

Evaluación *in vitro* del potencial de *Trichoderma* sp. empleando hidrocarburos como fuente principal de Carbono

Reyes, Y.¹; Quintana, S.¹; Cabrera, M.¹; Vázquez, L.¹; Arrúa, A.²; Martínez, L.³

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), Universidad Nacional de Asunción (UNA)

²Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), Universidad Nacional de Asunción (UNA)

³Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), Universidad Nacional de Asunción (UNA)

E mail del autor: magalizrc@gmail.com

Evaluación *in vitro* del potencial de *Trichoderma* sp empleando hidrocarburos como fuente principal de Carbono. La biorremediación es una herramienta para la degradación o transformación de diferentes tipos de contaminantes y el principio de su uso se basa en los sistemas enzimáticos de los hongos que pueden degradar una variedad de compuestos. *Trichoderma* sp. tiene la capacidad de degradar compuestos derivados de petróleo, por lo que puede ser una alternativa viable para la descontaminación. Para determinar su efectividad se llevó a cabo un ensayo, en condiciones *in vitro*, cultivándolos a diferentes concentraciones de glucosa: diésel en las siguientes proporciones: 75:25, 50:50 y 25:75, en un medio de extracto de papa natural. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Las mediciones se llevaron a cabo en un periodo de 14 días observando que la mejor proporción diésel:glucosa fue 75:25, lo que muestra que posiblemente el hongo degrada mejor los hidrocarburos en presencia de un bioestimulante como la glucosa o dextrosa, como fuentes secundarias de carbono.

Palabras Clave: biorremediación, *Trichoderma* sp., hidrocarburos, degradación, potencial

In vitro evaluation of the potential of *Trichoderma* sp using hydrocarbons as main source of Carbon Mycoremediation is a very useful tool for degrading and transforming different types of pollutants in some environments and its main function is based on fungus enzymatic systems that can remove a wide variety of compounds. *Trichoderma* sp has the ability to degrade petroleum-derived compounds, hence it is a viable alternative to decontaminate soils affected by fuel leaks. To determine its effectiveness a trial was carried out in which samples of *Trichoderma* sp. Were grown in *in vitro* conditions at different concentrations of glucose-diesel, whose proportions were: 75:25, 50:50, 25:75 using a medium of natural potato extract. Each treatment was done in duplicate. Measurements were taken during 14 days, and it was observed that the best proportion diesel-glucose was 75:25, which might indicate that the fungus degrades hydrocarbons more effectively in the presence of a biostimulant such as glucose or dextrose as secondary sources of carbon.

Keywords: bioremediation, *Trichoderma* sp., hydrocarbons, degradation, potential

INTRODUCCIÓN

El petróleo es una mezcla compleja de compuestos orgánicos incluyendo algunos constituyentes órgano-metálicos, los complejos más solubles son aquellos de níquel y vanadio. El petróleo se extrae de diferentes reservas y en todas se puede

observar algunas variaciones en cuanto a su composición. Se sabe que los derivados de petróleo, entre ellos, el diésel; sirven como sustrato para diferentes microorganismos que modifican el crudo por medio de varias vías metabólicas para su beneficio, por lo que son una opción favorable a la hora de remediar los

Steviana, Vol. 8(1), 2016 pp. 3 – 8.

Original recibido el 30 de junio de 2016.

Aceptado el 12 de septiembre de 2016.

ecosistemas dañados, pero también existen ciertas condiciones de estos microorganismos, como el hecho de que deben ser termófilos, resistentes a solventes orgánicos, enzimas termoestables y bajos requerimientos de oxígeno (Anneweiler, E. *et al.*, 2000).

La micorremediación se define como la acción utilizar hongos en ambientes contaminados para acelerar los procesos de biodegradación naturales (Swannell, R. *et al.*, 1996). Los resultados de ensayos a campo han sido evaluados para ser utilizados en el tratamiento de ambientes contaminados por derrames de petróleo o sus derivados, y se han observado que son favorables pero hay muchos factores que afectan a estos tratamientos, como las condiciones climáticas y los niveles de oxígeno, por lo que es conveniente tratar de controlar en lo posible la mayor cantidad de variables para lograr resultados óptimos. Las respuestas fisiológicas de diversos microorganismos frente a los hidrocarburos, incluyendo las alteraciones de la membrana y los mecanismos de adaptación han sido ampliamente estudiadas con el advenimiento de la biología molecular, y se ha podido comprender en gran parte la dinámica de las comunidades microbianas en los ecosistemas que han sufrido un impacto del petróleo (Van Hamme, J. *et al.*, 2003).

Estudios parciales han demostrado la efectividad del uso de hongos para remediación en derrames de petróleo, debido a que, al parecer, ciertos tipos de hongos desarrollan un sistema enzimático luego de estar en contacto con los hidrocarburos por largo tiempo, y se vieron resultados favorables en suelo más que en agua (Sherard *et al.*, 1976) lo que puede

deberse a que el ambiente acuático es más difícil que se lleve a cabo la esporulación y también la inhibición de las esporas por la alta salinidad en caso de ambientes marítimos. El objetivo del trabajo radica en evaluar el potencial de *Trichoderma* sp., en la utilización de hidrocarburos (diésel) como fuente de carbono a diferentes concentraciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la cepa

La cepa de *Trichoderma* sp. fue provista por la Dra. Andrea Arrúa. La misma, fue aislada a partir de semillas de trigo en el Laboratorio de Biotecnología de Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA).

Se empleó Diésel (derivado de petróleo) para la evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos, el mismo fue obtenido en forma comercial de una estación de servicios del microcentro de Asunción.

Activación de la cepa Trichoderma sp.

La activación se llevó a cabo en las instalaciones del CEMIT, con tal motivo, se procedió a inocular una placa con medio agar-dextrosa-papa, tomando un explante de la cepa provista e inoculándola. La misma fue mantenida a temperatura ambiente (25°C), por siete días bajo condiciones controladas de luz y humedad. Posteriormente, se caracterizó el hongo mediante microscopía, de modo a evitar la presencia de esporas contaminantes en la placa.

Inoculación de Trichoderma sp en medios de cultivo conteniendo Glucosa y Diésel como fuente principal de carbono

Los medios de cultivo empleados en los tratamientos fueron preparados teniendo en cuenta las proporciones de carbono presente en la formulación de los medios agar-dextrosa-papa (PDA) y agar-glucosa-papa (PGA), señalados por Cañedos *et al*, 2004. como medios óptimos y adecuados para el aislamiento y cultivo de hongos filamentosos. Los medios de cultivo fueron autoclavados por 15 minutos a 121 °C, el diésel fue agregado, posteriormente.

La cepa activada de *Trichoderma sp* fue inoculada por duplicado y mantenida a temperatura ambiente en condiciones de luz y humedad por siete días, realizando diariamente tomas fotográficas y mediciones en las placas inoculadas.

Tratamiento 1: PGA (glucosa como única fuente de carbono), preparado según especificaciones de Narrea *et al*, 2006.

Tratamiento 2: PGAH 75:25 (glucosa (75%p/p) y diésel(25%p/p) como principales fuentes de carbono), con 0,75 g. de glucosa y 143,5 µL de diesel para 50 mL de medio.

Tratamiento 3: PGAH 50:50 (glucosa (50%p/p) y diésel (50%p/p) como principales fuentes de carbono), con 0,50 g. de glucosa y 286,5 µL de diesel para 50 mL de medio.

Tratamiento 4: PGAH 25:75 (glucosa (25%p/p),y diésel (75%p/p) como principales fuentes de carbono), con 0,25 g. de glucosa y 430 µL de diésel para 50 mL de medio.

Tratamiento 5: PHA (hidrocarburo (Diesel) como única fuente de Carbono), con 573 µL de diésel para 50 mL de medio.

El tratamiento 1 PGA se empleó como control negativo del experimento mientras

que el tratamiento 5 PHA fue empleado como control positivo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la figura 1, la cepa inoculada de *Trichoderma sp* presentó crecimiento radial en los tratamientos aplicados. Se evidencia una gran diferencia de crecimiento radial entre el control positivo (Diesel como única fuente de Carbono) y el negativo (Glucosa como única fuente de carbono), registrándose un radio inferior a los 1 cm para el control positivo y un radio de 4,5cm (radio total de la placa) para el control negativo en la última medición del día 14. En los tratamientos restantes se presentó un crecimiento mayor a los 3cm, evidenciando la capacidad del hongo de crecer en presencia de diesel en el medio de cultivo.

Si bien la figura 1 muestra crecimiento del hongo en todos los tratamientos, los mismos presentan diferencias en cuanto a la capacidad de crecer en forma radial, variando la eficiencia de crecimiento en cada tratamiento aplicado. Este efecto se muestra en la figura 2, la cual denota que la mayor eficiencia corresponde al tratamiento 2, siendo esta mayor incluso al del control negativo en donde se empleó glucosa como única fuente de Carbono disponible para la cepa. La menor eficiencia para crecimiento radial se observó en control negativo (Diesel como principal fuente de carbono), con lo cual se evidencia que la cepa de *Trichoderma sp* tiene la capacidad de crecer en presencia de diesel como única y principal fuente de carbono, a pesar de que la eficiencia sea la más baja entre los tratamientos aplicados.

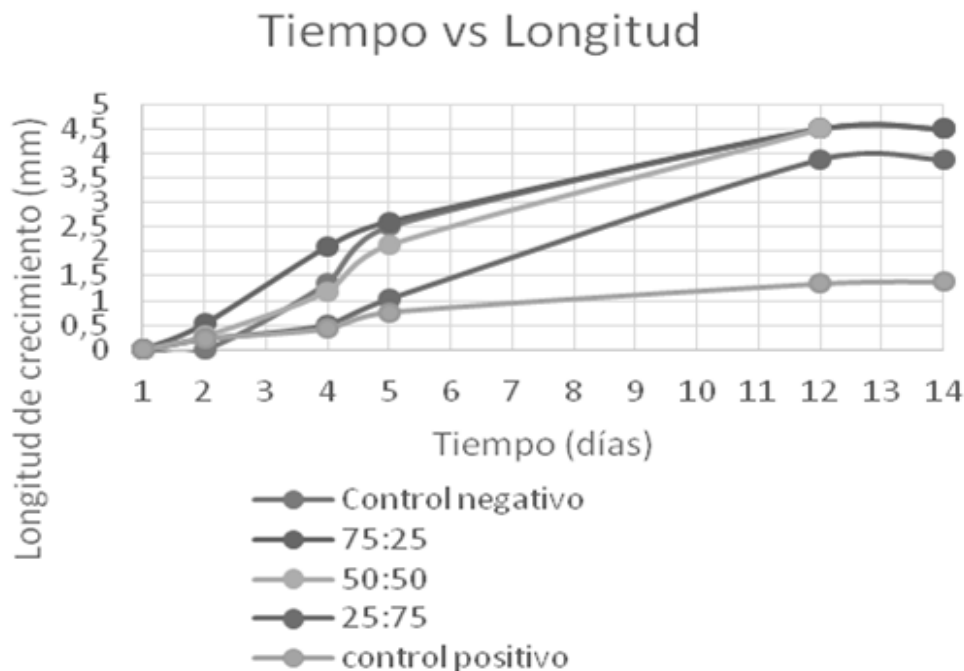


Fig. 1: Crecimiento radial de la cepa de *Trichoderma* sp evaluado en los 5 tratamientos aplicados. Se presenta la curva de crecimiento radial para los cinco tratamientos aplicados en el experimento. El control negativo y positivo involucra a la glucosa y diesel como la fuente principal de carbono, respectivamente. Los tratamientos 75:25, 50:50 y 25:75 corresponde a la proporción Glucosa:Diesel como fuentes principales de carbono. Las mediciones de los radios fueron efectuados hasta el día 14 posterior a la inoculación.

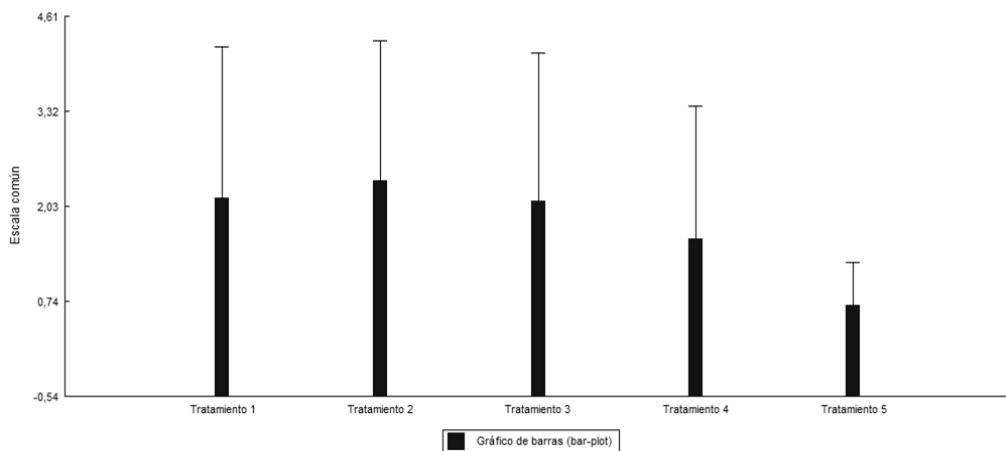


Fig. 2: Eficiencia de los tratamientos para el crecimiento radial de la cepa de *Trichoderma* sp: Se representa la eficiencia de los tratamientos utilizados para en el experimento. La misma fue estimada considerando el radio de la placa (4,5cm) y el crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* sp a los 14 días posteriores a la inoculación.

El crecimiento de la cepa de *Trichoderma* en medios de cultivos conteniendo Diesel, evidencia su capacidad para emplear el hidrocarburo como fuente principal de carbono y energía. Esto coincide con los resultados de Tanzadeh y Hachichat (2014) quienes lograron aislar cepas de *Trichoderma harzanium* en muestras de Diesel puro.

Siendo *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* los géneros de mayor frecuencia identificados en un análisis metagenómico realizado por Pernia y colaboradores en el 2012 sobre muestras de suelo contaminado con hidrocarburo, la capacidad demostrada en el trabajo de *Trichoderma* sp podría representar una alternativa al empleo de microorganismos con riesgo de patogenicidad.

Se ha mencionado que la capacidad degradativa se halla limitada en por tres factores principales; la estructura química, concentración del compuesto, y el metabolismo microbiano (Mardones, 2005).

El crecimiento radial de la cepa de *Trichoderma* sp, disminuyo ante el aumento de concentración de Diesel Oil en el medio, esto pone de manifiesto que efectivamente la concentración es un factor que influye en la degradación del compuesto (Velasco, 2002).

El Diesel oil adicionado al medio no impidió el crecimiento del hongo, la estructura química del compuesto podría estar relacionado con esto, siendo el Diesel oil un compuesto cuya estructura es de 10 a 15 átomos de carbono por molécula, se lo considera biodegradable según la clasificación efectuada por Hamzah (2012) quien propuso que los compuestos con aproximadamente 10 a 20 átomos de carbonos son los más biodegradables, en tanto que aquellos compuestos con 20 a 40

átomos por molécula, resultan menos biodegradables.

El hecho de que se haya presentado crecimiento radial en todos los tratamientos, inclusive en tratamiento 5 en el cual el Diesel era la única fuente de carbono y que se haya evidenciado diferentes efectividades entre los tratamientos, se demuestra que la capacidad del microorganismo de adaptarse al sustrato es un factor influyente en la degradación del contaminante. En base a estos resultados, se considera que la cepa de *Trichoderma* sp utiliza Diesel Oil como fuente de energía para su crecimiento.

CONCLUSIONES

Los ensayos permitieron conocer las proporciones en las cuales *Trichoderma* sp. posee un mayor crecimiento radial, siendo el tratamiento 2: PGAH 75:25 (glucosa (75%p/p) y diesel (25%p/p) como principales fuentes de carbono) la que permitió un mejor desarrollo del hongo, en tanto que el menor crecimiento radial se presentó en el tratamiento 5 PHA (hidrocarburo(Diesel) como única fuente de Carbono), esto indica que si bien el diesel puede ser utilizado como sustrato para el crecimiento del hongo es necesario que en el medio se encuentre otra fuente de carbono que ayude a potenciar el crecimiento y obtener una mejor utilización del diesel lo cual se puede lograr a través de la bioestimulación y de esta manera se podría realizar la biorremediación de ambientes contaminados por la presencia de Diesel.

AGRADECIMIENTOS

A CEMIT y FACEN.

REFERENCIAS

- Anneweiler, E.; Kulkarni, S.; Palanade, A. 2000. Biorremediation of Petroleum Hydrocarbos in Soils. Microorganisms in Enviromental Management: Microbes and Environment. Doi10.10007/978-94-0072229-3_26.
- Cañedo, V.; Ames, T. 2004 Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos entomopatógenos. CIP Lima – Perú. 20p.
- Castells, X. 2012 Reciclaje de residuos industriales. Editorial Díaz de Santos. Argentina. pp 624-624.
- Hamzah, A.; Zarim, M.; Hamid, A.; Senafi, F. 2012 Optimal physical and nutrient parameter for growth of *Trichoderma virens* for heavy crude oil degradation. *Sain Malasyana* 41(1): 71-79.
- Mardones, L. 2005. Degradación de Petróleo por Hongos aislados de la XII Región de Chile contaminados con hidrocarburos. Tesis de grado presentado para el título de Lic en Ciencias Biológicas. Chile.
- Narrea, M.; Zeballos, J. 2006. Evaluación de Medios de Cultivo para la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas de hongos entomopatógenos, *Beauveria brongniartii*. *Revista Peruana de Entomología* 45: 145-14.
- Pernía, B.; Demey, J.; Inojosa, Y.; Naranjo, L. 2012. Biodiversidad y Potencial Hidrocarbonoplastico de hongos aislados de crudos y derivados: Un análisis metagenómico. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental* 4: 1-39.
- Sherard, J.; Steele, R.; Decker, R. 1976. Pinhole Test for Identifying Dispersive Soils. *Journal of the Geotechnical Engineering Division* 102 (1): 69-85.
- Swannell, R.; Reilly, T.; Sveum, P.; Oudot, J. 1996. A protocol for experimental assessments of bioremediation strategies on shorelines. In: Proceedings of the International Oil Spill Conference. Washington, DC: American Petroleum Institute. 1995: 901-902.
- Tanzadeh, J.; Hachichat, A. 2014 Aplicación de *Bacillus subtilis* in degradation of Diesel Oil at polluted soil in Gilan. *Science* 971-976.
- Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O. 2003. Recent Advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4): 503-549.
- Velasco, J. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología y Red Latinoamericana de Prevención y gestión de Sitios Contaminados ReLASC. Perú. 28p.