 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v) para obtener una suspensión de conidios, que se filtró en gasa esterilizada y su concentración se estandarizó a 10^4 conidios mL⁻¹. La estandarización del inóculo se realizó mediante recuento de células en la cámara de Neubauer. Se obtuvo una suspensión de conidios en Tween 80 al 0,03%, se diluyó hasta 10^{-2} en tubos Eppendorf, de la última dilución se tomaron 50 µL y se realizó el recuento de conidios (Corrales et al., 2012).

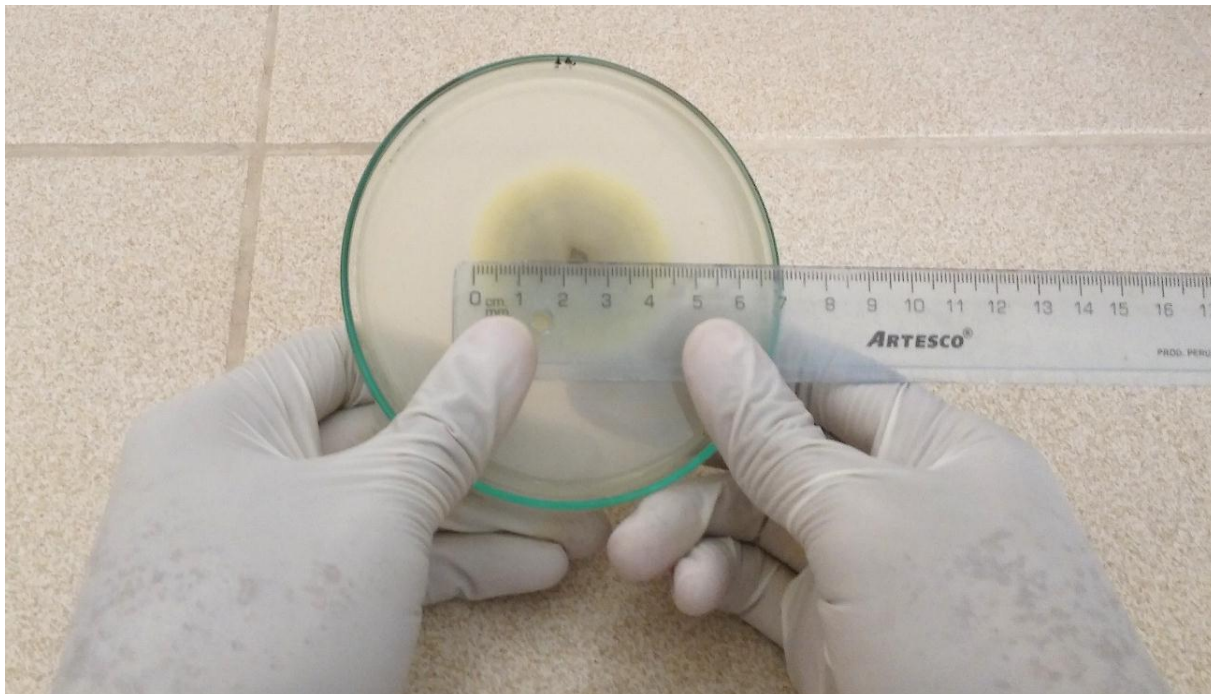


Figura 10. Medición del diámetro de la colonia crecido en agar Czapek con petróleo.

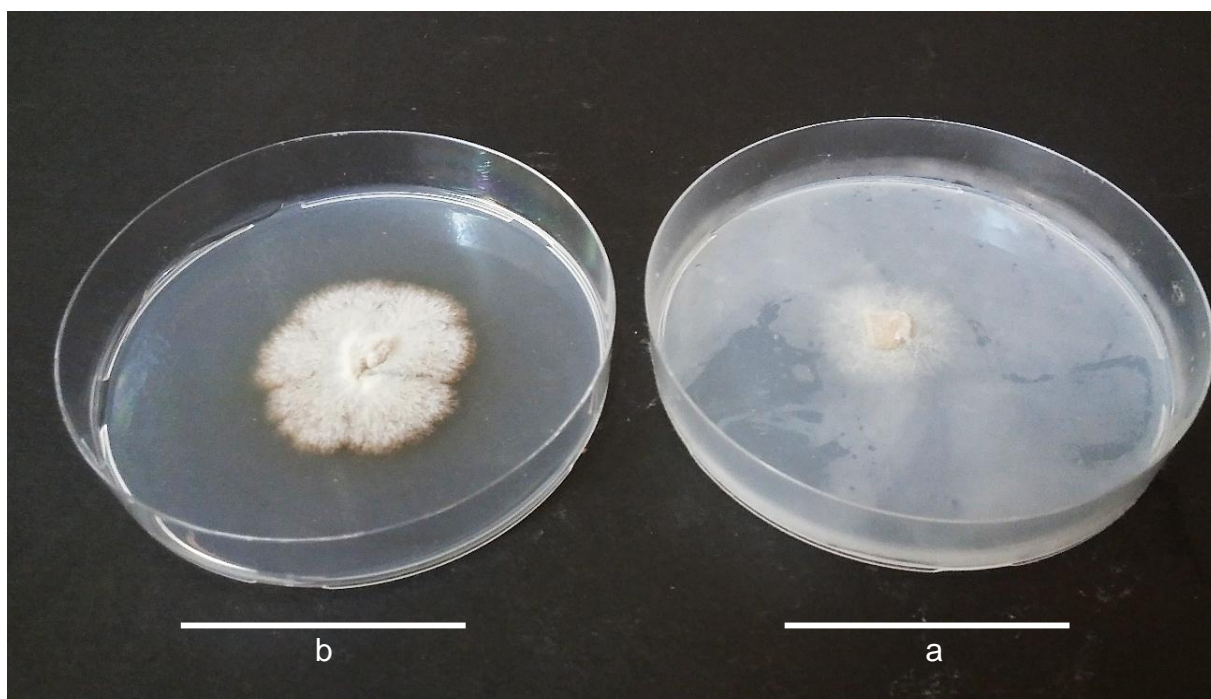


Figura 11. Crecimiento comparativo de hongos filamentosos en medio sólido con (a) y sin (b) petróleo.

El inóculo de los hongos fue cultivado por triplicado en frascos de 100 mL de capacidad con 50 mL de caldo CZP, teniendo como control positivo el caldo Czapek con sacarosa, control negativo caldo Czapek sin fuente de carbono y control absoluto el caldo Czapek sin inóculo. Transcurridos 5, 10, 15 y 20 días de incubación, a 30°C con agitación diaria, se tomaron alícuotas, se filtraron y en una balanza de precisión, se determinó el peso de la biomasa (Figura 12) previamente deshidratada en estufa a 70°C, hasta alcanzar peso constante (Tapia, 2002; Petit et al., 2013), seleccionándose los diez hongos con los mayores valores.

3.10 Biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos

El inóculo de los diez hongos filamentosos seleccionados (Figura 13) se obtuvo con cultivos de 10 días de crecimiento en placas de Petri con PDA más 1% de petróleo, a las que se les agregaron 10 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v) por cuatro veces consecutivas, para realizar un lavado de la biomasa desarrollada. Ésta se filtró con una gasa esterilizada y su concentración se estandarizó a 10^4 conidios mL⁻¹ mediante recuento de células en la cámara de Neubauer (Corrales et al., 2012).

El suelo experimental o contaminado con petróleo (4,2 kg) se mezcló con pajilla de *Oryza sativa* L. “arroz” (460 g) en la proporción 1:1 (v/v) y se distribuyó (1,700 kg en cada uno) en 36 “microcosmos” (Petit et al., 2013) constituidos por recipientes de PET de 3 L de capacidad, previamente acondicionados y pintados de negro (Figura 14).

En cada microcosmos se depositaron 170 mL del inóculo fúngico correspondiente, el contenido se mezcló con una espátula y se tapó con bolsas de polietileno negro durante 24 horas. Al testigo absoluto se le agregó agua destilada (170 mL) y al testigo abiótico 170 mL de formaldehído al 5%. Inmediatamente después de la inoculación se tomaron submuestras de 10 g para el análisis microbiológico,

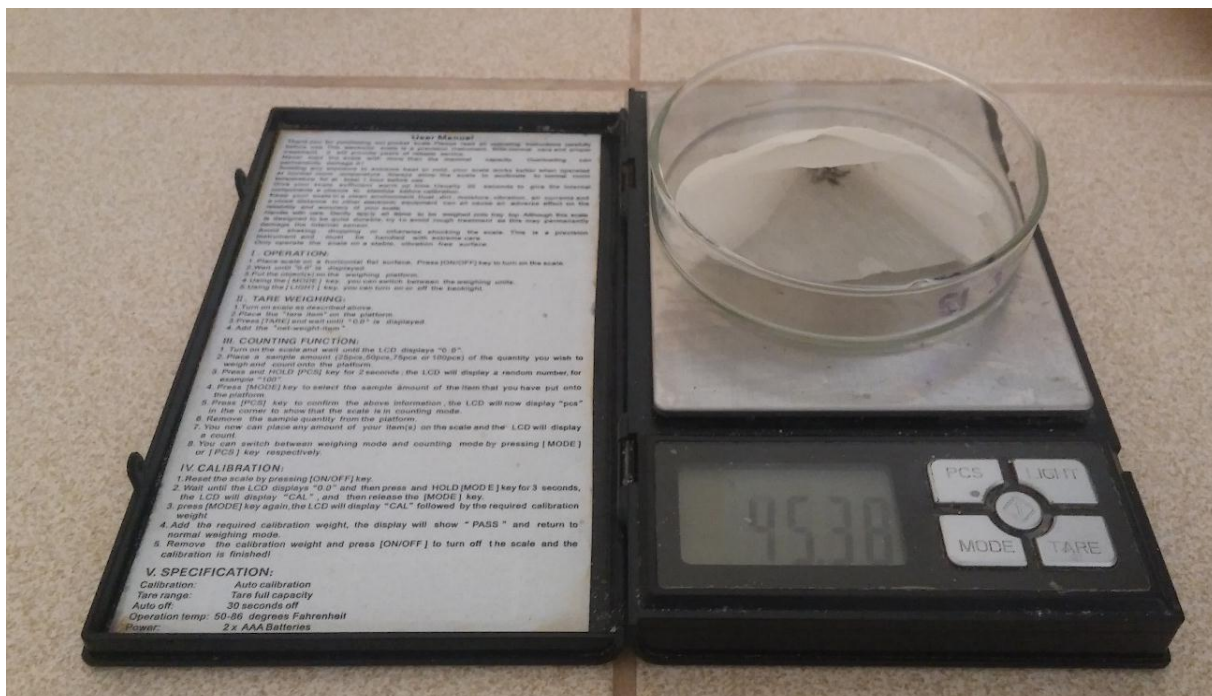


Figura 12. Determinación del peso de la biomasa de hongo filamentoso.



Figura 13. Inóculo de hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos seleccionados.



Figura 14. Suelo contaminado con petróleo distribuido en microcosmos.

cuantificando los microorganismos totales (10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11}), hidrocarbonoclasticos (10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) y hongos filamentosos (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) (Viñas, 2005; Llanos, 2012), así como también se realizó el ensayo de toxicidad en rabanito (Purisaca y Quevedo, 2015). Después de 24 horas los microcosmos se destaparon y se mantuvieron en el invernadero a temperatura ambiental, removiéndolos a diario con una palanita de mano durante 5 minutos y regándolos con agua de clorada (24 horas) cada 4 días.

En los microcosmos, cada 30 días, hasta por 90 días se tomaron submuestras para el análisis microbiológico y ensayo de toxicidad respectivo. A los 90 días, se seleccionó el suelo del tratamiento con el que se alcanzó el mayor índice de germinación de rabanito, correspondiente a la menor toxicidad, para determinar la concentración de hidrocarburos totales de petróleo, (TPH) y calcular la eficiencia de la biodegradación de petróleo (Ramírez, 2005):

$$E = \frac{Si - Sf}{Si} \times 100$$

Donde:

E = Eficiencia de la biodegradación de petróleo (%)

Si = Concentración inicial de TPH

Sf = Concentración final de TPH

Durante el ensayo se registraron las temperaturas máxima (31°C), mínima (18°C) y media ($24,4^{\circ}\text{C}$), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicada en el fundo “El Cienago” en Lambayeque.

3.11 Análisis estadístico de los datos

Los valores obtenidos en la investigación fueron ordenados en tablas y figuras. Se realizó el análisis de varianza de los valores del índice de germinación y la superioridad entre los tratamientos se determinó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 (Hernández et al., 2014). Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Características químicas, microbiológicas y toxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

El suelo contaminado presentó una concentración de hidrocarburos totales, TPH de 23 146 mgkg⁻¹, el recuento de hongos filamentosos fue de 2,9 x 10⁴ UFC g⁻¹ y el número más probable de microorganismos totales fue >1,1 x 10⁷ NMP g⁻¹, población que superó a la hidrocarbonoclástica de 1,1 x 10⁶ NMP g⁻¹ (Tabla 1). En cuanto al nivel de toxicidad fue severo (Tabla 2) en el índice de germinación de rabanito.

4.2 Hongos filamentosos aislados e identificados en el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

En todas las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo se aislaron hongos filamentosos cultivables en PDA - 1% de petróleo, obteniéndose uno a tres morfotipos por muestra, con un total de 106 aislados de hongos filamentosos (Figuras 15, 16, tabla 3, anexo 5). En los hongos filamentosos se identificaron 15 géneros (Tabla 4), siendo los más frecuentes *Aspergillus* (16,0%), *Penicillium* (12,2%), *Cunninghamella* (11,3%), *Paecilomyces* (10,4%), *Cladosporium* (9,4%), *Syncephalastrum* (8,5%), *Fusarium* y *Rhizopus* (7,6%), seguidos de *Periconia* (3,8%), *Bipolaris* y *Memnoniella* (2,8%). Los géneros menos frecuentes fueron, *Beauveria*, *Gliocladium*, *Monilia* y *Mucor* (1,9%).

Tabla 1.

Contenido de hidrocarburos totales, unidades formadoras de colonias de hongos filamentosos y número más probable de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos en suelo contaminado con petróleo, 2018

Características	Valor
TPH (mg kg ⁻¹)	23 146
Hongos filamentosos (UFC g ⁻¹)	2,9 x 10 ⁴
Microorganismos totales * (NMP g ⁻¹)	>1,1 x 10 ⁷
Microorganismos hidrocarbonoclasticos ** (NMP g ⁻¹)	1,1 x 10 ⁶
* Diluciones 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸	
** Diluciones 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷	

Tabla 2.

Nivel de toxicidad de suelo contaminado con petróleo determinado en la germinación de Raphanus sativus L., 2018

Características	Valor
Promedio elongación radicular (mm)	4,1
Porcentaje relativo de germinación (PGR)	5,0
Crecimiento relativo de radícula (CRR)	74
Índice de germinación (% IG)	3,7
Nivel de fitotoxicidad	Severo
Fitotoxicidad: Baja (IG ≥ 80%), Moderada (80% > IG > 50%), Severa (IG ≤ 50%)	

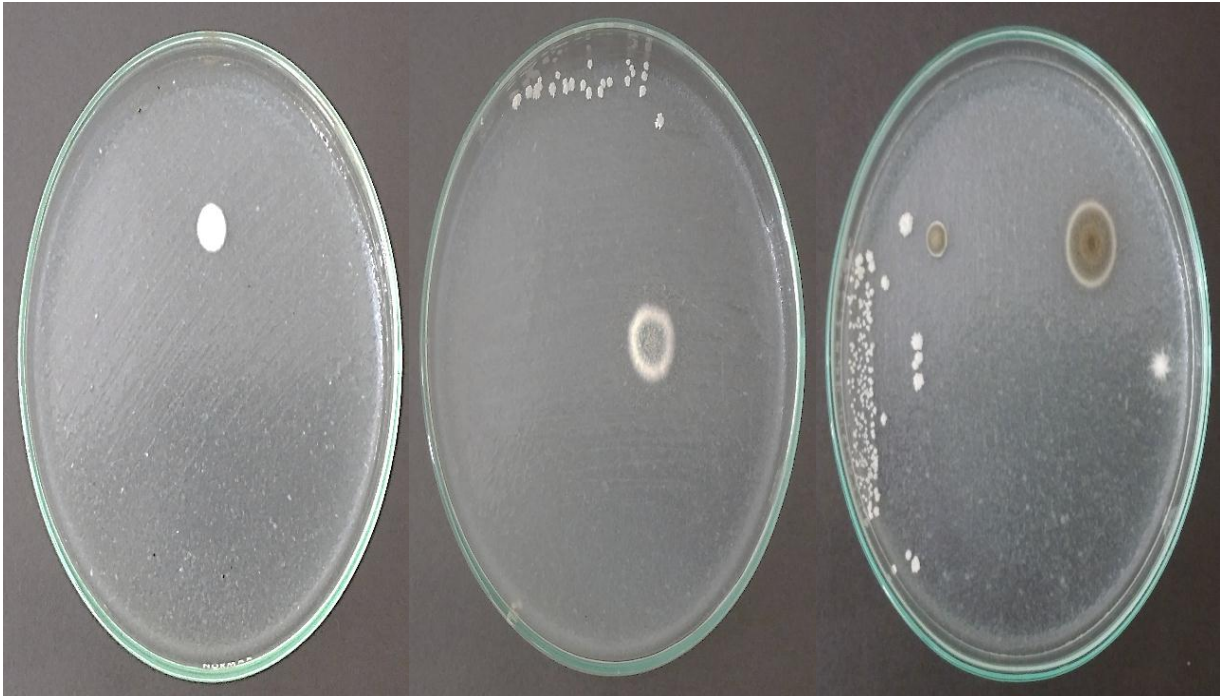


Figura 15. Diversos morfotipos de hongos filamentosos cultivables en agar Czapek con petróleo.



Figura 16. Cultivos puros de hongos filamentosos aislados de suelo contaminado con petróleo.

Tabla 3.

Número de aislados de hongos filamentosos en muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en Puerto Eten, Lambayeque, 2018

Número de aislados de hongos filamentosos	Muestras	
	N°	%
2	22	40,7
1	17	31,5
3	15	27,8
	54	100,0

Tabla 4.

Frecuencia (%) de géneros de hongos filamentosos cultivables aislados de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en Puerto Eten, Lambayeque, 2018

Género	Cultivos de hongos filamentosos	
	N°	%
<i>Aspergillus</i>	17	16,0
<i>Penicillium</i>	13	12,2
<i>Cunninghamella</i>	12	11,3
<i>Paecilomyces</i>	11	10,4
<i>Cladosporium</i>	10	9,4
<i>Syncephalastrum</i>	9	8,5
<i>Fusarium</i>	8	7,6
<i>Rhizopus</i>	8	7,6
<i>Periconia</i>	4	3,8
<i>Bipolaris</i>	3	2,8
<i>Memnoniella</i>	3	2,8
<i>Beauveria</i>	2	1,9
<i>Gliocladium</i>	2	1,9
<i>Monilia</i>	2	1,9
<i>Mucor</i>	2	1,9
Total	106	100,0

4.3 Hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos seleccionados

El 80% (84) de cultivos de hongos filamentosos correspondientes a 14 de los 15 géneros identificados, desarrollaron colonias en agar Czapek con petróleo como fuente de carbono o CZP, demostrando hidrocarbonoclasticidad (Figuras 17, 18). Los hongos del género *Monilia* no utilizaron in vitro el petróleo como fuente de carbono y energía. El diámetro de las colonias del 11% (9) de los cultivos de hongos en agar Czapek con Petróleo fue similar al de las desarrolladas en agar Czapek con sacarosa (Tabla 5, anexo 6) y en el 89% (75) de los cultivos de hongos el diámetro de las colonias en agar Czapek con petróleo (0,8 - 7,0 cm) fue menor al del agar Czapek con sacarosa (0,9 - 8,0 cm).

En el 46% (39) de los hongos, la diferencia en el diámetro de las colonias en agar Czapek con sacarosa y petróleo fue de 0,1 a 0,5 cm y en el 2% (2) fue de 3,1 a 3,5 cm (Tabla 5). Los 30 cultivos de hongos hidrocarbonoclásticos que presentaron la menor diferencia en el diámetro de las colonias fueron preseleccionados, correspondiendo a los géneros: *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Syncephalastrum*, *Beauveria*, *Bipolaris*, *Memnoniella* (Tabla 6).

El peso de la biomasa de los hongos filamentosos preseleccionados cultivados en caldo Czapek con petróleo fue menor al del caldo Czapek con sacarosa, registrándose diferencias de 10 a 1180 mg a los 20 días de incubación (Figura 19, tabla 7). En caldo Czapek con petróleo, la biomasa fue de 10 a 80 mg a los 5 días de incubación, 10 a 190 mg a los 10 días, 30 a 250 mg a los 15 días y 40 a 320 mg a los 20 días.

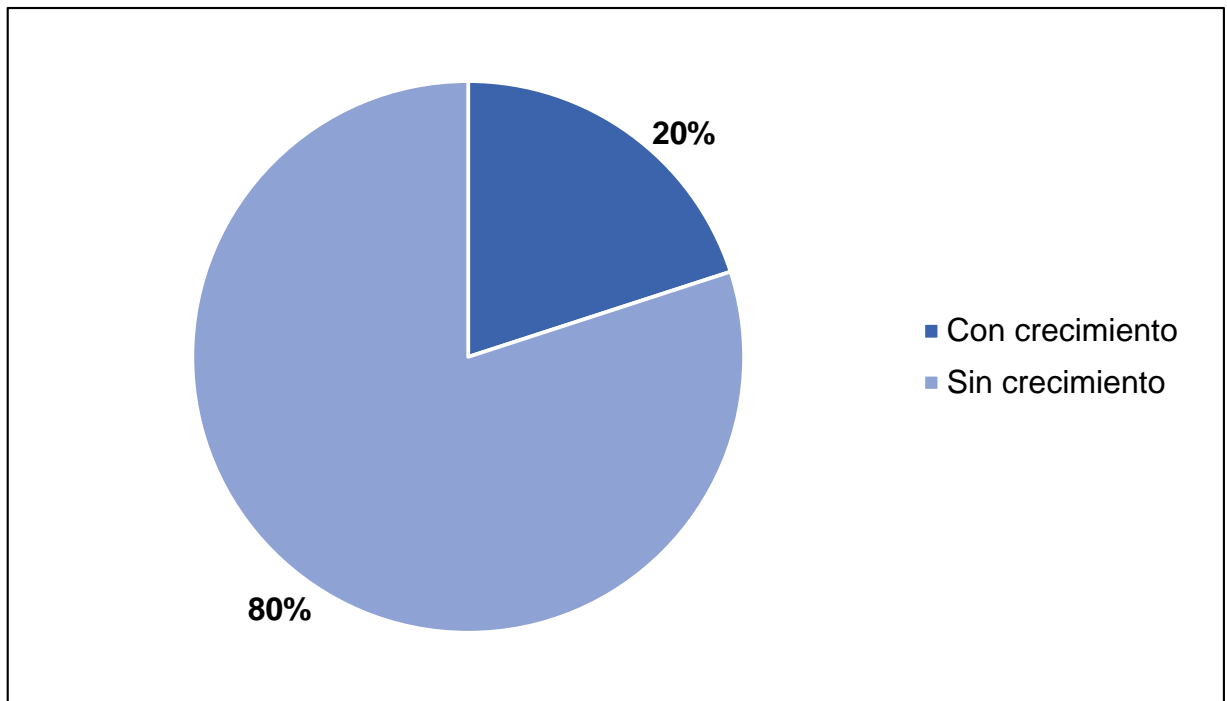


Figura 17. Frecuencia de hongos filamentosos desarrollados en agar Czapek con petróleo como fuente de carbono.

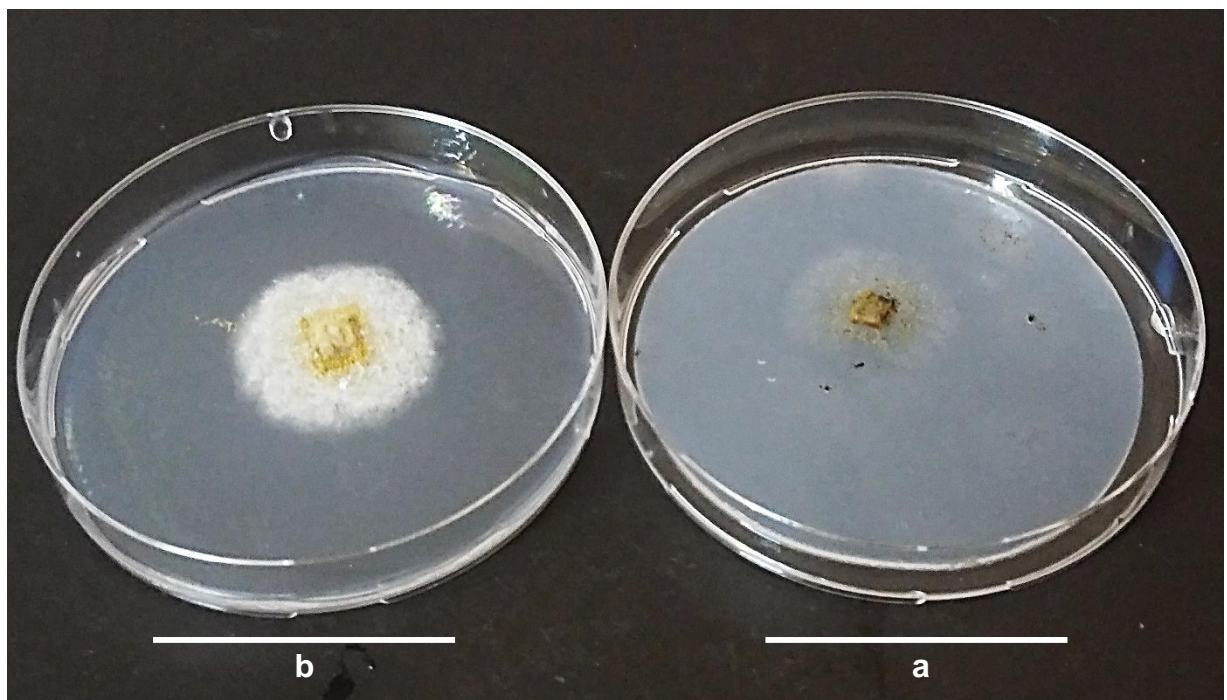


Figura 18. *Aspergillus* sp.40 desarrollado en agar Czapek con petróleo (a) y sacarosa (b) como fuentes de carbono.

Tabla 5.

Rango de la diferencia en el diámetro de las colonias de hongos desarrollados con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono

Rango de diferencia en el diámetro de colonia (cm)	Cultivos de hongos hidrocarbonoclasticos	
	N°	%
0	9	11
0,1 – 0,5	39	46
0,6 – 1,0	21	25
1,1 – 1,5	7	8
1,6 – 2,0	3	4
2,1 – 2,5	0	0
2,6 – 3,0	3	4
3,1 – 3,5	2	2
Total	84	100,0

Tabla 6.

Cultivos de hongos hidrocarbonoclasticos con la menor diferencia en el diámetro de las colonias desarrolladas en agar Czapek con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono

Código	Género de hongo	Diámetro de colonia (cm)		Diferencia (cm)
		Czapek + sacarosa	Czapek + petróleo	
34	<i>Aspergillus</i>	3,7	3,7	0
51	<i>Aspergillus</i>	4,2	4,2	0
39	<i>Cunninghamella</i>	1,6	1,6	0
53	<i>Cunninghamella</i>	2,8	2,8	0
79	<i>Cunninghamella</i>	2,7	2,7	0
36	<i>Memnoniella</i>	4,0	4,0	0
48	<i>Paecilomyces</i>	2,3	2,3	0
81	<i>Penicillium</i>	1,5	1,5	0
100	<i>Syncephalastrum</i>	0,9	0,9	0
33	<i>Aspergillus</i>	3,5	3,4	0,1
55	<i>Beauveria</i>	1,1	1,0	0,1
29	<i>Penicillium</i>	1,6	1,5	0,1
47	<i>Penicillium</i>	2,0	1,9	0,1
102	<i>Penicillium</i>	2,0	1,9	0,1
94	<i>Syncephalastrum</i>	1,6	1,5	0,1
1	<i>Aspergillus</i>	4,6	4,4	0,2
6	<i>Aspergillus</i>	6,0	5,8	0,2
17	<i>Aspergillus</i>	4,6	4,4	0,2
92	<i>Cunninghamella</i>	1,2	1,0	0,2
93	<i>Paecilomyces</i>	3,4	3,2	0,2
28	<i>Penicillium</i>	2,0	1,8	0,2
98	<i>Syncephalastrum</i>	2,2	2,0	0,2
8	<i>Cunninghamella</i>	2,3	2,0	0,3
42	<i>Cunninghamella</i>	2,0	1,7	0,3
12	<i>Penicillium</i>	1,6	1,3	0,3
16	<i>Bipolaris</i>	5,2	4,8	0,4
50	<i>Cunninghamella</i>	2,4	2,0	0,4
46	<i>Paecilomyces</i>	1,7	1,3	0,4
86	<i>Penicillium</i>	3,0	2,6	0,4
18	<i>Aspergillus</i>	4,0	3,6	0,4

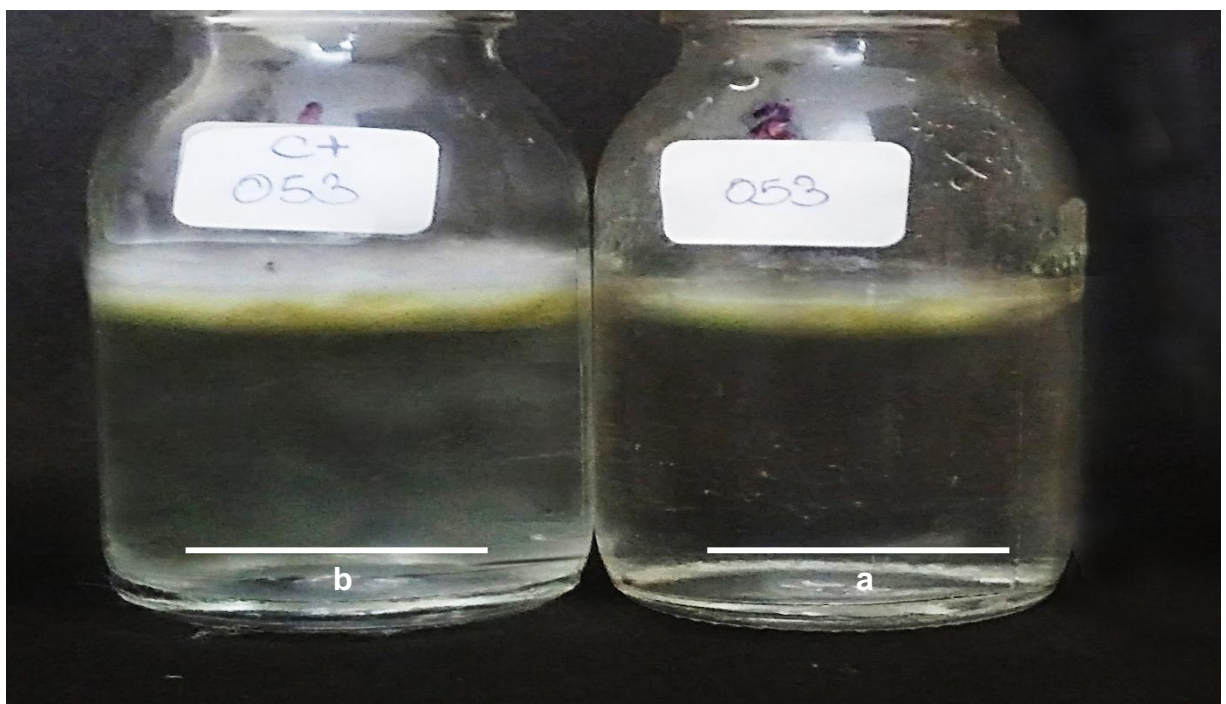


Figura 19. *Cunninghamella* sp.53 cultivado en caldo Czapek con petróleo (a) y sacarosa (b) como fuentes de carbono.

Tabla 7.

Biomasa de hongos hidrocarbonoclasticos formada en caldo Czapek con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono durante 20 días de incubación

Código	Género	Biomasa (mg) / días								Diferencia de pesos a los 20 días (mg)
		5		10		15		20		
		*CS	**CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	
1	<i>Aspergillus</i>	60	10	70	30	210	140	210	160	50
6	<i>Aspergillus</i>	90	70	120	190	260	230	280	260	20
8	<i>Cunninghamella</i>	10	10	290	10	640	40	1290	110	1180
12	<i>Penicillium</i>	70	10	80	40	90	70	100	90	10
16	<i>Bipolaris</i>	60	20	100	40	360	60	840	120	720
17	<i>Aspergillus</i>	70	10	110	20	160	70	290	100	190
18	<i>Aspergillus</i>	70	10	100	70	130	90	150	90	60
28	<i>Penicillium</i>	50	40	80	50	120	70	180	80	100
29	<i>Penicillium</i>	110	20	120	60	140	70	160	90	70
33	<i>Aspergillus</i>	40	20	60	50	160	140	230	180	50
34	<i>Aspergillus</i>	40	30	80	70	140	110	260	140	120
36	<i>Memnoniella</i>	30	10	100	30	280	100	450	140	310
39	<i>Cunninghamella</i>	80	20	170	50	220	80	250	105	145
*	Caldo Czapek sacarosa									
**	Caldo Czapek petróleo									

Continuación...

42	<i>Cunninghamella</i>	50	30	50	140	320	70	490	140	350
46	<i>Paecilomyces</i>	20	10	40	10	50	30	80	40	40
47	<i>Penicillium</i>	70	40	120	70	340	100	670	180	490
48	<i>Paecilomyces</i>	10	10	30	10	80	50	160	60	100
50	<i>Cunninghamella</i>	80	40	380	60	580	90	920	110	810
51	<i>Aspergillus</i>	40	10	160	60	220	100	300	160	140
53	<i>Cunninghamella</i>	100	20	340	50	640	80	840	100	740
55	<i>Beauveria</i>	20	10	160	90	210	160	260	170	90
79	<i>Cunninghamella</i>	60	50	230	90	340	160	460	170	290
81	<i>Penicillium</i>	40	10	160	100	320	140	490	150	340
86	<i>Penicillium</i>	30	20	160	130	280	250	320	280	40
92	<i>Cunninghamella</i>	50	20	110	70	150	130	210	190	20
93	<i>Paecilomyces</i>	50	30	370	40	450	60	500	60	440
94	<i>Syncephalastrum</i>	40	30	60	50	110	80	180	170	10
98	<i>Syncephalastrum</i>	80	10	210	40	480	60	670	70	600
100	<i>Syncephalastrum</i>	140	80	270	110	360	160	450	240	210
102	<i>Penicillium</i>	30	40	180	100	460	180	610	320	290

Los diez cultivos de hongos hidrocarbonoclásticos que presentaron la menor diferencia en el peso de la biomasa fueron seleccionados, correspondiendo a los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Paecilomyces* y *Syncephalastrum* (Tabla 8, anexo 7).

4.4 Cinética de la población microbiana y fitotoxicidad de los hidrocarburos totales de petróleo del suelo durante la biodegradación en microcosmos

En el proceso de biodegradación de los hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos, la población microbiana se incrementó, alcanzando la máxima población de microorganismos totales a los 30 días y de hidrocarbonoclásticos y hongos filamentosos a los 60 días (Tablas 9, 10, 11). En los testigos abiótico y absoluto las máximas poblaciones de todos los microorganismos investigados se alcanzaron a los 60 días.

Los índices de germinación de *Raphanus sativus* L. “rabanito” en el suelo de los microcosmos se incrementaron conforme transcurrió el tiempo y los niveles de toxicidad disminuyeron (Tablas 12, 13). Con los hongos filamentosos los índices de germinación fueron de 0 al inicio del experimento, 2 a 8 a los 30 días y 6 a 18 a los 60 días (Tabla 12, anexos 8 a 11), valores correspondientes a un nivel severo de toxicidad a los 0, 30 y 60 días.

Los índices de germinación a los 90 días fueron de 48 a 74 con los hongos investigados, 10 con el testigo abiótico y 38 en el testigo absoluto. La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 12) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, los mayores valores correspondieron a *Aspergillus* sp.018 y *Paecilomyces* sp.046, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 12).

Tabla 8.

Cultivos de hongos hidrocarbonoclásticos con la menor diferencia en el peso de la biomasa formada en caldo Czapek con sacarosa y petróleo como fuentes de carbono

Código	Género de hongo	Diferencia de peso (mg) / días de incubación			
		5	10	15	20
29	<i>Penicillium</i>	90	60	70	70
18	<i>Aspergillus</i>	60	30	40	60
1	<i>Aspergillus</i>	50	40	70	50
33	<i>Aspergillus</i>	20	10	20	50
46	<i>Paecilomyces</i>	10	30	20	40
86	<i>Penicillium</i>	10	30	30	40
6	<i>Aspergillus</i>	20	70	30	20
92	<i>Cunninghamella</i>	30	40	20	20
12	<i>Penicillium</i>	60	40	20	10
94	<i>Syncephalastrum</i>	10	10	30	10

Tabla 9.

Número más probable de microorganismos totales (NMP g⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos

Tratamientos	Lectura / días				NMP g ⁻¹ / días			
	0	30	60	90	0	30	60	90
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	323	333	321	300	2,9 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ¹⁰	1,5 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁸
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	322	333	322	300	2,1 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ¹⁰	2,1 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁸
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	322	333	310	310	2,1 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ¹⁰	4,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	320	333	320	310	9,3 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ¹⁰	9,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	321	333	320	310	1,5 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ¹⁰	9,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	320	333	320	311	9,3 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ¹⁰	9,3 x 10 ⁸	7,5 x 10 ⁸
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	320	333	330	300	9,3 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ¹⁰	2,4 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁸
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	321	333	331	320	1,5 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ¹⁰	4,6 x 10 ⁹	9,3 x 10 ⁸
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	330	333	321	311	2,4 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ¹⁰	1,5 x 10 ⁹	7,5 x 10 ⁸
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	330	333	320	311	2,4 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ¹⁰	9,3 x 10 ⁸	7,5 x 10 ⁸
T11: Testigo absoluto	220	222	233	230	2,1 x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁸	5,3 x 10 ⁸	2,9 x 10 ⁸
T12: Testigo abiótico	201	211	221	211	1,4 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸

*Diluciones 10⁻⁹ 10⁻¹⁰ 10⁻¹¹

Tabla 10.

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP g⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos

Tratamientos	Lectura / días				NMP g ⁻¹ / días			
	0	30	60	90	0	30	60	90
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	221	301	333	320	2,8 x 10 ⁷	3,9 x 10 ⁷	>1,1 x 10 ⁹	9,3 x 10 ⁷
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	233	302	333	320	5,3 x 10 ⁷	6,4 x 10 ⁷	>1,1 x 10 ⁹	9,3 x 10 ⁷
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	323	331	333	310	2,9 x 10 ⁸	4,6 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ⁹	4,3 x 10 ⁷
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	320	332	333	320	2,9 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ⁹	9,3 x 10 ⁷
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	222	323	333	311	3,5 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ⁹	7,5 x 10 ⁷
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	302	332	333	310	6,4 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ⁹	4,3 x 10 ⁷
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	330	332	333	321	2,4 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ⁹	1,5 x 10 ⁸
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	323	331	333	311	2,9 x 10 ⁸	4,6 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ⁹	7,5 x 10 ⁷
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	212	330	333	311	2,7 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ⁹	7,5 x 10 ⁷
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	330	331	333	310	2,4 x 10 ⁸	4,6 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ⁹	4,3 x 10 ⁷
T11: Testigo absoluto	202	223	320	301	2,0 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁷	9,3 x 10 ⁷	3,9 x 10 ⁷
T12: Testigo abiótico	200	212	310	300	9,1 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁷	4,3 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁷

*Diluciones 10⁻⁸ 10⁻⁹ 10⁻¹⁰

Tabla 11.

Unidades formadoras de colonia de hongos filamentosos (UFC g⁻¹) durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos

Tratamientos	Lectura / días				UFC g ⁻¹ / días			
	0	30	60	90	0	30	60	90
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	133	141	44	58	6,0 x 10 ⁴	6,4 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁴
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	144	150	41	56	6,5 x 10 ⁴	6,8 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁴
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	130	154	43	58	5,9 x 10 ⁴	7,0 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁴
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	128	181	58	58	5,8 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	2,6 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁴
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	127	188	42	60	5,7 x 10 ⁴	8,5 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁴
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	141	183	42	62	6,4 x 10 ⁴	8,3 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁴
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	130	144	52	64	5,9 x 10 ⁴	6,5 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁵	2,9 x 10 ⁴
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	128	148	43	54	5,8 x 10 ⁴	6,7 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁴
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	138	144	50	62	6,2 x 10 ⁴	6,5 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁴
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	140	149	42	53	6,3 x 10 ⁴	6,7 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁴
T11: Testigo absoluto	102	136	38	44	4,6 x 10 ⁴	6,1 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁴
T12: Testigo abiótico	81	103	20	36	3,6 x 10 ⁴	4,6 x 10 ⁴	9,0 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴

*Diluciones 10⁻² 10⁻³ 10⁻⁴

Tabla 12.

Índice de germinación de Raphanus sativus L. en microcosmos, en proceso de biodegradación por hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos

Tratamientos	Índice de germinación (%)				Significancia ($\alpha = 0,05$)
	0	30	60	90	
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	0	2	6	60	bc
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	0	4	11	64	b
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	0	2	8	59	bc
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	0	8	18	74	a
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	0	4	10	62	bc
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	0	5	11	54	cd
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	0	4	8	68	ab
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	0	5	6	60	bc
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	0	5	6	48	d
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	0	4	6	49	d
T11: Testigo absoluto	0	3	5	38	e
T12: Testigo abiótico	0	0	0	10	f

Tabla 13.

Niveles de toxicidad en el índice de germinación de Raphanus sativus L. en microcosmos, en proceso de biodegradación por hongos filamentosos

Tratamientos	Nivel de toxicidad / días			
	0	30	60	90
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	Severo	Severo	Severo	Moderado
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	Severo	Severo	Severo	Moderado
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	Severo	Severo	Severo	Moderado
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	Severo	Severo	Severo	Moderado
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	Severo	Severo	Severo	Moderado
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	Severo	Severo	Severo	Moderado
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	Severo	Severo	Severo	Moderado
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	Severo	Severo	Severo	Moderado
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	Severo	Severo	Severo	Severo
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	Severo	Severo	Severo	Severo
T11: Testigo absoluto	Severo	Severo	Severo	Severo
T12: Testigo abiótico	Severo	Severo	Severo	Severo

La toxicidad presentó un nivel moderado con *Aspergillus* sp. 001, 006, 018 y 033; *Penicillium* spp.012, 029, 086; *Paecilomyces* sp.046 y severo con *Cunninghamella* sp.092, *Syncephalastrum* sp.094 y los testigos abiótico y absoluto (Tabla 13).

4.5 Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo con menor toxicidad

En el suelo biodegradado con *Aspergillus* sp.018 se alcanzó el mayor índice de germinación desde los 30 días (Tabla 12), la disminución de la toxicidad a un nivel moderado a los 90 días (Tabla 13) y 70% de eficiencia en la degradación del TPH. La concentración final de TPH fue de 6 853 mgkg⁻¹ (Tabla 14)

Tabla 14.

Características del suelo de microcosmos biodegradado con Aspergillus sp.018 durante 90 días

Características	Días			
	0	30	60	90
Microorganismos totales (NMP g ⁻¹)	9,3 x 10 ⁸	>1,1 x 10 ⁹	9,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸
Microorganismos hidrocarbonoclásticos (NMP g ⁻¹)	2,9 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁹	>1,1 x 10 ⁹	9,3 x 10 ⁷
Hongos filamentosos (UFC g ⁻¹)	5,8 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	2,6 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁴
Índice de germinación (%)	0	8	18	74
Nivel de toxicidad	Severo	Severo	Severo	Moderado
TPH (mg kg ⁻¹)	23 146	_____	_____	6 853
Eficiencia de biorremediación (%)	_____	_____	_____	70

V. DISCUSIÓN

Los ensayos de tratabilidad o conjunto de experimentos a escala de laboratorio, previos a la implementación de la biorremediación, proporcionan información fundamental para asegurar el éxito de cualquier tecnología propuesta (Ponce, 2014, p.41). En la fase I se caracteriza el suelo, los contaminantes y la población microbiana (Arrieta, 211, pp.34 - 46) y en la fase II se investigan los factores físico – químicos y biológicos que afectan la biodegradación en ensayos de microcosmos (Ortega, 2012, pp. 115 - 117; Ponce, 2014, pp. 54 - 55). En este contexto, se investigó la eficiencia de hongos filamentosos en la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos sólidos. De igual manera, los microcosmos se utilizaron en la caracterización de hongos con potencial en la biorremediación de suelos y aguas contaminados (Vega, 2011, pp.19 - 32), determinación del efecto de la bioaumentación y bioestimulación (Lladó, Solanas, De Lapuente, Borrás y Viñas, 2012, pp. 262 - 263; Medaura et al., 2013, p. 3) y monitorización de la degradación de los hidrocarburos de petróleo durante un período determinado (Petit et al., 2013, p. 293).

En los ensayos con microcosmos sólidos o líquidos se observa el comportamiento de los microorganismos cuando metabolizan el contaminante en la matriz propia impactada (Vega, 2011, pp. 35 - 45). En cuanto a la degradación de los hidrocarburos, se evidencian ventajas de los microcosmos en medios líquidos frente a los de suelo porque se facilita la homogenización de las células con el contaminante y cuando se incluye la aireación se favorece la biodegradación (Vega, 2011, p. 64); no obstante, en los microcosmos de suelo éste no es esterilizado y los microorganismos

interaccionan con la biota nativa, manteniéndose las condiciones más cercanas a la realidad (Valenzuela, Solís, Martínez y Pinochet, 2006, p. 36).

La concentración de TPH ($23\,146\text{ mgkg}^{-1}$) en el suelo investigado fue menor a $50\,000\text{ mgkg}^{-1}$, valor establecido como máximo para que se asegure la presencia de microorganismos degradadores (Herrera, 2014, p. 1); no obstante, Oropeza (2010, p. 30) registró un rango de TPH de $50\,000$ a $140\,000\text{ mgkg}^{-1}$ en muestras de suelos procedentes de pozos petroleros abandonados, en los que se demostró la presencia de bacterias y hongos.

En los suelos impactados con petróleo se cuantificaron microorganismos, coincidiendo con Oropeza (2010, p. 31) y Cabanillas y Pissani (2015). El número de microorganismos capaces de utilizar los hidrocarburos de petróleo, depende de la presión selectiva ejercida por los contaminantes en un determinado ambiente (Pernía et al., 2012, p. 2). En suelos contaminados con petróleo se encuentran bacterias (Galindo y Llontop, 2015, p. 38), hongos (Medaura et al., 2013, p. 3; Contreras, 2014, pp. 41 - 45) y bacterias y hongos (Oropeza, 2010, p. 31).

El aislamiento e identificación de hongos filamentosos en el suelo contaminado coincide con Vega (2011, p. 59), Petit et al. (2013, p. 292), Contreras (2014, p. 41 - 45) y Montero (2015, p. 39); sin embargo, estos microorganismos también pueden obtenerse de suelos no contaminados (Petit et al., 2013, pp. 291 - 292). Considerando que sólo el 0,001 a 1% de los microorganismos viables son cultivables, la densidad microbiana basada únicamente en el aislamiento representa una parte minoritaria de la población real existente (Torsvik et al., 2003; mencionado por Lladó, 2012, p. 55); no obstante, los microorganismos aislados pueden ser caracterizados, con la perspectiva de incrementarlos y utilizarlos en los procesos de biorremediación.

La hidrocarbonoclasticidad se demostró en el 80% de los hongos filamentosos aislados de suelos contaminados, valor inferior a 98% registrado por Contreras y Carreño (2018, p. 30). En los lugares impactados con hidrocarburos de petróleo se encuentran microorganismos que metabolizan el contaminante, pero también están los heterótrofos, que utilizan cualquier sustancia orgánica propia del suelo o procedente de la transformación de los hidrocarburos (Cabanillas y Pissani, 2015, p. 72). El conocimiento de la existencia de hongos capaces de transformar los hidrocarburos e incluso mineralizarlos en el suelo (Lotfinasabasl et al., 2012, pp. 189 - 190), ha permitido el desarrollo de la micorremediación como estrategia viable para la recuperación de aguas y suelos impactados (Pernía et al., 2012, p. 3).

La capacidad para utilizar el petróleo como fuente de carbono y energía o hidrocarbonoclasticidad de los géneros de hongos identificados en la presente investigación fue demostrada previamente, mencionándose: *Aspergillus* y *Penicillium* (Oropeza, 2010, p. 45), *Fusarium* (Medaura et al., 2013, p. 3), *Paecilomyces* (Petit et al., 2013, p. 295), *Cunninghamella* (Chaillan et al., 2004, pp. 590 - 591), *Cladosporium* (Chaudhry et al., 2012, p. 182), *Rhizopus* (Lotfinasabasl et al., 2012, p. 187), *Syncephalastrum* (Uzoamaka, Floretta & Florence, 2009, p. 1), *Periconia* (Sandhu, Shakya, Deshmukh, Aharwal & Kumar, 2016, p. 1163), *Bipolaris* (Deli, 2014, p. 7), *Memnoniella* (Tapia, 2002, p. 21), *Beauveria* y *Mucor* (Valenzuela et al., 2006, pp. 37 - 38) y *Gliocladium* (April, Foght & Currah, 2000, p. 40).

La hidrocarbonoclasticidad se determinó con medios de cultivo sólidos y líquidos coincidiendo con Petit et al., (2013, p. 293) y Montero (2015, pp. 31 - 35). La biomasa es determinante en la selección de los hongos hidrocarbonoclásticos, porque se forma como consecuencia de la utilización de los hidrocarburos de petróleo como fuente de carbono y energía (Araujo et al., 2016, pp. 722 - 723). Bajo este criterio, se

seleccionaron hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Paecilomyces* y *Syncephalastrum*.

Respecto a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se coincide con Pernía et al. (2012, p. 34), quienes realizaron un meta-análisis de la biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y derivados y determinaron estos géneros de hongos con mayor frecuencia. Estos investigadores establecieron tres grupos de géneros de hongos según su capacidad para reducir los niveles de TPH. En el grupo de mayor capacidad está entre otros *Aspergillus*, en el grupo de capacidad intermedia *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* y *Syncephalastrum* y en el grupo con menor capacidad *Cunninghamella*.

Los componentes del petróleo, agrupados en las fracciones saturada, aromática, resinas y asfaltenos, no se biodegradan con la misma facilidad (Solanas, 2009, p. 1; García y Aguirre, 2015, p. 643). El incremento de las poblaciones microbianas en los microcosmos está relacionado con la degradación de la fracción saturada: los alcanos lineales de cadenas intermedias ($C_{10} - C_{20}$) se degradan fácilmente y mediante procesos de oxidación originan moléculas similares a los ácidos grasos, que posteriormente se metabolizan por β oxidación (García y Aguirre, 2015, p. 648); sin embargo, los dobles y triples enlaces, el número de carbonos en la cadena o la presencia de ramificaciones en los hidrocarburos saturados reducen la tasa de biodegradación (Solanas, 2009, p. 2).

La disminución de las poblaciones microbianas evidencia la presencia de componentes del petróleo más complejos, como la fracción aromática, que requiere la ruptura de uno o varios anillos (Villacis, 2013, pp. 26 - 27), cometabolismo (García y Peralta, 2008, p. 2) e incluso el uso de potenciadores (Quiceno y Ríos, 2014, p. 46). Cuanto más antigua es la contaminación, los hidrocarburos remanentes son más

difíciles de biodegradar y solo permanecen viables los microorganismos hidrocarbonoclásticos (Solanas, 2009, p. 9). Por esta razón, la máxima población de microorganismos totales se alcanzó a los 30 días y la de microorganismos y hongos hidrocarbonoclásticos a los 60 días.

La evolución de la toxicidad del suelo, determinada en el ensayo de toxicidad aguda en la germinación de rabanito, evidenció una disminución conforme transcurrió el tiempo, coincidiendo con Medaura et al. (2013, p. 5) y Contreras (2017, p. 66). La toxicidad disminuye como consecuencia de la degradación paulatina de los hidrocarburos de petróleo por los hongos hidrocarbonoclásticos (Lladó, 2012, p. 52 - 53). La típica cinética de eliminación de los contaminantes es la denominada “palo de hockey” con una fase inicial de ascenso muy rápido, seguido de una etapa de ralentización, debido a la permanencia en el suelo de componentes más recalcitrantes a la biodegradación (Realp et al., 2008, p. 40), falta de nutrientes como el nitrógeno y una adecuada oxigenación (García y Aguirre, 2015, pp. 649 - 650).

En el suelo tratado con *Aspergillus* sp.018, se alcanzó el mayor índice de germinación de rabanito desde los 30 días y la disminución del nivel de toxicidad a un nivel moderado a los 90 días, tiempo menor al reportado por Medaura et al. (2013, p. 5). Estos investigadores determinaron que 120 días después de la inoculación de hongos, disminuyó significativamente la toxicidad del suelo, obteniéndose incremento de la EC₅₀ en ensayos Microtox de fase sólida.

La eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos por *Aspergillus* sp.018 fue de 70% superando 66,14% reportado por Vega (2011, p. 62) para *Geotrichum* sp. y 68,9% por Medaura et al. (2013, p. 5) para un consorcio fúngico. La toxicidad y concentración del TPH disminuyó durante el proceso de degradación; no obstante, la concentración final fue de 6 853 mgkg⁻¹, valor superior

al Límite Máximo Permisible (LMP) de 5000 mgkg⁻¹ para suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, propuesto por la Dirección General de Asuntos Ambientales Mineros (DGAAM) del Ministerio de Energía y Minas del Perú (Herrera, 2014, p.1).

Los resultados de la investigación o ensayos de tratabilidad (Ponce, 2014, p. 41) demostraron que la inoculación de hongos previamente caracterizados como hidrocarbonoclasticos incrementaron la biodegradación de los hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos. Asimismo, la presencia de remanentes del contaminante y de poblaciones microbianas viables 90 días después de la inoculación, demostraron que el proceso biodegradativo continúa y puede ser favorecido mediante la estrategia de bioestimulación (Quiceno y Ríos, 2014, pp. 36 - 48), con la perspectiva de alcanzar el LMP en el TPH de 5000 mgkg⁻¹ y lograr la recuperación del suelo.

VI. CONCLUSIONES

- 6.1.** Las muestras de suelo contaminado presentaron una concentración de TPH de 23 146 mg kg⁻¹, microorganismos totales ($>1,1 \times 10^7$ NMP g⁻¹), microorganismos hidrocarbonoclásticos ($1,1 \times 10^6$ NMP g⁻¹), hongos filamentosos ($2,9 \times 10^4$ UFC g⁻¹) y un nivel de toxicidad severo en el índice de germinación de *Raphanus sativus* L.
- 6.2.** En el suelo contaminado con hidrocarburos se obtuvieron 106 cultivos de hongos filamentosos, identificándose: *Aspergillus* (16,0%), *Penicillium* (12,2%), *Cunninghamella* (11,3%), *Paecilomyces* (10,4%), *Cladosporium* (9,4%), *Syncephalastrum* (8,5%), *Fusarium* y *Rhizopus* (7,6%), *Periconia* (3,8%), *Bipolaris* y *Memnoniella* (2,8%), *Beauveria*, *Gliocladium*, *Monilia* y *Mucor* (1,9%).
- 6.3.** El 80% de los cultivos fúngicos demostraron hidrocarbonoclasticidad, seleccionándose a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Paecilomyces* y *Syncephalastrum*.
- 6.4.** En el proceso de biodegradación los microorganismos se incrementaron, alcanzando la máxima población de heterótrofos totales a los 30 días y de hidrocarbonoclásticos y hongos filamentosos a los 60 días. La toxicidad presentó un nivel moderado con *Aspergillus* spp.018, 001, 006, 033; *Penicillium* spp.012, 029, 086; *Paecilomyces* sp.046 y severo con *Cunninghamella* sp.092, *Syncephalastrum* sp.094 y los testigos abiótico y absoluto.
- 6.5.** La eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo en microcosmos fue de 70% con *Aspergillus* sp.018.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1** Caracterizar a nivel molecular *Aspergillus* sp.018.
- 7.2** Determinar el efecto de la estimulación en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por *Aspergillus* sp.018
- 7.3** Investigar la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por *Aspergillus* sp.018 en lotes de explotación comercial.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. y Morales, F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico I: Consideraciones para la salud pública y protección al ganado. *Interciencia*, 33 (7), 476-482. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pd/339/33933703.pdf>
- Alexander, M. (1994). *Introducción a la Microbiología del Suelo*. México: Editorial AGT SA.
- April, T., Foght, J. & Currah, R. (2000). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 38-49. doi: 10.1139/w99-117
- Araujo, J., Yegres, F., Barreto, G., Antequera, A., Depool, B. y Rojas, Y. (2016). Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclasticos del genero *Aspergillus* para la descontaminación de agua con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs). *Revista Cubana de Química*, 28(2), 703 – 735. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212016000200013
- Arias, E. y Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Huasca y Cruz Verde*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Arrieta, O. (2011). *Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diésel y su integración a la gestión ambiental*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Ayasta, J. y Bernable, C. (2012). *Mejoramiento del proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos biodegradables del distrito de Ciudad Eten, en Lambayeque. Julio a Diciembre del 2011*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Barnett, H. & Hunter, B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. (4^{ta} ed.) St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- 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. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Recuperado de https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/206/potencial_degradacion_hidrocarburos.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cabanillas, J. y Pissani, V. (2015). *Efecto de la bioaumentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carreño, C., Mendoza, G., Mendoza, G. y Villanueva, C. (2009). *Microbiología en el Tratamiento de Desechos*. Lambayeque, Perú: Oficina de Impresiones y Publicaciones Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Contreras, A. (2014). *Aislamiento y adaptación de microorganismos fúngicos con actividad hidrocarburoclasta*. (Tesis de pregrado). Universidad Veracruzana, Xalapa, México.
- Contreras, H. y Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33. doi: <http://dx.doi.org/10.25127/ucni.v1i1.269>
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, J y Márquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(17), 64-82. doi: <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.518>
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid, España: Editorial Paraninfo.
- Chaillan, F., Fléche, A., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A. & Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-

degrading microorganisms. *Research in Microbiology*, 155, 587-595. doi: 10.1016/j.resmic.2004.04.006

Chaudhry, S., Luhach, J., Sharma, V. & Sharma, C. (2012). Assessment of diesel degrading potential of fungal isolates from sludge contaminated soil of petroleum refinery, Haryana. *Research Journal of Microbiology*, 7(3), 182-190. doi: 10.3923/jm.2012.182.190

Chávez, G. (2010). *Eficiencia de la degradación de petróleo por Pseudomonas sp. nativa en terrarios a diferentes concentraciones y tiempos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

Deli, H. (2014). Assessment of the ability of fungi isolates *Bipolaris hawaiiensis* and *Emericella nidulans* isolated from soils containing petroleum waste in the analysis of crude oil. *Al- Mustansiriyah Journal of Science*, 25(3), 7-12. Recuperado de <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&ald=95788>

Díaz, M., Alarcón, A., Ferrera, R., Almaraz, J. y García, O. (2013). Crecimiento de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1039-1052. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442013000400005

Filip, Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 169-174. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00254-7)

Flores, S. y Benites, J. (2015). *Efecto del estiércol de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de diésel en terrarios*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

Fundación General Universidad de Salamanca (2017). Cursos Online de Seguridad y Calidad Alimentaria. Recuperado de <http://fundacion.usal.es/es/formacion-especializada/cursos-on-line/cursos-on-line-de-seguridad-y-calidad-alimentaria/alteracion-microbiana-y-vida-util-de-los-alimentos>

Galindo, Ch. y Llontop, D. (2015). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas de la provincia de Talara, región*

- Piura. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- García, M. y Peralta, M. (2008). Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7, 1-12. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382008000100001
- García, N. y Aguirre, M. (2015). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 641-652. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/273002971_Biodegradacion_de_petroleo_por_bacterias_algunos_casos_de_estudio_en_el_Golfo_de_Mexico
- Hasan, I. (2014). Ability of some soil fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(2), 46-52. doi: 10.12691/jaem-2-2-3
- Hernández, E., Ferrera, R., Gutiérrez, M., Rodríguez, R., Rubiños, J. y Fernández, L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493-502. Recuperado de <http://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=57321405>
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6^{ta} ed.). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Herrera, B. (2014). *Influencia de la aireación en el tratamiento biológico de borras de hidrocarburos* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.
- Huapaya, R. (2011). Métodos estándares de análisis microbiológicos de aguas. Curso de Capacitación. 10 y 11 de diciembre 2011, Chiclayo, Perú.
- Instituto Nacional de Defensa Civil, INDECI. (2003). Plan de prevención ante desastres: Uso del suelo y medidas de mitigación ciudad de Puerto Eten. Recuperado de http://bvpad.indeci.gob.pe/doc/estudios_CS/Region_lambayeque/chiclayo/eten.pdf.
- Izquierdo, A. (2013). *Biodegradación de HAP durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones*

bacterianas y genes funcionales. (Tesis de doctorado). Universitat de Barcelona, España.

Lotfinasabasi, S., Gunale, S. & Rajurkar, N. (2012). Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by fungi. *Bioscience Discovery*, 3(2), 186-192. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/284945921_Assessment_of_petroleum_hydrocarbon_degradation_from_soil_and_tarball_by_fungi

Loya, D. (2013). *Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de pregrado). Universidad Veracruzana, México.

Lladó, S. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas*. (Tesis de Doctorado). Universitat de Barcelona, España.

Lladó, S., Solanas, A., De Lapuente, J., Borrás, M & Viñas, M. (2012). A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 435 - 436, 262-269. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.07.032.

Llanos, C, (2012). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel, departamento de Lambayeque, 2011*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

Medaura, M., Guivernau, M., Boldú, F., Moreno, X. y Viñas, M. (2013). Micorremediación y su aplicación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos pesados. En resúmenes de *V simposio Iberoamericano de Residuos Sólidos*. Mendoza, Argentina. Recuperado de <http://www.redisa.net/doc/artSim2013/TratamientoYValorizacionDeResiduos/Micorremediacion%20y%20Aplicacion%20Tratamiento%20Suelos%20Contaminados%20con%20Hidrocarburos.pdf>

Meneses, R. (2014). *Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs en microcosmos de suelo a campo abierto*. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador.

- Montero, M. (2015). *Estudio in vitro de las propiedades biodegradadoras de hidrocarburos, por parte de hongos aislados de suelos contaminados por petróleo*. (Tesis de pregrado). Universidad Estatal Amazónica, Puyo – Patate, Ecuador.
- Oropeza, J. (2010). *Diversidad microbiológica de bacterias y hongos en suelos impactados con petróleo, provenientes de Yaracal, estado Falcón Venezuela*. (Tesis de pregrado). Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.
- Ortega, M. (2012) *Modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil*. (Tesis de doctorado). Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Pernía, B., Demey, R., Inojosa, Y. y Naranjo-Briseño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(1), 1-40. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/260137177_Biodiversidad_y_potencial_hidrocarbonoclastico_de_hongos_aislados_de_crudo_y_sus_derivados_Un_metaanalisis_Biodiversity_and_hydrocarbonoclastic_potencial_of_fungi_isolated_from_crude_and_petroleum_de
- Petit, K., Colina, J., Yegres, F., Moran, H. y Richard, N. (2013). Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de *Aloe vera*. *Química Viva*, 3, 288 -304. Recuperado de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n3/petit.pdf>
- Ponce, D. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de pregrado). Universidad del Bío-Bío, Concepción, Chile.
- Purisaca, D. y Quevedo, D. (2015). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por Actinobacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Quiceno, E. y Ríos, L. (2014). Potenciadores en el proceso de remoción biológica de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHS). *Hechos Microbiológicos*, 5(1), 36-50. Recuperado de <https://docplayer.es/58603981-Potenciadores-en-el-proceso-de-remocion-biologica-de-hidrocarburos-aromaticos-policiclicos-phas.html>

- Ramírez, M. (2014). *Microorganismos degradadores de hidrocarburos de petróleo aislados de la rizósfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación* (Tesis de doctorado). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Ramírez, N. (2005). *Degradación de petróleo Diésel a diferentes concentraciones de nitrógeno y fosforo por cepas nativas de Pseudomonas spp.* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú
- Realp, E., Doménech, J., Martínez, R., Restrepo, C., Lladó, S., Viñas, M. y Solanas, A. (2008). Ensayo piloto de biorremediación por la tecnología de la biopila dinámica para la descontaminación de suelos contaminados por creosotas provenientes de las actividades dedicadas a la preparación de la madera. *Revista Técnica Residuos*, 103, 38-49. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/284666560_Ensayo_piloto_de_biorremediacion_por_la_tecnologia_de_la_biopila_dinamica_para_la_descontaminacion_de_suelos_contaminados_por_creosotas_provenientes_de_las_actividades_dedicadas_a_la_preparacion_de_la
- Rivera, M., Ferrera, R., Sánchez, P., Volke, V., Fernández, L. y Rodríguez, R. (2004). Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K) Hitch]. *Agrociencia*, 38(1), 1-12. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/302/30238101.pdf>
- Rodríguez, C. (2012). *Producción de biogás a partir del bagazo cervecero* (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Chile.
- Salas, T., y Meza, V. (2011). *Compost de etiquetas de cerveza. Evaluación de la fitotoxicidad en semillas*. Segundo Simposium de Residuos Sólidos en el Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Sandhu, S., Shakya, M., Deshmukh., L., Aharwal, R. & Kumar, S. (2016). Determination of hydrocarbon degrading potentiality of indigenous fungal isolates. *International Journal of Environmental Sciences*, 6(6), 1163-1172. Recuperado de <http://www.ipublishing.co.in/ijesarticles/fourteen/articles/volsix/EIJES6111.pdf>
- Solanas, A. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la Zona no Saturada del Suelo*, 11, 1-8.

- Tapia, I. (2002). *Capacidad degradativa del petróleo de hongos aislados de agua de mar - litoral del Puerto Eten. Enero-Mayo, 2002*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Uzoamaka, G., Floretta, T. & Florence, M. (2009). Hydrocarbon degradation potentials of indigenous fungal isolates from petroleum contaminated soils. *Journal of Physical & Natural Sciences*, 3, 1-6.
- Valenzuela, E., Solís, L., Martínez, O y Pinochet, D. (2006). Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo. *Boletín Micológico*, 21, 35-41. doi: <http://dx.doi.org/10.22370/bolmicol.2006.21.0.242>
- Vanishree, M., Thatheyus, A. & Ramya, D. (2014). Biodegradation of petrol using *Aspergillus* sp. *Annual Research & Review in Biology*, 4(6), 914-923. Recuperado de <http://www.sciencedomain.org/review-history/2699>
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, N. y Vásquez, V. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Oficina de Impresiones y Publicaciones Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Vega, R. (2011). *Selección, caracterización y evaluación de hongos potencialmente utilizables en biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos, a nivel de laboratorio, a partir de muestras de suelo de la parroquia San Carlos, perteneciente al cantón Joya de los Sachas, provincia de Orellana*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Villacis, J. (2013). *Biorremediación de suelos contaminados con benzo [a] pireno empleando *Pleurotus ostreatus** (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. (Tesis de doctorado). Universidad de Barcelona, España.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras de suelo para el aislamiento de hongos filamentosos degradadores de hidrocarburos de petróleo (en Vásquez et al., 2012)

$$n = \frac{z^2(p.q)}{t^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2(0,9 \times 0,1)}{(0,08)^2}$$

n = 54 muestras de suelo contaminado con petróleo

Donde:

n = Tamaño de muestra

z = 1,96 ($\alpha = 0,05$), valor estándar

p = Prevalencia de hongos filamentosos hidrocarbonoclásticos en el suelo experimental (90%)

q = Ausencia (10%)

t = Error permitido (8%)

ANEXO 2

Medios de cultivo para el aislamiento, identificación y mantenimiento de hongos filamentosos

a. Caldo nutritivo (en Chávez, 2010)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agua destilada	1000 mL

b. Caldo Bushnell Haas (en Chávez, 2010)

Componentes	gL ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄	0,20
Cl ₂ Ca	0,02
FeCl ₃	0,005
Agua destilada	1000 mL

Ajustar a pH 7,0

c. Agar papa dextrosa (en Arias & Piñeros, 2008)

Componentes	gL⁻¹
Papa	400,0
Glucosa	20,0
Sulfato de amonio	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000 mL

Ajustar a pH 5,6. Realizar una infusión de papa y hervir hasta lograr una solución con todos los componentes. Colocar en autoclave 121°C por 15 minutos.

d. Medio Czapek (en Petit et al., 2013)

Componentes	gL⁻¹
NaNO ₃	2,0
KCl	0,5
MgSO ₄	0,5
FeSO ₄	0,01
K ₂ HPO ₄	1,0
Sacarosa	30,0
Agua destilada	1000 mL

ANEXO 3

Cálculo del número más probable (NMP) para número de microorganismos totales y microorganismos hidrocarbonoclasticos (en Huapaya, 2011)

$$\text{NMP/100 mL} = (\text{Tabla NMP/100 mL}) 10/V$$

Donde:

(Tabla NMP/100 mL) = valor dado en la tabla según el código.

V = volumen de muestra de la primera dilución tomada en cuenta por el código.

Tabla NMP/100mL para series de diluciones en réplicas de tres por nivel de dilución

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

ANEXO 4

Cálculo de las unidades formadoras de colonia (UFC) para mohos y levaduras según International Standard Organization ISO 7218 (Fundación General Universidad de Salamanca, 2017)

$$N = \frac{\sum c}{V (n_1 + 0,1n_2)d}$$

Donde:

N : Número de Unidades Formadoras de Colonia por gramo o mililitro

$\sum c$: Suma de todas las colonias contadas en todas las placas retenidas de diluciones sucesivas

n_1 : Número de placas de la primera dilución retenida

n_2 : Número de placas de la segunda dilución consecutiva retenida

d : Nivel de dilución correspondiente a la primera dilución retenida

V : Volumen de inóculo aplicado a cada placa, en mililitros

ANEXO 5

Número de aislados de hongos filamentosos en muestras de suelo contaminado con petróleo

Muestra Código	Número de aislados
01	2
02	1
03	2
04	2
05	2
06	1
07	3
08	3
09	3
10	2
11	1
12	2
13	1
14	2
15	3
16	3
17	3
18	3
19	1
20	2
21	2
22	3
23	2
24	1
25	2
26	2
27	3
28	2
29	3
30	3
31	1
32	2
33	1
34	2
35	2
36	2
37	1
38	1
39	1
40	3
41	2
42	2
43	1
44	1
45	1
46	1
47	1
48	3
49	1
50	3
51	2
52	2
53	2
54	3

ANEXO 6

Diámetro de las colonias fúngicas desarrolladas en agar Czapek con sacarosa y petróleo

Código	Cepa	Diámetro (cm)		Diferencia (cm)
		Czapek + Sacarosa	Czapek + petróleo	
1	<i>Aspergillus</i>	4,6	4,4	0,2
2	<i>Aspergillus</i>	7,5	7,0	0,5
3	<i>Aspergillus</i>	2,5	2,0	0,5
4	<i>Aspergillus</i>	2,8	2,2	0,6
5	<i>Aspergillus</i>	6,5	6,0	0,5
6	<i>Aspergillus</i>	6,0	5,8	0,2
7	<i>Cunninghamella</i>	2,3	1,8	0,5
8	<i>Cunninghamella</i>	2,3	2,0	0,3
9	<i>Beauveria</i>	1,2	-	-
10	<i>Cladosporium</i>	2,0	1,5	0,5
11	<i>Penicillium</i>	1,6	1,0	0,6
12	<i>Penicillium</i>	1,6	1,3	0,3
13	<i>Periconia</i>	6,8	5,0	1,8
14	<i>Paecilomyces</i>	2,1	0,8	1,3
15	<i>Paecilomyces</i>	1,5	1,0	0,5
16	<i>Bipolaris</i>	5,2	4,8	0,4
17	<i>Aspergillus</i>	4,6	4,4	0,2
18	<i>Aspergillus</i>	4,0	3,6	0,4
19	<i>Fusarium</i>	2,4	-	-
20	<i>Fusarium</i>	2,0	-	-
21	<i>Rhizopus</i>	4,4	-	-
22	<i>Rhizopus</i>	4,6	4,0	0,6
23	<i>Syncephalastrum</i>	8,0	7,0	1,0
24	<i>Syncephalastrum</i>	5,5	5,0	0,5
25	<i>Syncephalastrum</i>	5,5	5,0	0,5
26	<i>Gliocladium</i>	5,0	1,5	3,5
27	<i>Memnoniella</i>	4,0	3,0	1,0
28	<i>Penicillium</i>	2,0	1,8	0,2
29	<i>Penicillium</i>	1,6	1,5	0,1
30	<i>Penicillium</i>	2,0	-	-

Continuación...

31	<i>Cunninghamella</i>	1,8	1,0	0,8
32	<i>Monilia</i>	6,0	-	-
33	<i>Aspergillus</i>	3,5	3,4	0,1
34	<i>Aspergillus</i>	3,7	3,7	0
35	<i>Aspergillus</i>	4,2	3,5	0,7
36	<i>Memnoniella</i>	4,0	4,0	0
37	<i>Paecilomyces</i>	1,9	1,4	0,5
38	<i>Cunninghamella</i>	3,6	2,6	1,0
39	<i>Cunninghamella</i>	1,6	1,6	0
40	<i>Aspergillus</i>	4,6	3,4	1,2
41	<i>Cunninghamella</i>	3,8	3,0	0,8
42	<i>Cunninghamella</i>	2,0	1,7	0,3
43	<i>Aspergillus</i>	3,7	2,5	1,2
44	<i>Aspergillus</i>	5,5	5,0	0,5
45	<i>Aspergillus</i>	5,0	4,5	0,5
46	<i>Paecilomyces</i>	1,7	1,3	0,4
47	<i>Penicillium</i>	2,0	1,9	0,1
48	<i>Paecilomyces</i>	2,3	2,3	0
49	<i>Aspergillus</i>	6,0	5,5	0,5
50	<i>Cunninghamella</i>	2,4	2,0	0,4
51	<i>Aspergillus</i>	4,2	4,2	0
52	<i>Paecilomyces</i>	2,6	1,5	1,1
53	<i>Cunninghamella</i>	2,8	2,8	0
54	<i>Mucor</i>	3,5	3,0	0,5
55	<i>Beauveria</i>	1,1	1,0	0,1
56	<i>Bipolaris</i>	4,0	3,5	0,5
57	<i>Paecilomyces</i>	1,5	1,0	0,5
58	<i>Periconia</i>	4,4	2,6	1,8
59	<i>Rhizopus</i>	4,3	2,8	1,5
60	<i>Penicillium</i>	8,0	-	-
61	<i>Syncephalastrum</i>	7,0	4,0	3,0
62	<i>Cladosporium</i>	3,0	-	-
63	<i>Fusarium</i>	2,4	-	-
64	<i>Penicillium</i>	1,5	-	-
65	<i>Syncephalastrum</i>	5,5	5,0	0,5
66	<i>Fusarium</i>	5,0	2,0	3,0
67	<i>Rhizopus</i>	1,4	0,8	0,6
68	<i>Paecilomyces</i>	2,1	0,8	1,3
69	<i>Bipolaris</i>	6,5	6,0	0,5

Continuación...

70	<i>Periconia</i>	6,8	5,0	1,8
71	<i>Gliocladium</i>	5,0	1,5	3,5
72	<i>Mucor</i>	8,0	7,0	1,0
73	<i>Cladosporium</i>	3,0	-	-
74	<i>Penicillium</i>	2,0	-	-
75	<i>Cunninghamella</i>	1,8	0,9	0,9
76	<i>Paecilomyces</i>	2,1	1,5	0,6
77	<i>Paecilomyces</i>	2,5	1,0	1,5
78	<i>Paecilomyces</i>	3,8	3,2	0,6
79	<i>Cunninghamella</i>	2,7	2,7	0
80	<i>Cladosporium</i>	3,0	-	-
81	<i>Penicillium</i>	1,5	1,5	0
82	<i>Cladosporium</i>	5,0	-	-
83	<i>Cladosporium</i>	3,4	2,5	0,9
84	<i>Rhizopus</i>	4,6	4,0	0,6
85	<i>Cladosporium</i>	3,4	-	-
86	<i>Penicillium</i>	3,0	2,6	0,4
87	<i>Rhizopus</i>	4,6	-	-
88	<i>Rhizopus</i>	5,6	5,0	0,6
89	<i>Fusarium</i>	2,4	-	-
90	<i>Fusarium</i>	2,8	-	-
91	<i>Cladosporium</i>	3,0	2,0	1,0
92	<i>Cunninghamella</i>	1,2	1,0	0,2
93	<i>Paecilomyces</i>	3,4	3,2	0,2
94	<i>Syncephalastrum</i>	1,6	1,5	0,1
95	<i>Paecilomyces</i>	1,3	-	-
96	<i>Rhizopus</i>	4,8	-	-
97	<i>Fusarium</i>	2,0	-	-
98	<i>Syncephalastrum</i>	2,2	2,0	0,2
99	<i>Periconia</i>	3,9	1,2	2,7
100	<i>Syncephalastrum</i>	0,9	0,9	0
101	<i>Syncephalastrum</i>	4,0	3,5	0,5
102	<i>Penicillium</i>	2,0	1,9	0,1
103	<i>Fusarium</i>	3,0	2,2	0,8
104	<i>Memnoniella</i>	4,0	3,0	1,0
105	<i>Cladosporium</i>	2,0	1,0	1,0
106	<i>Monilia</i>	6,0	-	-

ANEXO 7

Géneros de Hongos filamentosos Hidrocarbonoclásticos seleccionados que presentaron la menor diferencia en el peso de la biomasa



Figura 20. Observación microscópica (400x) de Aspergillus sp. 018

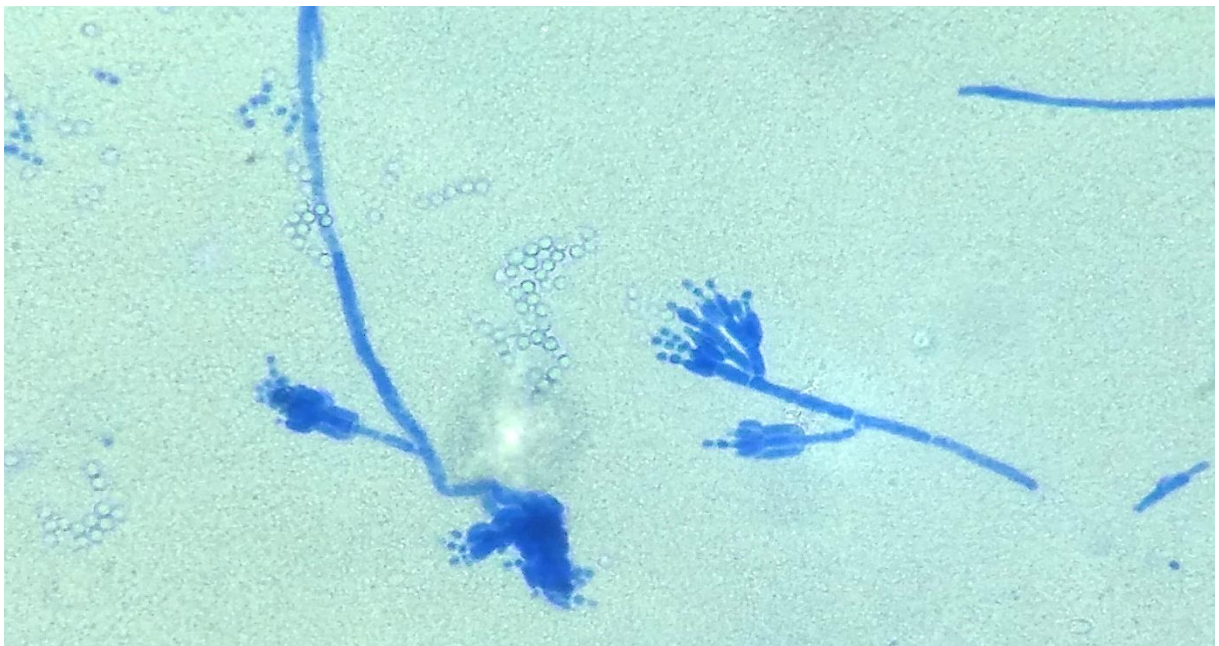


Figura 21. Observación microscópica (400x) de Penicillium sp. 012.

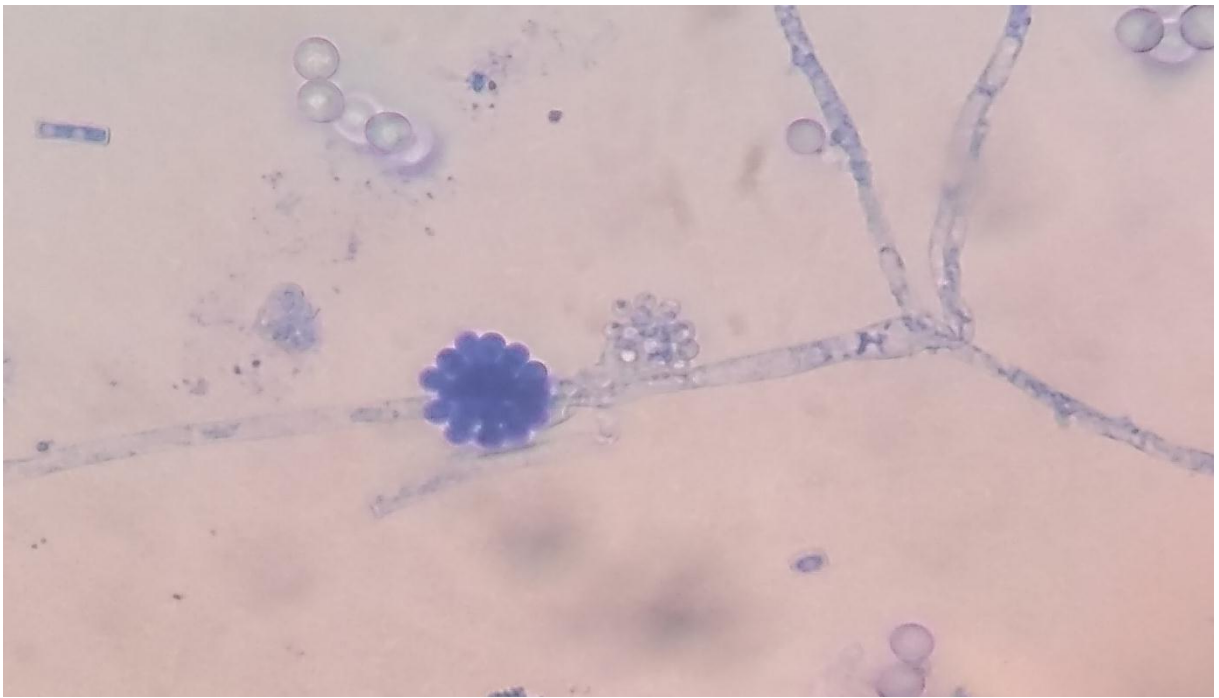


Figura 22. Observación microscópica (400x) de *Cunninghamella* sp. 092

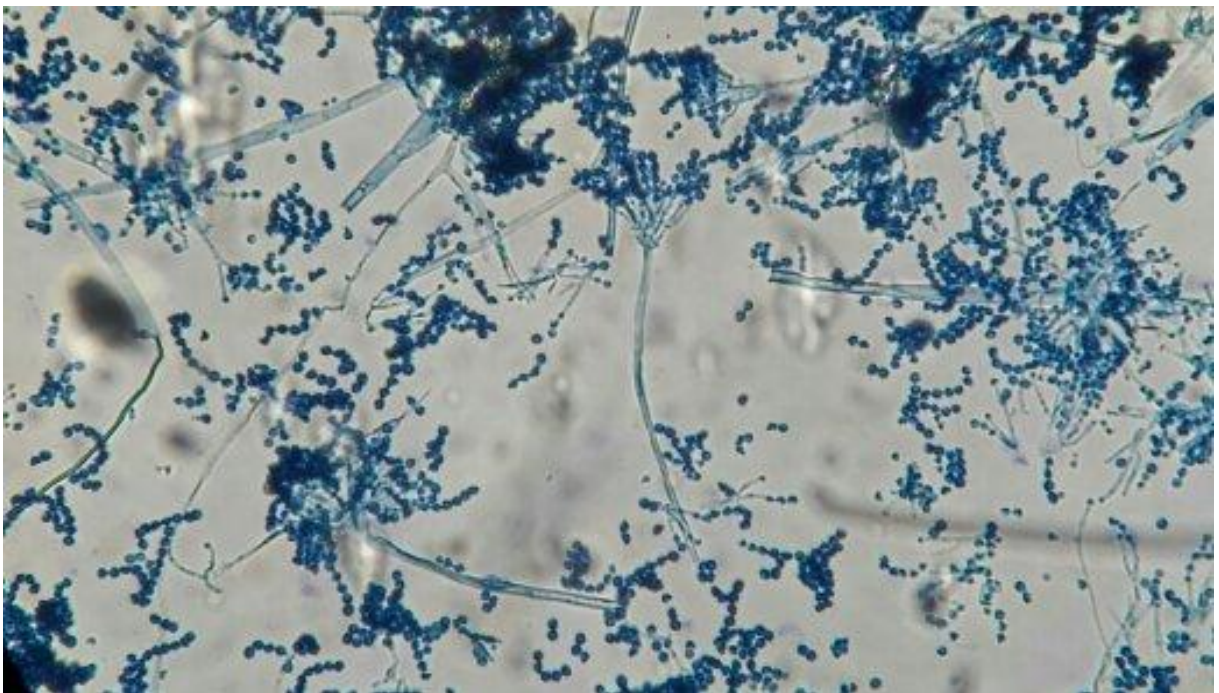


Figura 23. Observación microscópica (400x) de *Paecilomyces* sp. 046

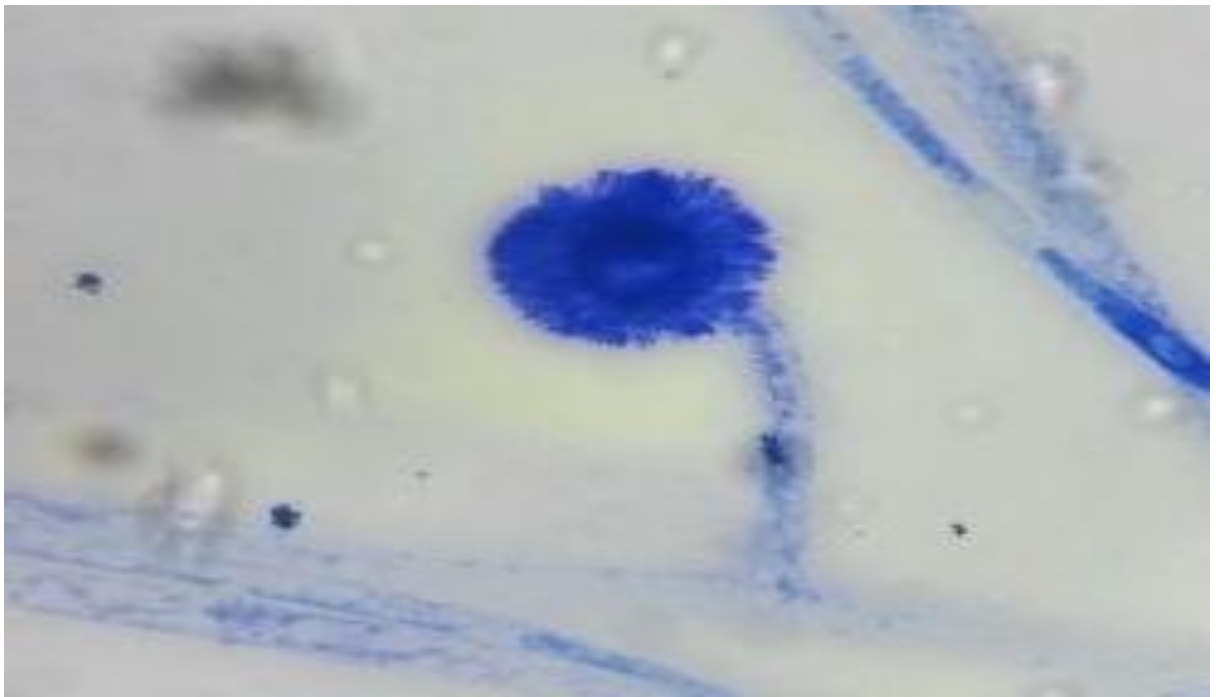


Figura 24. Observación microscópica (400x) de Syncephalastrum sp. 094

ANEXO 8

Germinación de *Raphanus sativus* L. sembrado en microcosmos al inicio de la biodegradación por hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos

Tratamientos	Promedio elongación radicular (mm)	Porcentaje relativo de germinación (PGR)	Crecimiento relativo de radícula (CRR)	Índice de germinación (%IG)	Nivel de fitotoxicidad
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	0	0	0	0	Severo
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	0	0	0	0	Severo
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	0	0	0	0	Severo
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	0	0	0	0	Severo
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	0	0	0	0	Severo
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	0	0	0	0	Severo
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	0	0	0	0	Severo
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	0	0	0	0	Severo
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	0	0	0	0	Severo
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	0	0	0	0	Severo
T11: Testigo absoluto	0	0	0	0	Severo
T12: Testigo abiótico	0	0	0	0	Severo

ANEXO 9

Germinación de *Raphanus sativus* L. sembrado en microcosmos a los 30 días de la biodegradación por hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos

Tratamientos	Promedio elongación radicular (mm)	Porcentaje relativo de germinación (PGR)	Crecimiento relativo de radícula (CRR)	Índice de germinación (%IG)	Nivel de fitotoxicidad
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	2,2	5	40	2	Severo
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	2,8	8	50	4	Severo
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	1,6	7	28	2	Severo
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	4.5	10	80	8	Severo
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	2,8	8	50	4	Severo
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	3,4	8	62	5	Severo
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	2,8	8	50	4	Severo
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	3,9	7	71	5	Severo
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	3,4	8	62	5	Severo
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	2,8	8	50	4	Severo
T11: Testigo absoluto	2,8	6	50	3	Severo
T12: Testigo abiótico	0	0	0	0	Severo

ANEXO 10

Germinación de *Raphanus sativus* L. sembrado en microcosmos a los 60 días de la biodegradación por hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos

Tratamientos	Promedio elongación radicular (mm)	Porcentaje relativo de germinación (PGR)	Crecimiento relativo de radícula (CRR)	Índice de germinación (%IG)	Nivel de fitotoxicidad
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	1,8	18	33	6	Severo
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	3,0	20	55	11	Severo
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	3,1	14	57	8	Severo
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	3,8	26	69	18	Severo
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	2,8	20	50	10	Severo
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	3,4	18	61	11	Severo
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	2,8	16	50	8	Severo
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	2,8	12	50	6	Severo
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	2,8	12	50	6	Severo
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	2,4	14	43	6	Severo
T11: Testigo absoluto	2,7	10	48	5	Severo
T12: Testigo abiótico	0	0	0	0	Severo

ANEXO 11

Germinación de *Raphanus sativus* L. sembrado en microcosmos a los 90 días de la biodegradación por hongos filamentosos hidrocarbonoclasticos

Tratamientos	Promedio elongación radicular (mm)	Porcentaje relativo de germinación (PGR)	Crecimiento relativo de radícula (CRR)	Índice de germinación (%IG)	Nivel de fitotoxicidad
T1: <i>Aspergillus</i> sp. 001	4,0	85	71	60	Moderado
T2: <i>Aspergillus</i> sp. 006	4,2	86	75	64	Moderado
T3: <i>Penicillium</i> sp. 012	4,7	82	72	59	Moderado
T4: <i>Aspergillus</i> sp. 018	5,2	85	80	74	Moderado
T5: <i>Penicillium</i> sp. 029	4,2	86	71	64	Moderado
T6: <i>Aspergillus</i> sp. 033	5,0	82	76	62	Moderado
T7: <i>Paecilomyces</i> sp. 046	4,8	82	83	68	Moderado
T8: <i>Penicillium</i> sp. 086	4,8	85	71	60	Moderado
T9: <i>Cunninghamella</i> sp. 092	3,7	73	66	48	Severo
T10: <i>Syncephalastrum</i> sp. 094	3,6	76	64	49	Severo
T11: Testigo absoluto	3,6	66	58	38	Severo
T12: Testigo abiótico	2,2	24	41	10	Severo

ANEXO 12

Prueba de homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de los valores promedios del índice de germinación de *Raphanus sativus* L.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gL1	gL2	gL3
1,372	11	24	,248

Anova de un factor

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9329,000	11	848,091	79,509	,000
Intra-grupos	256,000	24	10,667		
Total	9585,000	35			