

Documentos



Dibujo Patricia Sáez

Investigación

Biodegradación de la Fracción Pesada de Crudo Cusiana por *Pleurotus Ostreatus*

Recibido para evaluación: 26 de Septiembre de 2003

Aceptación: 11 de Junio de 2004

Recibido versión final: 26 de Mayo de 2004

Fernando Cardona U.¹
Dora Patricia Restrepo R.²
Jaime Alonso Bedoya P.³
Farley García O.⁴

RESUMEN

Se estudió la biodegradación de la fracción pesada de crudo Cusiana por *Pleurotus ostreatus*, haciendo especial énfasis en el estudio del cultivo sin el uso adicional de aceite vegetal, que había sido usado en otros estudios como estimulante en el proceso y se probó la biodegradación de crudo en suelo franco por este hongo.

El trabajo se desarrolló en tres fases: biodegradación de crudo en sustrato lignocelulósico sin adición de aceite vegetal, estudio de inhibición de crecimiento del hongo en presencia de su principal competidor *Trichoderma spp.* y en presencia de diferentes concentraciones de sustancias inhibitorias; por último, se hizo el estudio de la biodegradación de crudo en suelo franco.

De los resultados obtenidos se concluyó que:

- Es posible degradar crudo sin adición de aceite vegetal.
- El tiempo óptimo en la biodegradación en sustrato lignocelulósico es cercano a los 45 días para una concentración de crudo óptima de 10.52% en peso.
- El inhibidor que favorece el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en presencia de su competidor es el Mertect® en una concentración de 20 ppm.
- Es posible una biodegradación cercana al 70% de crudo en suelo franco en condiciones simuladas de campo.

PALABRAS CLAVE: *Pleurotus Ostreatus*, Sustrato Lignocelulósico, Petróleo, Biodegradación, Hongo de la Pudrición Blanca, Suelo, Contaminación.

ABSTRACT

The biodegradation of the heavy fraction of the raw petroleum from Cusiana by *Pleurotus ostreatus* fungi was studied, specially emphasizing on the study of the cultivation without additional vegetable oil in the substrate, which has been used in other cases like stimulant in the process, the concrete case of the biodegradation was also proved in soil.

The work was developed in three phases: biodegradation of raw petroleum on lignocelulosic substrate without adding vegetable oil; study of inhibition of growth of the fungi in presence of its main competitor *Trichoderma spp.* and at different concentrations of inhibition substances; and finally, biodegradation of raw petroleum in loam.

From the obtained results, it is concluded that:

- It is possible to degrade raw petroleum without adding vegetable oil.
- The required optimal time for the biodegradation in lignocelulosic substrate is near to 45 days for an optimal raw petroleum concentration of 10.52%.
- The inhibitor that favours the *Pleurotus* growth in presence of its main competitor is the Mertect®, in concentration of 20 mg/kg.
- It is possible a raw petroleum biodegradation near to 70% in loam, under simulated field conditions.

KEY WORDS: *Pleurotus ostreatus*, Substrate, Petroleum, Biodegradation, White-Rot Fungi, Soil, Contamination.

1. Msc. en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

2. Msc. en Recursos Hidráulicos.

3. Ing. Químico.

4. Ing. de Petróleos.

Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín.

lfcardon@unalmed.edu.co



1. INTRODUCCIÓN

La biorremediación en estado sólido de suelos contaminados con crudo cuando se ocasionan derrames, es un tema muy importante en un país como Colombia en el que frecuentemente son derramados muchos barriles por daños en los oleoductos, y que ocurre casi siempre en terrenos rurales en los que las necesidades de alimentos y ocupación laboral de la población son apremiantes siendo entonces pertinente el desarrollo de técnicas aplicables en la solución de este tipo de problemas. De acuerdo con cifras del Ministerio del Medio Ambiente, más de dos millones de barriles de petróleo se han derramado sobre 2.600 kilómetros de ríos -lo que equivale a sumar los cauces del Cauca y el Magdalena-. También han sido afectadas más de 6.000 hectáreas de terrenos aptos para el cultivo y 1.600 hectáreas de ciénagas y humedales. En este trabajo se estudió la biodegradación de la fracción pesada de crudo Cusiana por el hongo *Pleurotus ostreatus*, como una propuesta de remediación en derrames de crudo. En este trabajo se estudió la biodegradación de la fracción pesada de crudo Cusiana por el hongo *Pleurotus ostreatus*, como una propuesta de remediación en derrames de crudo. Se utilizó *Pleurotus ostreatus* pues este hongo es capaz de metabolizar compuestos muy tóxicos en otros más simples y atacar un amplio rango de compuestos orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) mediante dos enzimas extracelulares: lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (MnP, E.C. 1.11.1.13) y otra enzima extracelular: lacasa (Lac, EC 1.10.3.2) (Steffen Kari, 2004; Thurston 1994; Reddy, 1995). Sack y Gunther (citados por Bezalel y col. 1996), mostraron que *Pleurotus ostreatus* es bastante eficiente en la degradación de fenantreno y fluoreno y es menos eficiente con el fluoranteno. Vyas y col. (también citados por Bezalel 1996), mostraron la habilidad del hongo para degradar antraceno. Según Bossert y Bartha (citados por Trombly 1995), *Pleurotus ostreatus* tiene la capacidad de mineralizar a CO₂, 3% de fenantreno, 0.4% de pireno y 0.19% de benzopireno en 11 días de incubación. También mineraliza 0.6% antraceno pero requiere de 35 días y 0.19% de fluoreno en 15 días. Según Trombly (1995) la biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos de 2 y 3 anillos ha sido demostrada extensivamente, mientras que la de hidrocarburos policíclicos aromáticos de 4, 5 y 6 anillos es menos significativa. Vargas y col. (2001) utilizaron *Pleurotus ostreatus* para biodegradar un suelo contaminado con antraceno y demostraron que el antraceno fue removido en un 90% en un tiempo de 15 días.

Cardona, Restrepo y col. (2002) estudiaron la biodegradación *in vitro* de hidrocarburos en sustrato lignocelulósico por *Pleurotus ostreatus* concluyendo que es un hongo degradador de fracción pesada de crudo Cusiana y que es más eficiente cuando esta en sustrato contaminado al 10% P/P de fracción pesada de crudo y que el proceso es más efectivo durante los primeros 45 días que en los días posteriores.

Este trabajo retoma la recomendación de Cardona y col. concluyendo que es posible el proceso de biodegradación sin el uso adicional de aceite vegetal y que *Pleurotus ostreatus* degrada la fracción pesada de crudo Cusiana siendo más eficiente cuando el sustrato lignocelulósico esta contaminado al 10.52 % P/P. Adicionalmente, en este trabajo se incluyó un estudio preliminar de la degradación bajo condiciones controladas de campo lo que plantea un nuevo problema pues *Pleurotus ostreatus* tiene varios competidores que pueden interferir en el crecimiento del hongo, principalmente *Trichoderma* spp. Para solucionar este problema se realizó un estudio de inhibidores de mohos y se seleccionó el Mertect en una concentración de 20 partes por millón pues fue el inhibidor que siendo buen fungicida, permitió el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* de forma aceptable en suelo franco.

2. BIODEGRADACIÓN *IN VITRO* DE CRUDO EN SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO SIN ADICIÓN DE ACEITE VEGETAL

El ensayo de biodegradación se llevó a cabo impactando el sustrato lignocelulósico con cinco porcentajes por peso de la fracción pesada de crudo Cusiana (2.64%, 6.33%, 8.7%, 10.52% 17.59% P/P). Estas concentraciones fueron elegidas porque permitían ampliar y comparar las concentraciones trabajadas por Niño y Gonzáles (2002). De cada una de estas concentraciones se prepararon 28 cajas petri para un total de 168 cajas petri.

Para el proceso de cuantificación de hidrocarburos totales degradados, se implemento el método para la determinación de grasas, aceites e hidrocarburos del petróleo en sólidos por el método del Soxhlet que utiliza tetracloruro de carbono como solvente.

El sustrato utilizado estaba constituido por 334.82 g de cascarilla de algodón, 317.46 g. de cascarilla de arroz, 326.08 g de heno; a la cascarilla de arroz se la adicionan 90 gramos de cal para una concentración del 10% de cal en el sustrato, 45 grs. de yeso para una concentración del 5% y 50 mg de tiamina por kilogramo de sustrato. Posteriormente cada uno de los tres componentes principales (heno, cascarillas de arroz y algodón) se impactan con las concentraciones de fracción pesada de crudo Cusiana definidas anteriormente y luego se mezcla todo. El sustrato preparado se llevó a cajas petri de vidrio en porciones de 10 g, se esterilizó en autoclave a 120 °C y 20 psi por un periodo de 20 minutos. Las cajas petri se inocularon con un gramo de semilla, es decir al 10% peso de semilla/peso del sustrato en condiciones estériles.

En el trabajo de investigación anterior, realizado por Niño y González (2002), se supuso que el hongo degradaba primero el aceite vegetal directamente adicionado al sustrato y los aceites biogénicos provenientes del mismo sustrato, para posteriormente degradar los aceites petrogénicos correspondientes a la fracción pesada de crudo Cusiana. Para determinar si esta suposición era cierta no se adicionó directamente aceite vegetal y se procedió a realizar un seguimiento de la degradación de los aceites biogénicos provenientes del sustrato. En la Figura 1 se observa el aceite biogénico degradado en un sustrato lignocelulósico no impactado con crudo a lo largo de 60 días. El valor de referencia se obtuvo lavando el sustrato solo, es decir sin hongo.

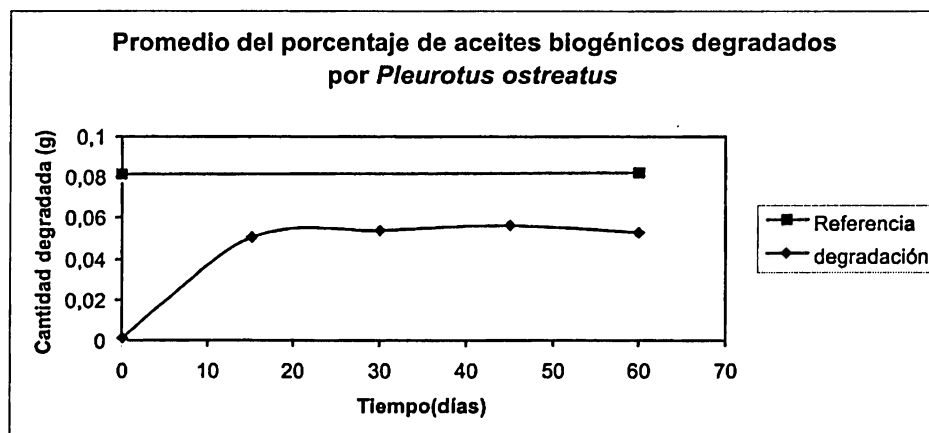


Figura 1.
Aceite biogénico degradado en un sustrato lignocelulósico no impactado con crudo.

Se observa que el basidiomiceto degrada alrededor del 68.2 % del total de aceites biogénicos provenientes de los componentes del sustrato. Este máximo en biodegradación es alcanzado aproximadamente en el día 20, tiempo después del cual parece que el hongo *Pleurotus ostreatus* no continuara degradando el aceite vegetal para obtenerlo como fuente de carbono. Sin embargo puede ser posible que después del día 20 el hongo aun se encuentre biodegradando los aceites vegetales y que los aceites recuperados en el lavado de las muestras sean consecuencia de la extracción de estos lípidos de la membrana del mismo hongo y por tanto no se pueda determinar de manera exacta si la acción biodegradadora ha llegado a su fin.

Para evaluar el proceso de degradación *in vitro* de crudo en sustrato lignocelulósico sin adición de aceite vegetal se involucran tres variables: el tiempo y la concentración de hidrocarburo, son de tipo independientes, la cantidad de hidrocarburo degradado en gramos dentro del sustrato lignocelulósico es la variable dependiente o variable respuesta. En los procesos de análisis gráficos de hidrocarburos totales degradados, se define el nivel de referencia como aquella cantidad máxima en gramos de aceites biogénicos y fracción pesada de hidrocarburo que para esa determinada concentración podrá biodegradar el hongo.

La Figura 2 de hidrocarburo degradado en gramos contra concentración de crudo resume el comportamiento promedio de la variable respuesta durante los 60 días del ensayo. En ella se observa que inicialmente el basidiomiceto tiene un comportamiento biodegradador directamente proporcional a la concentración de fracción pesada, alcanzando el máximo a la concentración de 10.2% y luego esta curva experimenta una drástica caída respecto a la concentración máxima. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Niño y Gonzáles (2002) quienes concluyen: « en promedio para la concentración del 10.2% se dio una mayor degradación durante los 90 días,

para concentraciones superiores al 15%, el hongo experimenta un crecimiento lento y no óptimo para procesos de biodegradación de hidrocarburo”.

La Figura 3 de hidrocarburo degradado en gramos contra tiempo muestra el comportamiento promedio de la variable respuesta en cada monitoreo para las cinco concentraciones. En ella se puede ver que entre los días 15 y 30 se da el mayor incremento en el proceso de biodegradación, entre los días 30 y 45 el proceso permanece aproximadamente invariable y luego disminuye. Es importante recordar que la caída al final del proceso puede ser debida a la producción de lípidos por parte de la membrana celular del hongo que produce una disminución de la degradación de hidrocarburos. Independientemente del porcentaje de crudo impactado al sustrato, se observa que la mayor actividad biodegradadora del basidiomiceto se da alrededor de los días 30 y 45, resultado semejante al obtenido por Niño y Gonzáles (2002) quienes concluyen: «es más efectivo el proceso de degradación de *Pleurotus ostreatus* en sustrato lignocelulósico durante los primeros 45 días que en los días posteriores”.

Figura 2.
Hidrocarburo degradado Vs.
Concentración de crudo en
condiciones de laboratorio.

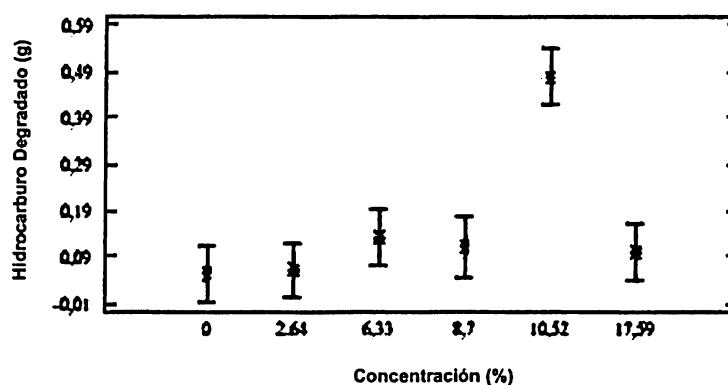
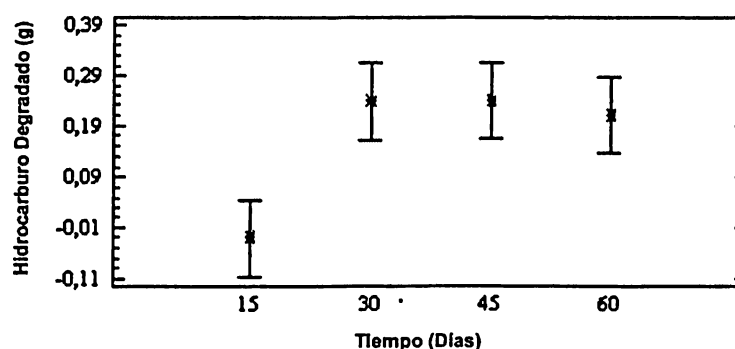


Figura 3.
Hidrocarburo degradado Vs.
Tiempo de crecimiento en
laboratorio.



3. ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL HONGO EN PRESENCIA DE SU PRINCIPAL COMPETIDOR *TRICHODERMA* spp.

En este trabajo se desarrolla una primera prueba de inhibición de crecimiento del hongo, con el objetivo de probar intervalos de concentración de diferentes productos inhibidores de fácil y común aplicación en la desinfección y por ende de potencial uso en la prueba de biodegradación en suelo franco. Las concentraciones y los productos escogidos para esta prueba se muestran en la tabla 1. Los cuatro productos comerciales con acción fungicida fueron mezclados con PDA (papa, glucosa, agar) y llevados a cajas petri en varias concentraciones antes de ser inoculados con *Pleurotus ostreatus*. Los resultados obtenidos en esta primera prueba permitieron seleccionar el intervalo de concentraciones para desarrollar la segunda prueba de inhibición (ver tabla 2) en la que se comparan

la inhibición del crecimiento del *Pleurotus ostreatus* con la inhibición del hongo *Trichoderma ssp* por separado. Se comparó con el *Trichoderma ssp*, pues las investigaciones de Niño y Gonzáles (2002) señalan a este hongo como el principal y más poderoso competidor de *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones de umbráculo.

Inhibidores	Concentraciones				
Octave(ppm)	0	50	100	150	200
Agrodyne(%v/v)	X	0,5	1	2	3
Dioxogen(%v/v)	X	0,5	1	2	3
Tego(%v/v)	X	0,3	0,5	1	2

*cada muestra se repitió tres veces.

Inhibidores	Concentraciones			
Octave(ppm)	0	20	30	50
Agrodyne(%v/v)	X	0,5	0,75	1
Dioxogen(%v/v)	X	0,5	1	2
Tego(%v/v)	X	0,4	0,3	0,2
Mertect(ppm)	X	20	40	60

*cada muestra se repitió tres veces para ambos hongos

Tabla 1.
Diseño de la primera prueba de inhibición para *Pleurotus ostreatus**

Tabla 2.
Diseño de la segunda prueba de inhibición* para *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma* por separado.

Para el tratamiento estadístico de los datos de inhibición de crecimiento, se usa el Índice COMCRE que fue creado para este trabajo y que permite comparar el efecto inhibitor de los diferentes productos usados sobre los 2 hongos estudiados midiendo el diámetro de las colonias en centímetros y promediando dos lecturas en cruz. El índice se genera dividiendo el valor de longitud promedio de crecimiento del organismo de interés, entre el valor de longitud promedio de crecimiento del organismo testigo; así un Índice COMCRE menor que uno (1) indica que el crecimiento del organismo de interés está desfavorecido, un índice igual a uno (1) indica que los organismos crecen a igual velocidad para el periodo establecido y un índice mayor que uno (1), indica que el crecimiento del organismo de interés es favorable.

La Figura 4 muestra que el mejor inhibidor es el Mertect, sobrepasando a los demás en condiciones ventajosas, se observa además que el tratamiento blanco (es decir sin usar ningún inhibidor), es mejor incluso que el Dixogen y el Agrodyne.

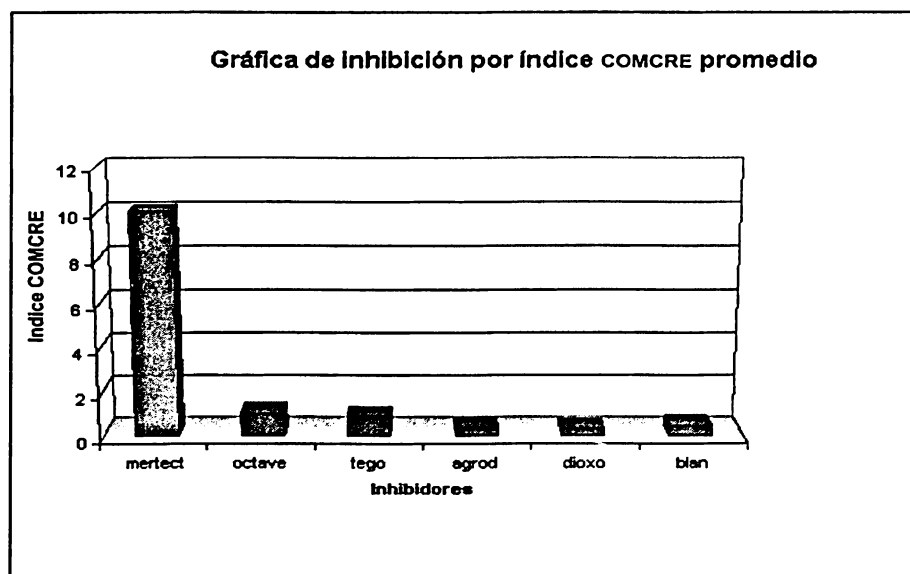


Figura 4.
Inhibición por índice COMCRE promedio.

La Figura 5 muestra el comportamiento del inhibidor Mertec para *Pleurotus* y *Trichoderma* (las concentraciones de inhibidor, aparecen de izquierda a derecha y de arriba a abajo respectivamente en cada fotografía). Como se observa la concentración de 20 ppm inhibe el crecimiento del *Trichoderma ssp* sin inhibir el crecimiento del *Pleurotus ostreatus*.

Segunda prueba *Pleurotus* – Mertect. (60, 40, 0 y 20 ppm). Segunda prueba *Trichoderma* – Mertect. (40, 60, 20 y 0).

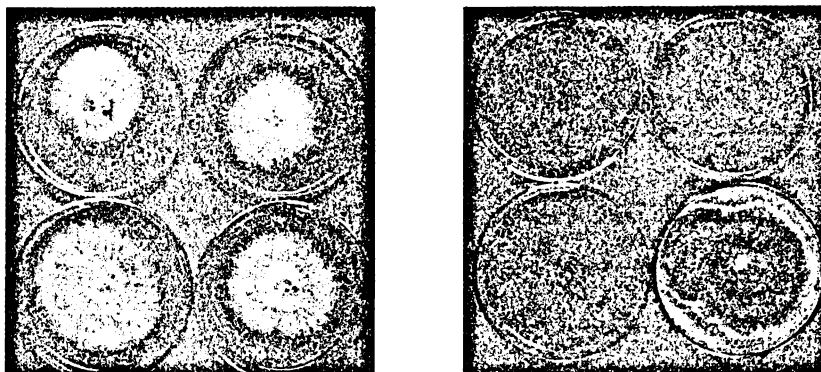


Figura 5.
Fotos de la segunda prueba de
inhibición de crecimiento con
MERTEC.

Los resultados de esta segunda prueba de inhibición permitieron definir la concentración y el inhibidor apropiado para el estudio de la biodegradación de crudo en suelo franco mezclado con sustrato lignocelulósico bajo condiciones controladas de campo.

4. ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN DE CRUDO EN SUELO FRANCO

Inicialmente se determinó la cantidad de aceites biogénicos y petrogénicos degradados por los microorganismos nativos del suelo franco utilizado. El suelo sin esterilizar se mezcló en proporción 50/50 con sustrato lignocelulósico y se impactó con una concentración del 10.52 %P/P de la fracción pesada del crudo Cusiana pero no se inoculó el hongo. En la Figura 6 se observa el proceso de degradación durante 60 días. Durante toda la fase experimental se registra un proceso enzimático atribuible a los microorganismos; en los primeros 20 días se nota un proceso de biodegradación importante donde aproximadamente el 11% del aceite es degradado, pasado este tiempo prosigue el proceso y para el día 60, el 17.7% del aceite ha sido degradado.

Sin determinar cuáles son los tipos de microorganismos nativos se encuentran en este suelo, se supone que para las pruebas posteriores realizadas en este mismo suelo franco sin esterilizar; el 17.7% del proceso de biodegradación es debido a estos microorganismos presentes en el suelo.

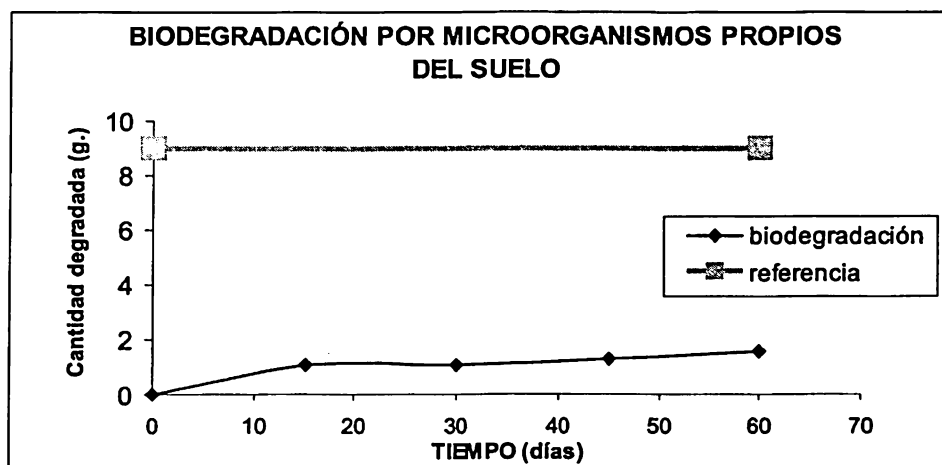


Figura 6.
Biodegradación debida a
microorganismos propios del
suelo franco utilizado.

Posteriormente se realizó una prueba controlada en la cual se esterilizó el suelo franco en autoclave, se mezcló en proporción 50/50 con el sustrato inhibido con Mertec (20 ppm) e inoculado con el hongo, y esta mezcla se impactó con una concentración del 10.52% P/P de fracción pesada de crudo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.

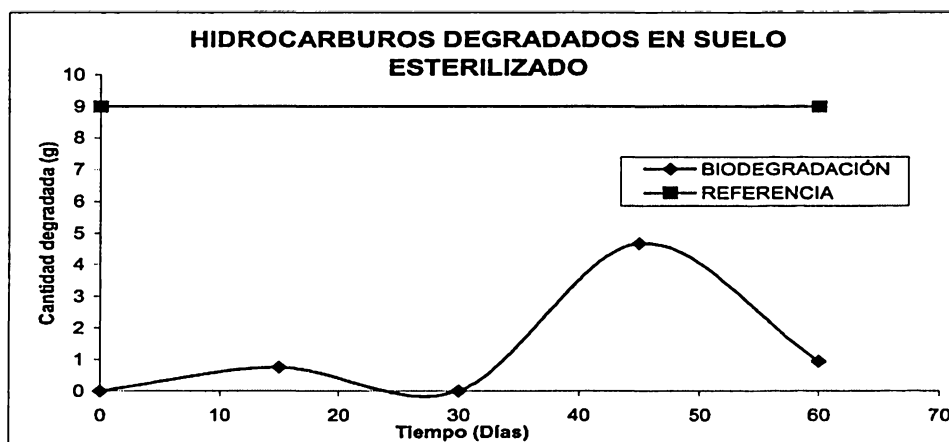


Figura 7.
Aceites degradados por el hongo *Pleurotus ostreatus* en un suelo franco esterilizado.

En los primeros días de iniciada la fase experimental, el basidiomiceto tiene un lento proceso de acoplamiento que se ve reflejado en los bajos valores de hidrocarburos degradados. Pasados los treinta días de iniciado el experimento, se nota un crecimiento acelerado del hongo y por tanto incrementa sus actividades enzimáticas llegando hasta un 50% del total de hidrocarburos totales degradados. Visualmente se encontró con un vigoroso crecimiento del hongo que puede explicar estos altos promedios en hidrocarburos degradados. Entre los días 45 y 60 hay una caída acelerada del proceso de biodegradación que puede ser atribuida al aporte de aceites por parte del cuerpo fructífero del hongo ya que como se ha mencionado anteriormente, la prueba adoptada para determinar la cantidad de hidrocarburos totales degradados no diferencia entre aceites petrogénicos y lípidos provenientes del cuerpo fructífero; y por tanto estos últimos han de reportarse al final de la prueba como aceites no degradados por el hongo.

Por último se realizó la prueba de campo controlada. El suelo no esterilizado se mezcló en proporción 50/50 con el sustrato inhibido con Mertec (20 ppm) e inoculado con el hongo y esta mezcla se impactó con una concentración del 10.52% P/P de fracción pesada de crudo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.

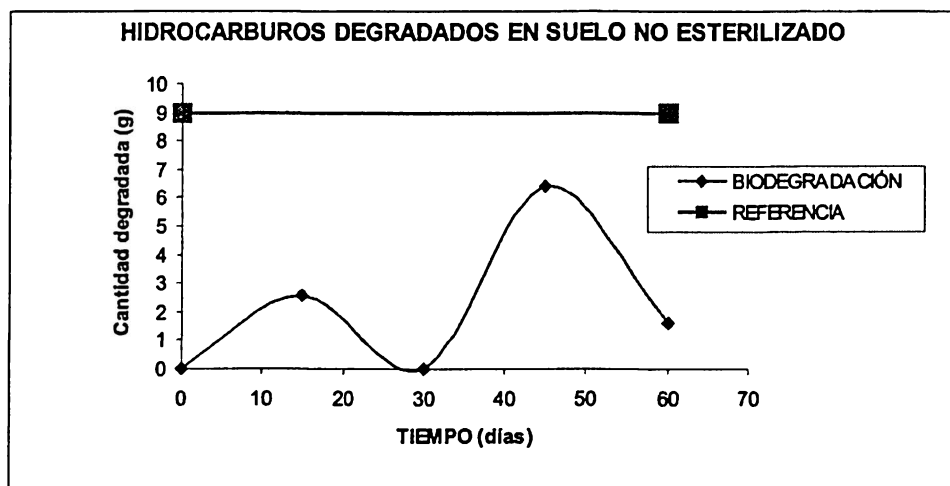


Figura 8.
Biodegradación debida al hongo y microorganismos propios del suelo franco utilizado.

En los primeros 15 días del proceso experimental se reportó un 28% de hidrocarburos degradados del total de fracción pesada en el suelo. Podemos suponer que de este porcentaje el 17% es debido a los microorganismos presentes en el suelo y el restante 11% al hongo también presente en el suelo.

Inicialmente el hongo *Pleurotus ostreatus* debe adaptarse al nuevo medio que habita, mientras que los microorganismos del suelo pueden fácilmente desarrollarse en el medio que parcialmente se ve afectado por la nueva presencia del crudo pesado.

Pasada la fase de acoplamiento tanto del hongo como de los microorganismos nativos, es de esperarse un pleno desarrollo del proceso de biodegradación en el suelo; caso contrario a lo sucedido donde se reporta una vertiginosa caída en el proceso de biodegradación. Podemos explicar esta notoria caída en la gráfica de hidrocarburos degradados como causa del pleno desarrollo que sufre el hongo en el suelo y su razonable aporte de lípidos por parte de su cuerpo fructífero en el lavado de la muestra.

Después de aproximadamente 50 días de iniciado el proceso, se reporta el máximo pico de degradación con un 70% en hidrocarburos totales degradados. Este alto porcentaje de degradación se puede deber no solo a la apreciable colonización del hongo en el sustrato, sino a la continua influencia de los microorganismos nativos en el proceso de biodegradación.

5. CONCLUSIONES

Pleurotus ostreatus no requiere de la adición de aceite vegetal al sustrato, para degradar la fracción pesada del petróleo crudo de Cusiana.

In vitro y en sustrato lignocelulósico, el hongo *Pleurotus ostreatus* se muestra más eficiente degradando hidrocarburos que se encuentren en una concentración del 10.52% con respecto al peso del sustrato utilizado.

20ppm del fungicida Mertect® inhiben el crecimiento de los competidores de *Pleurotus ostreatus* y permite el crecimiento de este en el proceso de biodegradación de la fracción pesada de crudo Cusiana.

Pleurotus ostreatus incubado en el sustrato lignocelulósico en combinación con suelo franco degradó petróleo en forma más eficiente cuando el suelo no se esterilizó.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bezalel et al. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Applied and environmental microbiology: American society for microbiology*. Vol. 62, No 7; 2554-2559.
- Bedoya J., García F. 2003. Biodegradación de la fracción pesada de crudo Cusiana por *Pleurotus Ostreatus* Tesis de grado Ingenieros químico y de petróleos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Minas.
- Cardona F, Restrepo D, Niño P y González R. 2002. Aumento de la productividad de *Pleurotus Ostreatus* y su utilización en la biodegradación de petróleo. *Gestión y ambiente*. Vol.5 N2:103-110.
- Niño P, González R. 2002. Biodegradación de petróleo por *Pleurotus Ostreatus*. Tesis de grado Ingeniero de petróleos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Minas.
- Reddy C.A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin Biotechnol* 6:320-328
- Steffen Kari T. 2004. Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. Division of Microbiology, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Viikki Biocenter, University of Helsinki, Finland, Academic Dissertation in Microbiology. [http://ethesis.helsinki.fi/iv/kaisut/maa/stemi/UK/steffef degradt.pdf](http://ethesis.helsinki.fi/iv/kaisut/maa/stemi/UK/steffef%20degradt.pdf)
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26.
- Trombly Jeanne. 1995. Engineering enzymes for better bioremediation. *Environmental science and technology*. Vol. 29, No 12; 560-564.
- Vargas M.V, Rodríguez R., Sánchez F. y Ramírez N. 2001. Biological transformation of anthracene in soil by *Pleurotus ostreatus* under solid-state fermentation conditions using wheat bran and compost. *CT&F Ciencia, tecnología y futuro*. Vol. 2, Núm 2, 43-50.

