

EFFECTO DE LA CONTAMINACION CON HIDROCARBUROS SOBRE GEOHONGOS SAPROTROFOS

Marta, N. Cabello* & Angélica, M. Arambarri**

* Miembro de la Carrera del Investigador C.I.C

** Miembro de la Carrera del Investigador C.O.N.I.C.E.T.

Trabajo realizado en el Instituto "Spegazzini" 53 N° 477. 1900

La Plata, Argentina.

Palabras clave : Contaminación, hidrocarburos, geohongos.

Key words: Pollution, hydrocarbons, geofungi.

RESUMEN

Se investigó la variación de la micota saprotrofa de suelos contaminados con hidrocarburos y testigos. El número de propágulos fúngicos en los suelos contaminados fue mucho menor que en el testigo. *Aspergillus foetidus* y *A. niger* fueron muy afectados por la contaminación. *Cylindrocarpon didymum*, *Fusarium solani* y *Penicillium restrictum* mantuvieron sus frecuencias en la parcela contaminada en relación a la testigo. *Penicillium thomii* (en profundidad), *Talaromyces helicus* y *T. rotundus* tuvieron frecuencias más altas en la parcela contaminada que en la testigo.

Rhizoctonia sp. (en superficie) y *Trichoderma harzianum* aumentaron sus frecuencias en la parcela contaminada al final del ensayo.

Las relaciones de los isoprenoides con sus respectivos normales (pristano nC_{17} , y fitano nC_{18}) demostraron que la degradación del hidrocarburo en el suelo fue escasa.

INTRODUCCION

Los procesos de descomposición de compuestos hidrocarbonados in situ por microorganismos, están captando interés científico a causa del importante rol que desempeñan en reducir los problemas de contaminación ambiental originados por estos productos.

En la actualidad más de la mitad de los residuos del petróleo están siendo tratados mediante técnicas que implican biodescomposición y que se conocen en general como técnicas de "landfarming" (Raymond et al. 1978; Meyer & Huddleston, 1980), sin embargo es poca la información disponible sobre este proceso en los hidrocarburos, mediante la acción fúngica. Esta situación in situ refleja un delicado e intrincado balance de

SUMMARY

[Effect of hydrocarbon pollution on saprotrophic soil fungi]

Variation of the fungal population growing in hydrocarbon polluted soil was studied. Fungal species were isolated by using the soil-washing method from soil samples. Biodegradation in situ was evaluated in a year period.

It was observed that hydrocarbons polluted soil had reduced numbers of fungal propagules when compared to non-polluted site. This study has revealed that *Aspergillus foetidus* and *A. niger* were affected by the pollution. *Cylindrocarpon didymum*, *Fusarium solani* and *Penicillium restrictum* have similar frequency in hydrocarbon polluted and in non-polluted soils. *Penicillium thomii* (in deep samples), *Talaromyces helicus* and *T. rotundus* were more frequent in the polluted site. *Rhizoctonia sp.* (in superficial samples) and *Trichoderma harzianum* increased their frequency at the end of the assay.

Hydrocarbon degradation in the soil was poor and has been demonstrated by the relation between the isoprenoids to their corresponding normals.

relaciones nutricionales, físicas y biológicas que pueden cambiar rápidamente en respuesta a factores ambientales tales como, oxígeno, agua, pH y nutrientes. Por este motivo en una muestra de suelo, no puede asumirse que el status fisiológico de los microorganismos acompañantes permanezca inalterado (Madsen, 1991).

Existen en la actualidad numerosos trabajos, sobre ensayos de descomposición de hidrocarburos, mediante el empleo de geohongos en pruebas de laboratorio (Walker & Colwell, 1974 a y b; Walter et al., 1975; Davis & Westlake, 1979; Dalyan et al., 1990 a y b; Würdermann et al., 1990; Cazau et al., 1992).

Se desconoce aún el papel que desempeñan los hongos sobre los hidrocarburos en el suelo. Los organismos miceliares pueden penetrar sustancias insolubles,

tales como petróleo y así incrementar el área superficial disponible para el ataque de otros microorganismos, como bacterias. También pueden crecer bajo condiciones ambientales de stress tales como bajos pH y concentraciones de nutrientes, donde el crecimiento bacteriano está limitado. Se ha comprobado que la descomposición bacteriana del petróleo es mayor cuando estos microorganismos actúan sinérgicamente con hongos y levaduras (Walker & Colwell, 1974 a; Walker et al., 1974 b).

Los objetivos planteados en este trabajo son: estudiar las variaciones de la micota saprotrofa que crece en suelos contaminados con hidrocarburos, las especies tolerantes a la contaminación y estimar la descomposición del hidrocarburo empleado.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó en parcelas ubicadas en la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la U.N.L.P.

Para los experimentos de campo, las parcelas fueron aradas y rastilladas. El hidrocarburo (barro de fondo de pileta API, IPAKO, S.A.) fue agregado a razón de 10-15 l/m², posteriormente el horizonte superior del suelo fue nuevamente labrado para permitir la incorporación del hidrocarburo en los primeros 8 cm de éste.

Se seleccionaron parcelas cercanas, para ser usadas como testigos.

Las parcelas tratadas y los testigos fueron muestreadas mensualmente entre los 0-2 cm y 40-50 cm de profundidad, tomándose 4 submuestras de cada profundidad. El material se guardó en bolsas de polietileno estériles y se procesaron inmediatamente mediante la técnica de lavado de suelos (Parkinson & Williams, 1961). Cada submuestra fue lavada, sembrándose 50 partículas (granos de suelo retenidos en un tamiz de 0,5 mm de malla) de cada una (un total de 200 partículas de las 4 submuestras).

Las partículas de suelo lavadas fueron sembradas en agar malta glucosado (Hawthorn et al., 1983), con el agregado de solución de antibióticos (sulfato de estreptomina al 0,5% y cloranfenicol al 0,25%). Las placas fueron incubadas 7-14 días a 25° C. Se determinó la frecuencia relativa (Godeas 1983) y el porcentaje de partículas colonizadas por especies fúngicas. Las que crecieron en las partículas de suelos tratados con hidrocarburos se aislaron en diferentes medios naturales para probar posteriormente sus capacidades descomponedoras.

La fracción de hidrocarburos saturados incorporados al suelo fue analizada por cromatografía de gases, para lo cual se usó un cromatógrafo HP 5890 con integrador

graficador, columna capilar de metil silicona de 25 m de longitud y detector de ionización de llama (FID).

Para comprobar la acción microbiana sobre los residuos de hidrocarburos se usaron las relaciones de los isoprenoides con sus respectivos normales. Estas obedecen a la resistencia que presentan los hidrocarburos saturados ramificados a la descomposición con respecto a los saturados normales. La acción microbiana se produce preferencialmente sobre los normales produciendo en consecuencia un aumento en las relaciones pristano/nC₁₇ y fitano/nC₁₈ (Bailey et al., 1973).

RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 1 muestra el número de partículas colonizadas en el tratamiento testigo y en la parcela tratada en las 2 profundidades de muestreo.

En la parcela testigo, en las muestras de superficie, el número de partículas colonizadas se mantuvo casi constante con un máximo de 100. En el testigo a 40-50 cm de profundidad el número de partículas colonizadas fue bajo (36 partículas en promedio (P.P)), pero se mantuvo estable en el año.

En el suelo contaminado con hidrocarburos, en las muestras tomadas en superficie, el número de partículas colonizadas fue bajo y constante durante el año, con un incremento en invierno (43 P.P). A 50 cm de profundidad, su número fue aún más bajo, también con un incremento en invierno (27 P.P).

Las figuras 2 y 3, muestran la frecuencia relativa de las especies fúngicas. Sólo se graficaron las principales en los suelos tratados y en la parcela control. Las barras de cada taxa, corresponden al promedio de la frecuencia de la especie considerada presente en los 3 meses muestreados en cada estación del año.

Cuando comparamos los gráficos de frecuencia relativas de las especies en los suelos tratados y testigo, observamos una drástica disminución de algunas de las especies consideradas en el suelo sujeto a contaminación. En este suelo apreciamos que algunas especies mantuvieron su frecuencia: *Cylindrocarpus didymus*, *Fusarium solani* y *Penicillium restrictum*. Otras especies tuvieron frecuencias relativas más altas en el suelo contaminado, tales como, *Penicillium thomii*, *Talaromyces helicus* y *T. rotundus*, las cuales estuvieron presentes con mayor frecuencia en el suelo tratado que el testigo. Estas últimas especies podrían considerarse como descomponedoras que han aprovechado la eliminación de la competencia de otros hongos o de especies tolerantes a la contaminación al igual que las anteriormente mencionadas.

Rhizoctonia sp. y *T. harzianum*, aumentaron su

presencia al final del ensayo (primavera), pudiendo considerarlas como especies que resisten o se adaptan a la contaminación.

Aspergillus foetidus, fue afectado por el agregado de hidrocarburos, especialmente a los 40 -50 cm de profundidad. En superficie es probable que las bajas temperaturas constituyan un factor tan limitante como el hidrocarburo. *A. niger* fue muy afectado, tanto en muestras de superficie como profundas.

Fusarium oxysporum presentó el mismo comportamiento en el testigo, tanto en superficie como en profundidad. Sin embargo en los suelos contaminados sus frecuencias fueron discordantes.

En este ensayo preliminar, en el cual nuestro objetivo planteado fue evaluar la micota tolerante a la contaminación con hidrocarburos. Los resultados nos muestran que la evolución desde Noviembre de 1991, en que se adicionó el barro con hidrocarburo, hasta Noviembre de 1992, en que se realizó el último muestreo, la micota no cambió. No se presentaron especies que aumentarían su frecuencia relativa a medida que transcurría el tiempo, con excepción de *Rhizoctonia sp.* y *T. harzianum*. Jones (1977), observó que los suelos contaminados con kerosene, tienen un reducido número de microorganismos, cuando se los compara con suelos no contaminados. El nivel de actividad en los microorganismos restantes no es afectado aparentemente por la contaminación.

Las relaciones entre isoprenoides (nC_{17}/nC_{18}) y sus respectivos normales se expresan en la Tabla 1.

Tabla 1

Relación en isoprenoides y sus respectivos normales

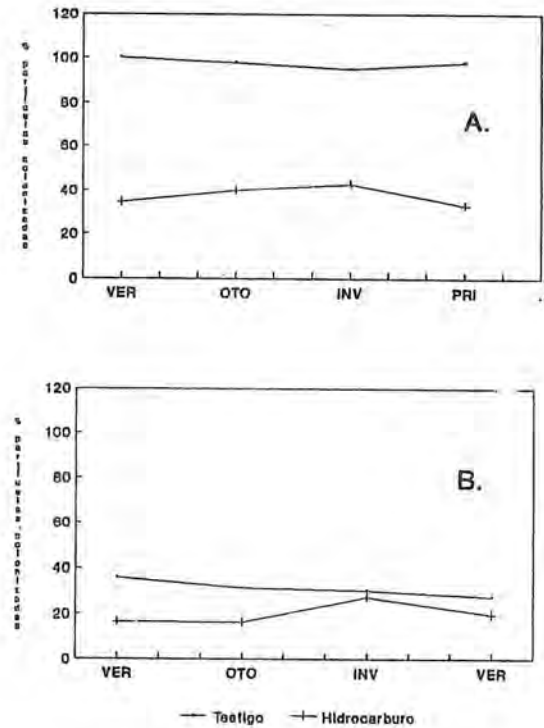
MUESTRA	Hidrocarburo (%)	Pristano/ nC_{17}	Fitano/ nC_{18}
Barro (antes de colocarlo en las parcelas).	100	0,7487	0,7894
En las parcelas			
Marzo-1992	1,5	1,048	1,640
Agosto-1992	1	1,168	0,877
Noviembre-1992	1	1,141	0,924
Suelo testigo	0,1	-	-

La relación de pristano/ cN_{17} y fitano/ cN_{18} muestran cierto grado de descomposición, aunque de poca magnitud. Esta puede atribuirse en parte a los hongos y en parte a otros microorganismos tales como bacterias.

dato que ambos grupos poseen patrones similares sobre los hidrocarburos (Walker et al., 1975).

Figura 1

Porcentaje de partículas colonizadas por geohongos saprotrofos en suelo testigo y contaminado con hidrocarburos: A. Muestras de superficie (0-2cm) y B. de profundidad (40-50 cm). Valores promedio de 3 muestreos, correspondientes a los 3 meses de cada una de las estaciones del año.



La descomposición de contaminantes orgánicos in situ, es muy difícil de probar, debido a que no se pueden controlar las condiciones de campo y su heterogeneidad espacial puede impedir la identificación de la microbiota participante en el proceso (Madsen, 1991). No obstante Okpokwasili & Amanchukwu (1988), sugieren después de un ensayo en el laboratorio, con especies de *Candida*, que cuando estas crecen en alto número, serían útiles para "limpiar" áreas contaminadas con petróleo. Sin embargo se ha demostrado que la determinación de la actividad microbiana, en muestras de ambientes contaminados transportadas e incubadas en el laboratorio, es diferente cuali y cuantitativamente de la misma determinación in situ. A pesar de décadas de debate, los problemas de la extrapolación de los datos obtenidos en el laboratorio/campo, nunca han sido resueltos (Madsen, 1991). En nuestro ensayo, la micota sufrió en general, una dismi-

Figura 2
Frecuencias relativas de las especies fúngicas presentes en el suelo testigo y contaminado con hidrocarburos en muestras superficiales en las diferentes estaciones del año.

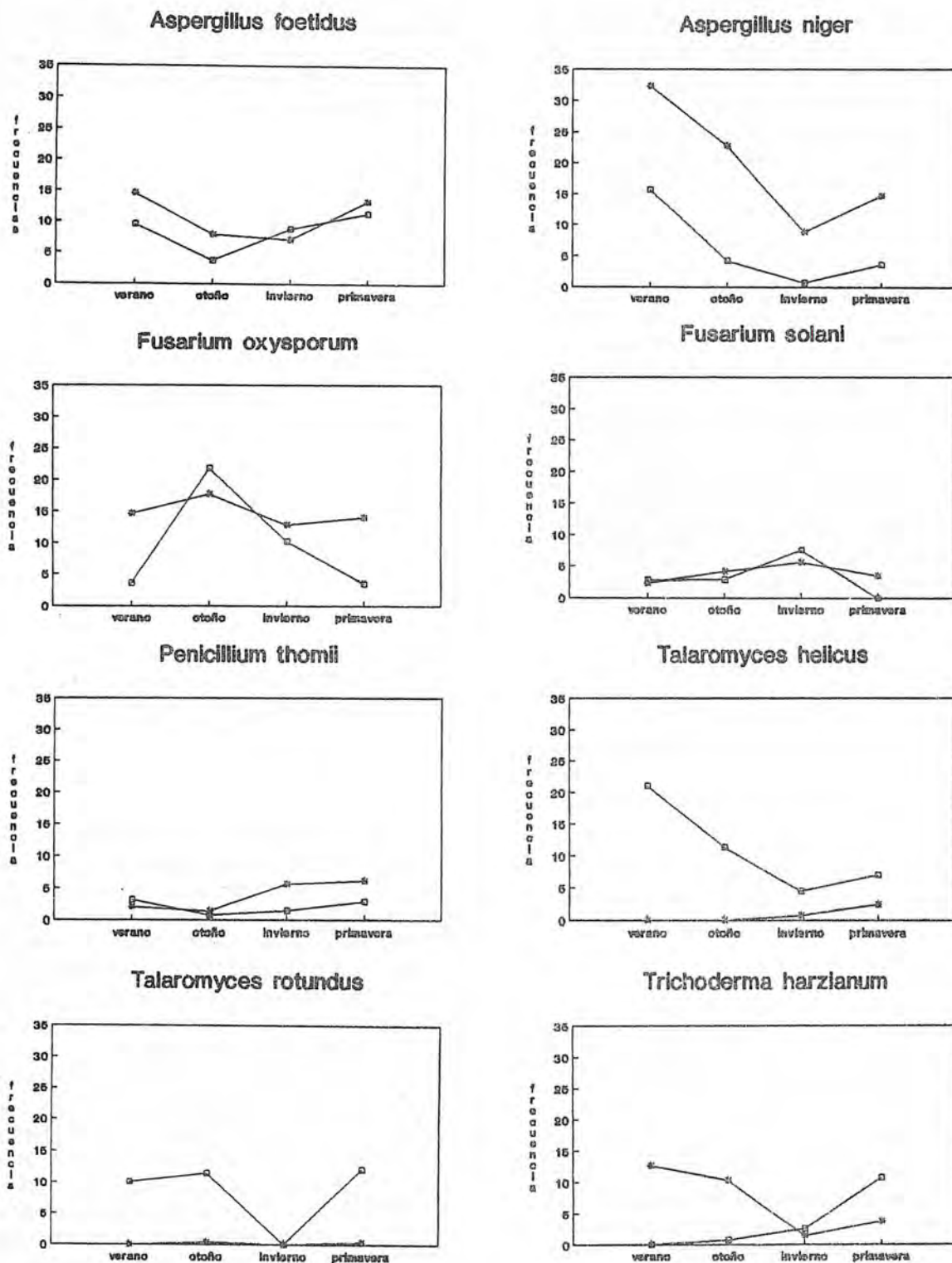
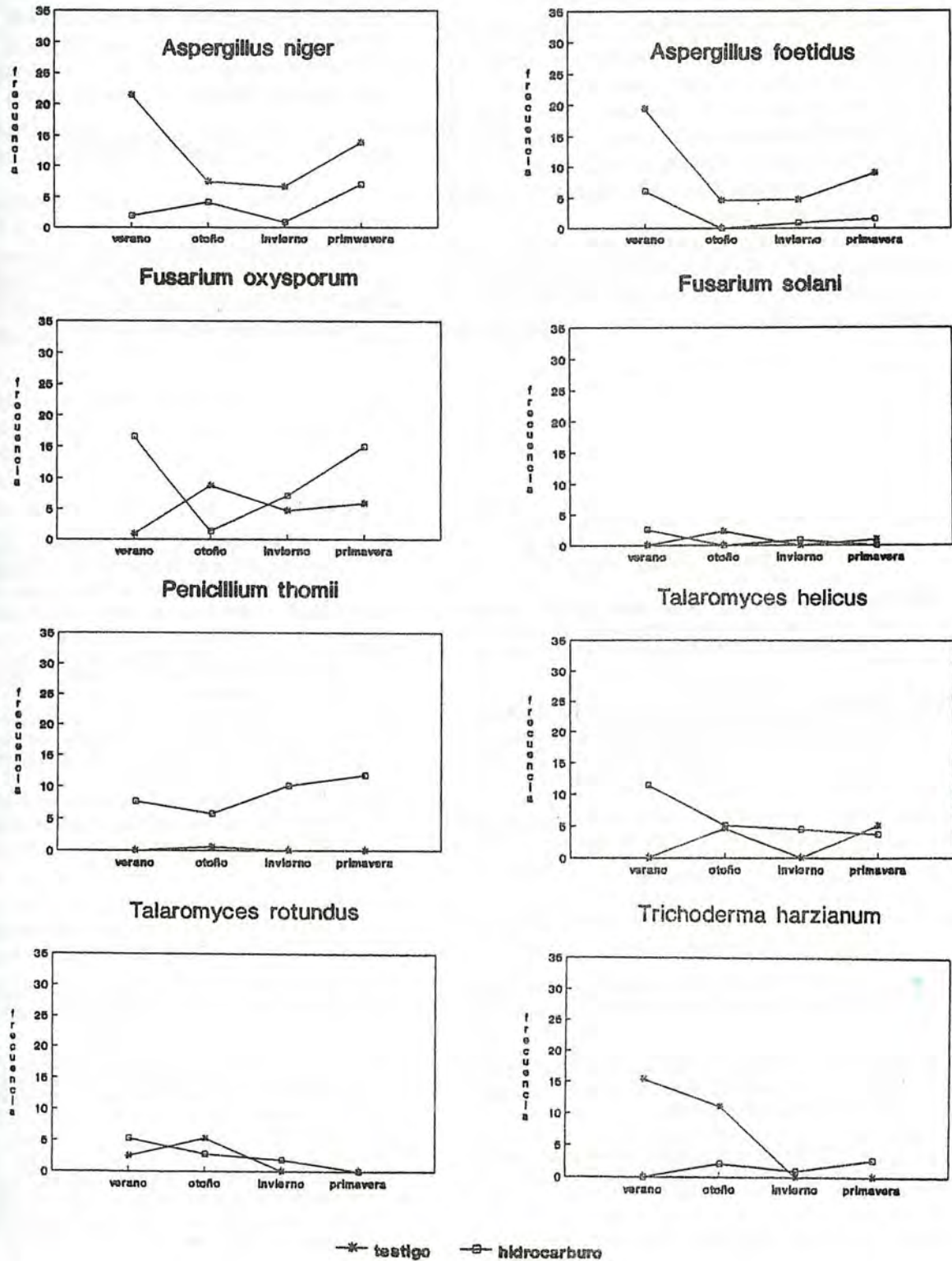


Figura 3

Frecuencias relativas de las especies fúngicas presentes en el suelo testigo y contaminado con hidrocarburos en muestras de profundidad en las diferentes estaciones del año.



nación importante en relación a sus frecuencias de aparición.

CONCLUSION

Podemos concluir que *Cylindrocarpon didymum*, *Fusarium solani* y *Penicillium restrictum*, toleran la contaminación. *Penicillium thomii*, *Talaromyces helicus* y *T. rotundus*, crecen mejor en suelos contaminados que en los testigos. *Rhizoctonia* sp (en superficie) y *T. harzianum*, son especies que pueden adaptarse, mientras que *Aspergillus foetidus* y *A. niger* son afectados por la contaminación.

En este estudio, la contaminación con hidrocarburos, disminuye la frecuencia de las especies fúngicas más comunes en el suelo, sin hacerlas desaparecer totalmente del perfil edáfico. Por otra parte, estas especies

en alguna medida podrían ser capaces de descomponer el hidrocarburo empleado, aunque son necesarios mayores estudios para verificar: los tipos de compuestos capaces de descomponer, establecer al mismo tiempo el sinergismo con las bacterias, la existencia de sucesión en la aparición de las especies a medida que el compuesto es metabolizado in situ y el período de tiempo (¿años?) necesario para "limpiar" el ambiente contaminado.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al personal de la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales U.N.L.P. por su asistencia en la preparación de las parcelas; al Lic. G. Maselli por el cálculo de los índices de degradación; a la firma IPAKO S.A. por facilitarnos el barro con hidrocarburos.

REFERENCIAS

- Bailey, N. J. L.; Jobson, A.M. & Rogers, M.A. (1973). Bacterial degradation of crude oil: Comparison of field and experimental data. *Chemical Geology* 11: 203-221.
- Cazau, C.; Maselli, G. & Arambarri, A.M. (1992). Utilización de diferentes especies de hongos como biodegradadores de hidrocarburos I. Ensayo preliminar. *Boletín Micológico* 7:79-83.
- Dalyan, U.; Harder, H. & Hopner, T. (1990a). Hydrocarbon biodegradation in sediments and soil. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part. II. pH values. *Erdöl & Kohle, Erdgas, Petrochemie* 43 : 337-342.
- (1990b). Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part. III. Temperature. *Erdöl & Kohle, Erdgas, Petrochemie* 43 : 435-437.
- Davies, J.S. & Westlake, D.W.S. (1979). Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* 25: 146-156.
- Godeas, A.M. (1983). Estudios cuali-cuantitativos de los hongos del suelo de *Nothofagus dombeyi*. *Ciencia del suelo* 1: 21-31.
- Hawthornth, D. L.; Sutton, B. C. & Ainsworth, G. C. (1983). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 7a. Edition. Comm. Mycol. Inst. Kew, Surrey.
- Jones, J.G. (1977). The long-term effects of kerosene pollution on the microflora of a moorland soil. *J. Appl. Bacteriol* 43: 123-128.
- Madsen, E. L. (1991). Determining in situ biodegradation. *Facts and challenges. Environ. Sci. Technol.* 25 : 1663-1673.
- Meyers, J. D. & Huddleston, R. L. (1980). Landfarming: An option for solid waste disposal. RCRA Techniques for compliance conference sponsored by chemical engineering and mine regulation and productivity report, Houston.
- Okpokwasili, G.C. & Amanchukwu, S.C. (1988). Petroleum hydrocarbon degradation by *Candida* sp. *Environm. Intern.* 14: 243-247.
- Parkinson, D. & Williams, T.S. (1961). A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and soil* 13: 347-355.
- Raymond, R.L.; Jamison, V. W. & Hudson, J.O. (1978). Field application of sub-surface biodegradation of gasoline in a sand formation. API Publication N° 4430. American Petroleum Institute, Washington D.C.
- Walker, J.D.; Austin, H.F. & Colwell, R. R. (1975). Utilization of mixed hydrocarbon substrates by petroleum degrading microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21: 27-39.
- Walker, J.D. & Colwell, R.R. (1974a). Microbial degradation of model petroleum at low temperatures. *Microbiol. Ecol.* 1: 63-95.
- (1974b). Microbial petroleum biodegradation use of mixed hydrocarbon substrates. *Appl. Microbiol.* 27: 1053-1060.
- Würdemann, S.; Harder, H. & Hopner, T. (1990). Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part. I. Grain, size surface area and soil type. *Erdöl & Kohle, Erdgas, Petrochemie* 43 : 217-224.