

UTILIZACION DE DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS COMO BIODEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS I. : Ensayo preliminar

Cazau, C.*; Maselli, G.** y Arambarry, A. M. ***

*Becaria de Perfeccionamiento CONICET

**Facultad de Ciencias Naturales. UNLP

***Miembro Carrera del Investigador CONICET

Trabajo realizado en el Instituto de Botánica "C. Spegazzini" UNLP

Palabras clave: *Alternaria alternata*, *Cunninghamella elegans*, *Phanerochaete chrysosporium*, biodegradación, hidrocarburos.

Key words: *Alternaria alternata*, *Cunninghamella elegans*, *Phanerochaete chrysosporium*, hydrocarbon biodegradation.

RESUMEN

La degradación de compuestos orgánicos en la naturaleza es llevada a cabo por los microorganismos "in situ". En los últimos años se ha tratado de usar la capacidad degradativa de los hongos en la descomposición de sustancias producidas por el hombre y que son acumuladas en el medio ambiente como contaminantes.

Se utilizó una mezcla de tres especies fúngicas: *Alternaria alternata*, *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium*, las que fueron cultivadas con los desechos de barro durante 30 días en condiciones de laboratorio.

Los resultados de los análisis cromatográficos indican que la fracción aromática de la mezcla de hidrocarburos presentes en los barro utilizados ha tenido una importante degradación. Asimismo las relaciones de los isoprenoides a sus respectivos normales (Pristano nC17 y Fitano nC18) son mayores en las muestras tratadas que en la testigo, siendo esto también evidencia de que hubo degradación.

INTRODUCCION

La degradación de los compuestos orgánicos en la naturaleza es llevada a cabo por los microorganismos "in situ", teniendo ésta una importancia crítica para el sucesivo funcionamiento de la biosfera.

El ataque enzimático de las moléculas complejas, que provienen de la biomasa, tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, completa el ciclo del carbono, iniciado en la fotosíntesis. De esta manera quedan liberados en el medio los nutrientes N, P y S, para las sucesivas generaciones de la biota (Madsen, E.L., 1991).

SUMMARY

[Utilization of different species of fungi as hydrocarbon biodegradatives. I: Preliminary assay.]

The degradation of organic compounds in nature is carried out by the microorganisms "in situ". In the last years it has been tried to use the degradative capacity of the fungi in the descomposition of the substances produced by man and which are accumulated in the environment as contaminants. A mixture of three species of fungi: has been used: *Alternaria alternata*, *Cunninghamella elegans* and *Phanerochaete chrysosporium* and they have been cultivated with mud wastes during 30 days in lab conditions. The results of chromatographic analysis indicate that the aromatic fraction of the mixture of the hydrocarbon in such muds has had a great percent of degradation. The relations between the isoprenoids to their corresponding normals (Pristane nC17 Phytane nC18) are higher in treated samples than in the test samples; this is also an evidence that degradation took place.

El mantenimiento de la biosfera por los microorganismos a lo largo del tiempo geológico es testimonio de la efectividad de los procesos biológicos y geoquímicos; que tienen lugar en la degradación de sustancias orgánicas complejas. Las reacciones de biodegradación pueden romper las uniones intramoleculares de los compuestos orgánicos (Brook, T.D., 1980). Esta situación, nos permite hacer uso de los microorganismos para el tratamiento de desechos industriales, así como también la recuperación de áreas contaminadas. Tanto los procesos de degradación espontánea (Bossert, L. & Bartha, R. 1984), como los

manejados tecnológicamente apuntan a aliviar los problemas del medio ambiente.

Los tratamientos que se usan actualmente en la recuperación de áreas contaminadas (Remediación, Madsen 1991), pueden ser: físicos, químicos, térmicos (Thomas, J.M. & Ward, C.H. 1989) y biológicos (Morgan, P. & Watkinson, R. J., 1989).

Los métodos físicos como la decantación, filtración y extracción, son efectivos para tratar gran diversidad de desechos donde se produce la separación, pero no la neutralización del efecto tóxico; requiriendo siempre de otra etapa para la disposición posterior del producto.

Los tratamientos químicos pueden ser aplicados a una gran variedad de materiales pero su principal inconveniente radica en que pueden generar subproductos más peligrosos que los iniciales. El aislamiento o alteración de residuos a través de la estabilización, solidificación o encapsulamiento es un medio de control efectivo, pero temporario.

La incineración entre los métodos térmicos, produce una reducción efectiva de los volúmenes de desechos, destruyéndolos. Es necesario un severo control en los productos gaseosos generados por la combustión como así también el destino de la ceniza que puede requerir tratamientos posteriores. Todo el tratamiento es muy costoso.

Los tratamientos biológicos tradicionales son usados para desechos y procesos de "compostaje". Tales procesos producen barros y nuevamente desechos acuosos, que requieren de un tratamiento para su disposición final.

Así mismo se ha demostrado que el rango de contaminantes que pueden ser degradado biológicamente, está limitado a un grupo de compuestos orgánicos: hidrocarburos derivados del petróleo, pesticidas y plásticos.

Actualmente la biodegradación puede ser usada como una tecnología para el tratamiento de desechos y la recuperación de áreas contaminadas, ofreciendo la posibilidad de desintoxicar y degradar los contaminantes, eliminando la agresividad al medio.

Los medios de bioremediación más utilizados son: 1.- **Landfarming** (Raymond et al. 1978), que se aplica para desechos sólidos, líquidos o barros que son mezclados en el suelo o compost, produciendo biodegradación. 2.- Los **bioreactores**, constituyen un método muy rápido y eficiente para degradar desechos peligrosos. Los parámetros físico-químicos que controlan estos procesos son fácilmente manejables, pero este método es muy costoso. 3.- **Bioremediación "in situ"** constituye una tecnología que tiende a la optimización de las propiedades biológicas naturales del medio, para efectivizar la biodegradación de los contaminantes. Se utilizan microorganismos para este tipo de tratamiento.

En nuestro país Vechioli-Panceira (1986) están

realizando el estudio de la degradación de hidrocarburos utilizando bacterias.

En los últimos años, se ha tratado de utilizar la capacidad degradativa de los hongos para la descomposición de sustancias producidas por el hombre y que acumuladas en el medio son importantes contaminantes. En la actualidad se están intensificando los estudios de la biodegradación "in situ" (Thomas & Ward 1989; y Madsen, 1991) de numerosos contaminantes como, hidrocarburos alifáticos (Kirk et al., 1988; Hettige et al., 1989), aromáticos policíclicos (Holland et al., 1986; Bumpus, 1989) y mezclas (Atlas, 1981). Estas investigaciones están abocadas a la tarea de utilizar especies fúngicas en el tratamiento de contaminantes y determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de las mismas para mejorar su rendimiento.

Consideramos que esta metodología representa a largo plazo, una forma altamente eficiente de eliminar sustancias ajenas al ecosistema, evitando la generación de productos residuales.

En la mayor parte del mundo los efluentes, especialmente los provenientes de las destilerías, están siendo tratados de esta manera.

Los barros utilizados en este trabajo, con un alto grado de contaminación con hidrocarburos y las especies fúngicas aisladas provienen de un ambiente natural cercano a Río Santiago (Provincia de Buenos Aires, Argentina), con excepción de *Phanerochaete chrysosporium*. La capacidad degradativa de *Alternaria alternata* fue demostrada por Rubdige, T. (1974), para compuestos alifáticos como el kerosene, mientras que Gerasimowa, N.M. et al. (1975) estudiaron la capacidad de *Cunninghamella elegans* de asimilar hidrocarburos (n-alcanos). *Phanerochaete chrysosporium* está citado como degradador de hidrocarburos aromáticos (Bumpus, J. 1989).

Este trabajo preliminar fue realizado en laboratorio utilizando Erlenmeyer, para poder probar la capacidad degradativa de una mezcla de especies fúngicas autóctonas e introducidas, para luego replantear el mismo "in situ" a otra escala.

Nuestros objetivos son: probar la actividad conjunta de distintas especies fúngicas en la recuperación efluentes industriales.

MATERIALES Y METODOS

1.- Tratamiento químico y cromatográfico

* Las muestras a estudiar fueron previamente acondicionadas para luego extraer de ellas los hidrocarburos presentes.

La extracción se efectuó en Soxhlet durante 24 hrs. y se usó como solvente diclorometano no rectificado.

El extracto obtenido se concentró por roto-evaporación a 40°C y se cuantificó en mg/l.

* El extracto fue procesado por cromatografía líquida en columna abierta usándose sílica gel como fase estacionaria. De esta manera se obtuvieron tres fracciones eluidas con solventes de polaridad creciente, separándose hidrocarburos saturados (con ciclohexano), hidrocarburos aromáticos (con diclorometano) e hidrocarburos asfálticos (con cloroformo-metanol, 87 : 13).

* La fracción de hidrocarburos saturados se estudió por cromatografía gaseosa, para lo cual se usó un cromatógrafo HP 5880 con integrador-graficador, columna capilar de metil silicona de 25 metros de longitud y detector de ionización de llama (FID); obteniéndose los cromatogramas que se presentan en la figura 1. A partir de las cuales se calcularon los índices correspondientes.

2.- Tratamiento biológico:

Se usa una modificación de la técnica de Hettige & Sheridan. (1988).

* Se inició con cepas puras de las tres especies fúngicas: *Cunninghamella elegans* y *Alternaria alternata* aisladas de suelos contaminados, y *Phanerochaete chrysosporium*, por su capacidad degradadora de estos sustratos (Bumpus, 1989).

* Se inoculó cada una de estas cepas en un medio nutritivo líquido (medio basal más glucosa) durante 7 días, obteniéndose un cultivo enriquecido del hongo para poder usarlo en el paso siguiente.

* Se utilizó una mezcla de partes iguales de los tres hongos como inóculo y se les colocó en un medio basal más el hidrocarburo a probar.

* Se hicieron dos tratamientos: uno estático y otro bajo agitación mecánica: reservando una muestra testigo (medio basal más barro), sin adicionar el inóculo.

* Las muestras fueron mantenidas a temperatura de 24-25°C durante 30 días. Finalizado este período fue terminado el ensayo, tomándose alícuotas para su posterior análisis químico y cromatográfico. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y los resultados presentados corresponden a un promedio de los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla N° 1:

Tabla 1

Muestra	Testigo	Estático	Shaker
Hidrocarburos (mg/l de cultivo)	2918898	19484	13149
Saturados (%)	16.2	19.1	17.5
Aromáticos (%)	67.6	48.1	42.1
Asfálticos (%)	16.2	32.8	41.1

Para comprobar la acción fúngica sobre los residuos petroquímicos el estudio se basó en las relaciones de los isoprenoides a sus respectivos normales. Esto se debe a la resistencia que presentan los hidrocarburos saturados ramificados a la biodegradación con respecto a los saturados normales lo cual significa que dentro de este grupo de hidrocarburos los hongos degradan preferencialmente a los normales. Si la abundancia relativa de los hidrocarburos saturados disminuye, se produce consecuentemente un aumento de las relaciones $\text{Pristano}/n\text{C}_{17}$ y $\text{Fitano}/n\text{C}_{18}$ (Tabla N°2)

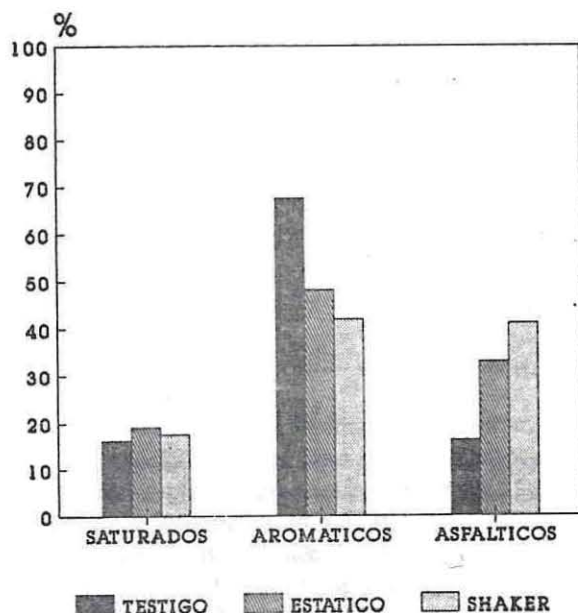
Tabla N° 2

	$\text{Pristano}/n\text{C}_{17}$	$\text{Fitano}/n\text{C}_{18}$
Shaker	0,771	0,693
Estático	0,431	0,400
Testigo	0,262	0,252

Si se observan los índices arriba calculados, éstos son mayores en las muestras tratadas que en la muestra testigo, y a su vez la muestra sometida a agitación (shaker) presenta la mayor relación de las dos, indicando que existió biodegradación.

Gráfico N° 1

Composición relativa de Saturados-Aromáticos-Asfálticos de los barros estudiados



Teniendo en cuenta el Gráfico N° 1: Se observa que la concentración relativa de la fracción asfáltica es mayor en las muestras tratadas que en la testigo. Este aumento es resultado de la resistencia de los asfaltenos a la acción biodegradadora de los hongos usados. Asimismo la disminución en la concentración relativa de la fracción aromática indica que ésta ha sido degradada.

Esto mismo se puede observar comparando el "finger printer" de los cromatogramas obtenidos por cromatografía gaseosa de la fracción aromática y saturada. Gráficos 2 y 3.

Si bien los barros estudiados presentan alto porcentaje de toxicidad, se ha comprobado que las especies utilizadas en esta experiencia resisten esa toxicidad, desarrollándose a expensas del sustrato (barros API).

Las tres especies que se probaron poseían, de acuerdo con la bibliografía (Rubdige, 1974; Gerasimova et al.,

1975 & Bumpus, 1989) una alta capacidad degradadora de diferentes hidrocarburos de manera aislada; la mezcla de las tres especies conlleva a una interacción de las mismas (sinergismo), produciendo en consecuencia la degradación de la mezcla del hidrocarburo, especialmente de la fracción aromática y en menor proporción la fracción alifática.

Grafico N° 2

Cromatogramas de la fracción de hidrocarburos saturados. A) Testigo. B) Estático. C) Shaker.

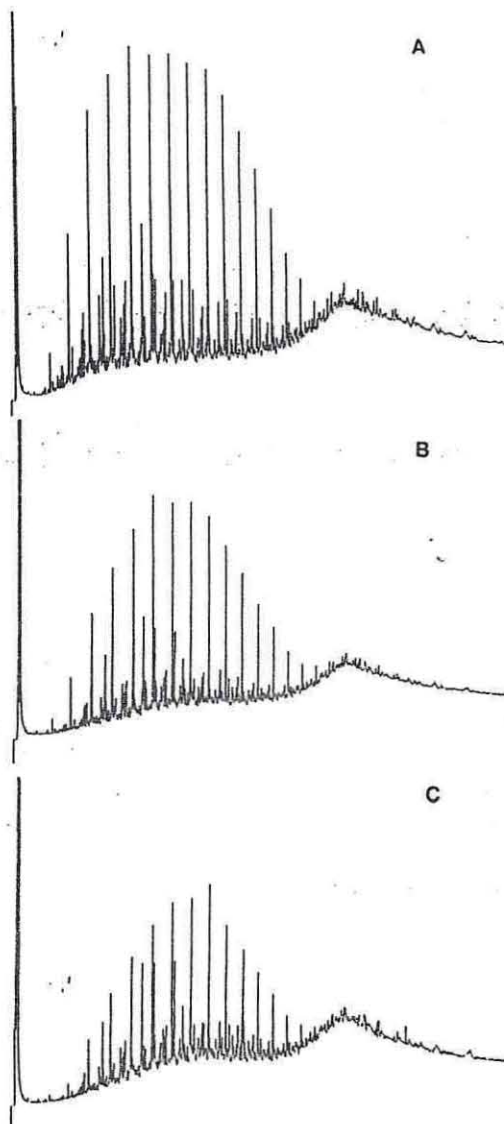
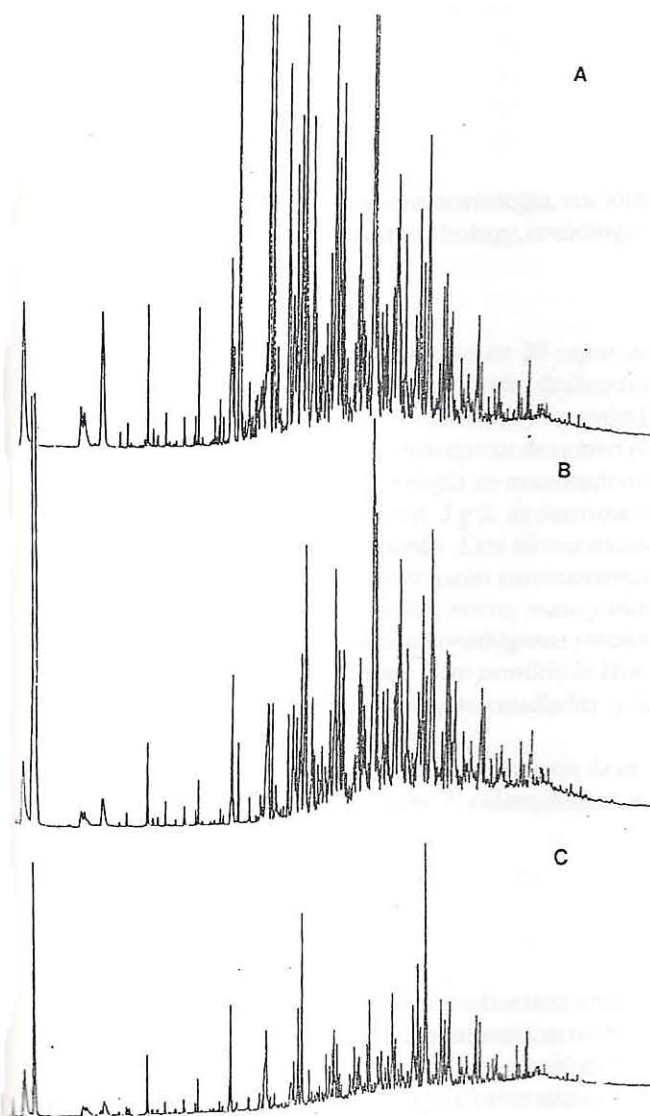


Grafico N° 3

Cromatogramas de la fracción de hidrocarburos aromáticos. A) Testigo. B) Estático. C) Shaker



REFERENCIAS

- Atlas, R.M. (1981). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiol. Rev.* 45 : 180-209.
- Bossert, I. & Bartha, R. (1984). In *Petroleum Microbiology*, Atlas R.M. Ed. Macmillan New York pp. 435-473.
- Brock, T.D. (1980). Biogeochemistry of ancient and modern Environments; Trudinger, P.A.; Walter, M.R. Eds.; Australian Academy of Science; Camberra 1980. pp. 83-103.
- Bumpus, Jhon, A. (1989). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *App. & Environ. Microbiol.* 55 (1) : 151-158.
- Gerasimova, N.M.; Zu-Lin, L. E. & Bekhtereva, M. N. (1975). Study of lipid composition of *Cunninghamella elegans* grown on alkanes. *Mikrobiologiya* 44 : 460-464.
- Hettige, G.H. & Sheridan, E. (1989). Interactions of Fungi Contaminating Diesel Fuel. *International Biodeterioration* 25 : 299-309.
- Hollandt, H.L.; Khan, S.H.; Richards, D. & Riemland, E. (1986). Biotransformation of polycyclic aromatic compounds by fungi. *Xenobiotica* 16 (8) : 733-741.
- Kirk, P. W. & Gordon A.S. (1988). Hydrocarbon degradation by Filamentous Marine Fungi. *Mycologia* 80 : 776-782.
- Madsen, E. L. (1991). Determining in situ biodegradation. *Environmental Science Technology* 25 (10) : 1662-1673.
- Morgan, P. & Watkinson, J. (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil. *Biotreatment Critical Reviews in Biotechnology* 8 (4) : 305.
- Raymond, R. L. & Jamison, V. W. & Hudson, J. O. (1978). Field Application of subsurface biodegradation of gasoline in a sand formation. API Publication # 4430, American Petroleum Institute: Washington DC.
- Rubidge, T. (1974). A new selective medium for the screening of aircraft fuels for Biodeteriogenic fungi. *Int. Biodeterior. Bull.* 10 : 53-55.
- Thomas, J. M. & Ward, C. H. (1989). In situ bioremediation of organic contaminants in the surface. *Environ. Sci. Technol.* 23 (7) : 760-765.
- Vecchioli, G.; Succar, D.; Mold, M.T.; Carri, M.; Del Panno, M. T. & Panceira, M. T. (1988). Degradation of hydrocarbon contained in bottom sludge and flocculated material floating in API basins. *Ind. Quim.* 289 : 291-323.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Lic. L. Cazau la lectura crítica del manuscrito y a la empresa IPAKO e YPF por las muestras y el acceso al instrumental.