

Indagación exploratoria *in vitro* de la capacidad degradadora de la cepa comercial *Pleurotus ostreatus* sobre dos concentraciones de petróleo crudo

In vitro inquiry on two concentrations of crude oil degradation ability by a commercial strain of *Pleurotus ostreatus*

Luisa Fernanda Boada Hurtado ¹, Jimena Sánchez Nieves ², Yih Wen Fung ³

Resumen

Objetivo. Evaluar la potencial actividad degradadora de la cepa comercial *Pleurotus ostreatus* sobre petróleo crudo como única fuente de carbono. **Método.** Se empleó un inóculo de 10mg del hongo en medio mínimo líquido de sales con volúmenes de 0,5% y 1% de petróleo en agitación constante durante 21 días a temperatura ambiente, registrando peso seco a los 0, 8,15 y 21 días. **Resultados.** Se obtuvo un máximo de biomasa 45mg para 0,5% de 39mg para 1%. Esto sugiere que el hongo sufre una adaptación fisiológica para utilizar el petróleo crudo para su crecimiento.

Palabras claves: degradación fúngica, macromicetes, hidrocarburos.

Abstract

Objectives. To evaluate the potential crude oil-degrading activity of *Pleurotus ostreatus* using it as the sole source of carbon and energy for growth. **Methods.** An inoculum of 10 mg of the fungus in the minimal liquid of salt with 0.5% or 1% crude oil in constant agitation for 21 days was used. Dry weight at 0, 8, 15 and 21 days was obtained. **Results.** The maximum biomass with a value of 45mg of 0.5% oil treatment registered while the 1% oil treatment reached a value of 39mg. These values suggest physiological adaptation of the fungus to crude oil as its sole carbon source for growth.

Keywords: crude oil, fungi mediated-biodegradation, macromycetes.

1. Bióloga, MSc. Medio ambiente y Desarrollo. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

2. Bacterióloga, MSc. Candidata a doctorado, Profesora Asociada. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

3. Microbióloga Industrial, MSc. Profesora Asistente. Departamento Biología. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

Desarrollo investigativo

La cepa *Pleurotus ostreatus* se obtuvo de manera comercial y fue preservada a 4°C. Para su activación se realizaron repiques en cajas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) Merck, incubando a 25°C durante 5 días. Se empleó un medio mínimo de sales para hongos celulolíticos modificado (HCM) descrito por Rivera et al. (1): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5gL⁻¹), KH_2PO_4 (1,0gL⁻¹), KCl (0,5gL⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2gL⁻¹), CaCl_2 (0,1gL⁻¹) y agua destilada a pH 6,0. Como única fuente de carbono se manejaron dos concentraciones de petróleo crudo (0,1% v/v y 0,05% v/v), caracterizado como petróleo crudo liviano 31 grados API (American Petroleum Institute), proveniente del pozo Trinidad (Casanare, Colombia). Para la fermentación en estado líquido (FEL) se distribuyeron tubos falcón de 45ml BIOLOGIX en tres grupos: controles y tratamientos a 0,1% y 0,05%. Los controles se dividieron en: sales + hongo (SH), sales + petróleo (SP) (control de esterilidad) y petróleo + hongo; todos estos con 9ml del medio mínimo de sales completando con 10ml del tratamiento correspondiente. Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación constante a 120rpm por un periodo de 21 días en un agitador THYS 2 Shuttletrequez 80521. La biomasa ganada se cuantificó por triplicado filtrando el contenido de los tubos falcón en filtros Munktell (diámetro 125mm), deshidratándolos en horno a 70°C durante 3 horas y hasta alcanzar peso constante. Se tomaron cinco papeles de filtro impregnados con

las cantidades de petróleo correspondientes (cinco para cada una) y se llevaron al horno por 3 horas a 70°C, tomando así los pesos de cada uno por concentración y promediando, este resultado fue restado a los filtros utilizados en cada una de las etapas.

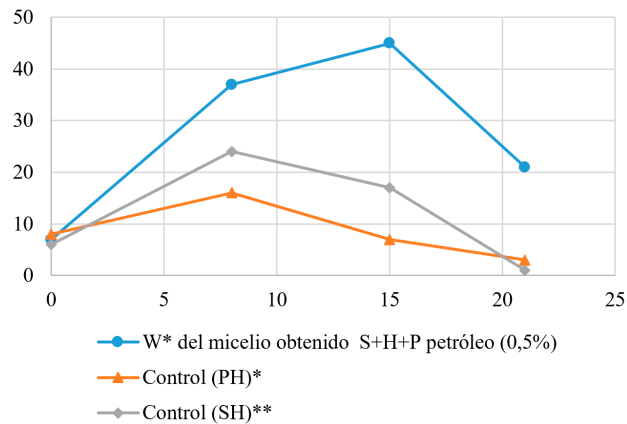
Los resultados de biomasa obtenidos en los tratamientos fueron sometidos a un análisis estadístico mediante el software PAST para datos no paramétricos, con un índice de significancia $p \leq 0,05$. Para determinar la importancia de las concentraciones entre tratamientos se aplicó la prueba no paramétrica Manni – Whitney arrojando un valor mayor al valor estimado p (0,05) de $p = 0,5354$, indicando que no hay diferencias significativas de los pesos obtenidos entre tratamientos. El análisis estadístico con la prueba para datos no paramétricos Krustal – Wallis arrojó un valor p (same) = 0,001 (concentración 0,5%) y p (same) = 0,008 (concentración 1%) menores al estimado mostrando que los pesos en los tratamientos son significativos en comparación con sus controles. El tratamiento 0,5% presentó un comportamiento de fase logarítmica en los primeros 15 días: el pico más alto en el día 15, con una biomasa total de 45mg, seguida de una fase de declinación hasta el día 21, con una biomasa total de 21mg. Para los controles se reportó una biomasa de 24mg para el control SH y de 15mg para el control PH (Tabla 1; Fig.1).

Tabla 1. Peso seco en miligramos (mg) por días correspondiente al tratamiento 0, 5 % v/v petróleo crudo. W: peso seco.*PH: petróleo +hongo. **SH: sales + hongo. Desviación estándar: W: 0,016 9; PH: 0,0054; SH: 0,0104.

BIOMASA (mg)			
DÍAS	W* del micelio obtenido S+H+P petróleo (0,5%)	Control (PH)*	Control (SH)**
0	7	8	6
8	37	16	24
15	45	7	17
21	21	3	1

Fuente. Elaboración propia.

Figura 1. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* cepa O1 Champinung en el tratamiento 1 (0,5% petróleo crudo V/V).

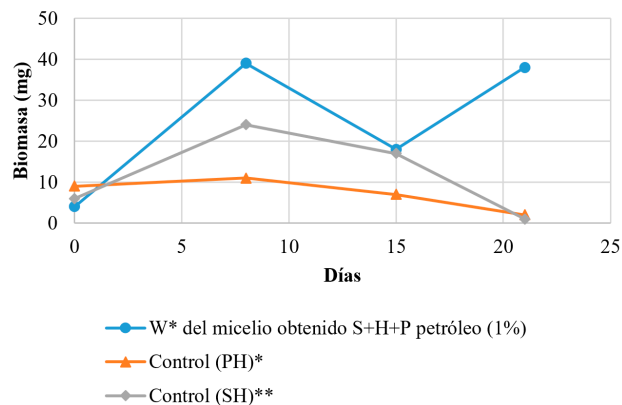


Fuente. Elaboración propia.

El tratamiento 1%, presentó un ascenso en el día 8 registrando un peso de 39mg; posteriormente, un descenso en el día 15, con un peso de 20mg, retomando el crecimiento a los 21 días con un peso de

38 mg. Los controles reportaron máximos de 24mg para el control SH, 11mg para el control PH (ver Figura 2; ver Tabla 2).

Figura 2. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* cepa O1 Champinung en el tratamiento 2 (1% petróleo crudo V/V).



Fuente. Elaboración propia.

Tabla 2. Peso seco en miligramos (mg) por días correspondiente al tratamiento 1 % v/v petróleo crudo. W: peso seco.*PH: petróleo +hongo. **SH: sales + hongo. Desviación estándar: W: 0,016 9; PH: 0,0054; SH: 0,0104

BIOMASA (mg)			
DÍAS	W* del micelio obtenido S+H+P petróleo (1%)	Control (PH)*	Control (SH)**
0	4	9	6
8	39	11	24
15	18	7	17
21	38	2	1

Fuente. Elaboración propia.

Según los resultados obtenidos, se evidenció crecimiento en presencia de petróleo crudo en las dos concentraciones (3-5). Las dinámicas del hongo reflejan la versatilidad del mismo para adaptarse a condiciones extremas en ausencia de fuentes tradicionales de carbono (2, 6), donde para el presente estudio fue sustituido por el hidrocarburo. Para el caso del tratamiento 1% se obtuvo una curva de crecimiento particular registrando dos picos, este resultado posiblemente puede atribuirse a la presencia de reservorios de glucógeno por parte del hongo que en condiciones de estrés pueden ser utilizados (7). Este comportamiento ha sido también reportado en organismos como *Mycobacterium sp*, *Pseudomonas sp* y *Sphingomonas sp* (11), *Penicillium sp*, *Trichoderma sp* y *Aspergillus sp* (1), *Phanerochaete chrysosporium* (12), *Pseudotrametes gibbosa* (13). Para evaluar la influencia de la concentración de petróleo (0,5% y 1%) con respecto a la biomasa ganada (9-10), el análisis estadístico arroja un $p=0,56$, indicando que no hay diferencias significativas entre concentraciones de petróleo crudo con respecto a la ganancia de biomasa, por lo cual se puede suponer que la concentración de petróleo dentro de estos valores es independiente al crecimiento del hongo (8). A pesar de que se presenta mayor acumulación de biomasa en menos tiempo a mayor concentración, es realmente el tiempo que toma la activación del hongo lo que permite que degrade el sustrato; por lo cual, mientras éste pueda sintetizar las enzimas necesarias, podrá degradarlo y crecer en dicho sustrato (12-16).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias

- Rivera M, Ferrera R, Volke V, Rodriguez R, Linares L. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. TERRA latinoamericana universidad autónoma Chapingo, México; 2002.
- Gadd G. Fungi in bioremediation. Cambridge British Mycological Society; 2001.
- Márquez Gómez Marco Antonio, Gómez Díaz Graciela María. Accidente ofídico en el departamento de Sucre, Colombia. Nova. 2015; 13(24): 39-46.
- Pinilla B Gladys, Chavarro P Bibiana, Moreno A Natalia, Navarrete O Jeannette, Muñoz M Liliana. Determinación de los genes, 16S ADNr, polA, y TpN47, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. Nova. 2015; 13(24): 17-25.
- Corrales Lucia Constanza, Antolinez Romero Diana Marcela, Bohórquez Macías Johanna Azucena, Corredor Vargas Aura Marcela. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Nova. 2015; 13(24): 55-81.
- Kadri, T., Rouissi, T., Brar Kaur, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of environmental sciences*; 2016.
- Vargas-Arispuro I, Contreras A, Hernández-Martínez J, Martínez-Téllez M. Arilselenofosfatos con acción antifúngica selectiva contra *Phymatotrichopsis omnivora* Revista Fitotecnia Mexicana [en línea] ; 2006. [Fecha de consulta: 14 de octubre de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61029210>> ISSN 0187-7380.
- González Yuri Lilian. Evaluación de la percepción del riesgo ocupacional en trabajadores de una empresa del sector de la construcción en Bogotá D.C. Nova. 2015; 13(23): 93-107.
- Naranjo Flórez Ricardo Andrés. Avances y perspectivas en Síndrome de Asperger. Nova. 2014; 12(21): 81-101.
- Zuluaga Martha, Robledo Sebastian, Osorio-Zuluaga German A, Yathe Laura, Gonzalez Diana, Tabora Gonzalo. Metabolomics and pesticides: systematic literature review using graph theory for analysis of references. Nova. 2016; 14(25): 121-138.
- Xiaojun Li, Xin Lin, Peijun Li, Wan Liu, Li Wang, Fang Ma, K.S Chukwuka. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. Elsevier; 2009.
- Davila G, Vazquez- Duhalt R. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. Universidad autónoma de México, DF, México. Mensaje bioquímico Vol XXX; 2001.
- Jiwei Wen, Dawen Gao, Bo Zhang, Hong Liang. Co- metabolic degradation of pyrene by indigenous white- rot fungus *Pseudotrametes gibbosa* from the northeast China ELSEVIER, 2011.

14. Ávila de Navia Sara Lilia, Estupiñán-Torres Sandra Mónica, Díaz González Liliana. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. Nova. 2016; 14(25): 139-145.
15. Almonacid Urrego Carmen Cecilia, Camarillo Romero María del Socorro, Gil Murcia Zulay, Medina Medina Claudia Yamin, Rebellón Marulanda Jennifer Viviana, Mendieta Zerón Hugo. Evaluación de factores de riesgo asociados a enfermedad cardiovascular en jóvenes universitarios de la Localidad Santafé en Bogotá, Colombia. Nova. 2016; 14(25): 9-17.
16. González Devia Johanna L., Monroy Romero Paola A., Almonacid Urrego Carmen C.. Homocisteína y otros factores de riesgo cardiovascular en niños de educación básica primaria del Colegio Distrital Manuel Elkin Patarroyo, Bogotá, D.C. Colombia. Estudio piloto. Nova. 2017 ; 15(27): 103-117.