

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Facultad de Ciencias

Escuela de Ciencias

**“Degradación de petróleo por hongos  
aislados desde suelos de la XII región de  
Chile contaminados con hidrocarburos”**

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas.

Profesor Patrocinante: Sr. Eduardo Valenzuela F. - Instituto de Microbiología -  
Facultad de Ciencias.

**Loretto Pilar Solís Mardones**

**Valdivia Chile 2005**



# Contenido

<b>1. RESUMEN .</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCION .</b>	<b>3</b>
<b>3. MATERIALES Y METODOS .</b>	<b>7</b>
<b>3.1. MATERIALES .</b>	<b>7</b>
<b>3.2. METODOS . .</b>	<b>8</b>
<b>4. RESULTADOS . .</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Aislamiento de cepas fúngicas muestras de suelo. . .</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Determinación del crecimiento de cepas fúngicas en agar mineral inorgánico     adicionado de petróleo. .</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Peso micelial de las cepas fúngicas seleccionadas después de su cultivo en     caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo. .</b>	<b>27</b>
<b>4.4. Cinética degradativa de petróleo crudo adicionado en caldo mineral inorgánico     por tres cepas fúngicas seleccionadas. . .</b>	<b>28</b>
<b>4.5. Determinación de fracciones del petróleo por espectrofotometría infrarroja tras     la cinética degradativa con tres cepas fúngicas seleccionadas. . .</b>	<b>29</b>
<b>5. DISCUSION .</b>	<b>33</b>
<b>5.1. Aislamiento de cepas fúngicas aisladas de suelo contaminado y no     contaminado con petróleo crudo de la XII Región de Chile. .</b>	<b>33</b>
<b>5.2. Determinación del crecimiento de cepas fúngicas en agar y caldo mineral     inorgánico adicionado de petróleo. .</b>	<b>34</b>
<b>5.3. Determinación de fracciones del petróleo tras su tratamiento con cepas     fúngicas seleccionadas determinadas por espectrofotometría infrarroja y su relación     con el peso micelial. . .</b>	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSIONES . .</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS .</b>	<b>43</b>
Anexo 1. Tabla de taxa y peso micelial de las cepas fúngicas aisladas desde las localidades de muestreo de la XII Región de Chile. .	<b>43</b>
Anexo 2. Preparación de medios de cultivo y reactivos utilizados en la obtención de cepas fúngicas aisladas desde suelos de la XII Región de Chile. . .	<b>50</b>



# 1. RESUMEN

Los estudios sobre la degradación de petróleo por medio de microorganismos como los hongos filamentosos, son de gran importancia para poder lograr una recuperación de los suelos y cuerpos de agua afectados por la contaminación con petróleo, aceites y derivados.

De los suelos no contaminados y contaminados con petróleo crudo de la XII Región de Chile, se recolectaron tres muestras de suelos y mediante el método de las diluciones seriadas se aislaron un total de 240 cepas fúngicas. En los cultivos en medio sólido y líquido adicionados de petróleo crudo se seleccionaron 3 cepas de un número de 240 para realizar una cinética degradativa del petróleo a periodos de tiempo determinados (0, 9, 18 y 36 días). En cada periodo de tiempo se evaluó la masa fúngica y mediante espectrofotometría infrarroja las fracciones del petróleo que fueron degradados.

Las cepas fúngicas aisladas desde los suelos se agruparon en 15 géneros, 1 micelio estéril y 3 cepas no determinadas. Las cepas aisladas en mayor número pertenecen a los géneros *Penicillium* (130), *Absidia* (32) y *Mortierella* (29).

Las cepas fúngicas Dd202, Dd219 y Dd225 utilizadas en la cinética degradativa del petróleo, degradaron mayoritariamente fracciones del petróleo cuyas frecuencias se encuentran entre  $2850\text{ cm}^{-1}$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a aldehídos, alquinos, y anhídridos; y las frecuencias que se encuentran entre  $1510\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a grupos alcanos (saturados e insaturados), aromáticos y alquilos.

## SUMMARY

Studies about oil crude degradation by microorganisms such as filamentous fungi are of great importance in order to recover both contaminated soils and water.

Three samples were taken from oil-polluted and non oil-polluted soils from the XII Region, Chile. Using an in-sequence dilutions method, 240 fungi strains were isolated. In both solid and liquid medium cultures with oil, out of 240 strains three were selected to achieve a degradation kinetics assay, during a period of time (0, 9, 18 y 36 days). At each time biomass was assessed, and also the degraded oil fractions were resolved by using infrared spectroscopy.

The isolated fungi strains include 15 genera, 1 mycelia sterilia and 3 unidentified strains; most of them belong to *Penicillium* (130), *Absidia* (32) y *Mortierella* (29).

As a result of the infrared spectroscopy, strains Dd202, Dd219 y Dd225 showed great degradative activity on oil crude fraction between  $2850\text{ cm}^{-1}$  and  $1800\text{ cm}^{-1}$  frequencies including aldehydes and alkynes; and between  $1510\text{ cm}^{-1}$  and  $1000\text{ cm}^{-1}$  frequencies including saturated and unsaturated alkanes, aromatic and alkyl groups.

## 2. INTRODUCCION

Los hidrocarburos y sus derivados son sustancias de alto peso molecular, insolubles en agua, que resultan muy tóxicos para los organismos vivos. Químicamente, el petróleo está formado por una mezcla compleja de hidrocarburos, compuesto de carbono e hidrogeno, y en menor cantidad nitrógeno, azufre y oxígeno, así como trazas de metales. Su configuración es compleja por la capacidad del átomo de carbono para formar cadenas o ciclos, existiendo así cuatro tipos de hidrocarburos: saturados (alcanos y cicloalcanos), aromáticos, asfáltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas) y resinas (piridinas, quinolines, carbazoles, sulfóxidos y amidas) (Colwell & Walker, 1977). Los hidrocarburos con bajo peso molecular son gases, mientras los de alto peso molecular son líquidos o sólidos a temperatura ambiente (Madigan *et al.*, 1999).

Debido a la naturaleza compleja de los compuestos del petróleo, la mayoría de los microorganismos del suelo no pueden crecer en presencia de hidrocarburos, sin embargo existe tolerancia microbiana a la presencia de petróleo en el suelo, lo cual induce a la selectividad y disminución de la diversidad, desarrollando y utilizando respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas (Atlas *et al.*, 1991). En muchos suelos contaminados con petróleo, existen principalmente bacterias y hongos que son capaces de degradar los hidrocarburos y utilizarlos como fuente de carbono, siendo esta una de las posibles causas del incremento de la biomasa microbiana, luego de un tiempo de exposición al contaminante. Algunas especies de hongos llegan hacer abundantes inmediatamente después de agregar la fuente de carbono, pero disminuyen poco tiempo después del incremento inicial; lo que es causado por la mayor disponibilidad de sustratos de carbono oxidado (Alexander, 1994). Existe una diferencia al degradar los

hidrocarburos, los compuestos saturados y aromáticos con uno y cinco anillos bencénicos son utilizados como fuente energética, en cambio, los aromáticos de peso molecular alto (con más de cinco anillos bencénicos), resinas y asfáltenos son difíciles de degradar por su carácter recalcitrante (Sugiura *et al.*, 1997). La degradación de los alcanos lineales es uno de los procesos más comunes de hidrocarburos, y se lleva a cabo en la naturaleza por una amplia variedad de microorganismos autóctonos, en laboratorio se han determinado microorganismos de diversos grupos, entre ellos bacterias y levaduras, especialmente *Saccharomyces* y *Candida* capaces de degradarlos (Mesta, 1998). Las bacterias y hongos oxidadores de hidrocarburos son los principales agentes de la descomposición de petróleo y de sus derivados (Madigan *et al.*, 1999). Sin embargo, las bacterias son menos efectivas que los hongos en la degradación de hidrocarburos que presentan una estructura química compleja, debido a que los hongos poseen una batería enzimática más efectiva para atacar los hidrocarburos de mayor peso molecular del petróleo (Munnecke & Huysmans, 1998).

La liberación de sustancias como petróleo a medios acuáticos y terrestres, ya sea por procesos naturales como por la actividad humana, provocan un impacto en estos ecosistemas, pues existen una serie de limitantes por parte de los microorganismos para su biodegradación, entre otras: las bajas temperaturas, la escasez de nutrientes minerales especialmente N, P y la falta de oxígeno (Atlas, 1981). Los suelos contaminados con hidrocarburos son clasificados como desechos peligrosos para microorganismos y plantas (Hou *et al.*, 1999). A la vez las bajas temperaturas pueden limitar la tasa de biodegradación del petróleo, incrementando la permanencia del agente contaminante en el espacio y tiempo (Bodenec *et al.*, 1987).

Varios autores, entre otros Bouchez *et al.*, (1996), Yateem *et al.*, (1998) y Juhasz & Naidu (2000), presentan listas de bacterias y hongos que proceden de ambientes marinos, pozos y suelo, siendo capaces de degradar amplios espectros de contaminantes del petróleo. De acuerdo con otras publicaciones, especies de hongos miceliales de los géneros *Trichoderma* y *Mortierella* son las más comúnmente aisladas desde suelos contaminados con petróleo, siendo las especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* aisladas con mayor frecuencia desde ambientes marinos y terrestres contaminados con petróleo (Lemos *et al.*, 2002).

Según Lemos *et al.* (2002) en suelos de Brasil (Guararema) contaminados accidentalmente con petróleo se aislaron 4 géneros y 9 especies de hongos, siendo estas: *Aspergillus niveus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium corylophilum*, *Paecilomyces variotti*, *Paecilomyces niveus* y *Fusarium* sp. Se determinó que *A. versicolor* presenta una alta eficiencia de biodegradación del petróleo (10.8%), así como la eliminación de materia orgánica (11.4%). Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras zonas petroleras. Radwan *et al.* (1995) encontraron en un cultivo de tomates a nivel de la rizósfera contaminado con petróleo hongos de los géneros *Penicillium* y *Fusarium*. Por su parte, April *et al.* (2000) identificaron varias especies de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliocladium* en pastos de suelos contaminados con petróleo en el oriente y sureste de Canadá. Rivera-Cruz *et al.* (2002) aislaron de la rizósfera *Echinochloa polystacha* en suelo con derrame reciente de petróleo y del *Paspalum virgatum* en Gleysol con derrame



crónico hongos pertenecientes a *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Paecilomyces* y siete taxas no identificadas. Okerentugba & Ezeronye (2003) aislaron hongos pertenecientes a *Penicillium*, *Aspergillus* y *Rhizopus* desde aguas dulces contaminadas con petróleo donde se observó la capacidad degradativa de petróleo. Estos microorganismos posiblemente son oxidadores de hidrocarburos y deben poseer en la membrana citoplasmática un grupo específico de oxigenasas, asociadas con la producción de agentes de superficie que son compuestos que tienen una fracción hidrofílica y una hidrofóbica, propiedad que reduce la tensión superficial del medio acuoso, por los que los hidrocarburos aumentan su solubilidad (Rosenberg & Ron, 1998).

Dos cepas de *Penicillium* fueron aisladas desde áreas expuestas a filtraciones de petróleo en las costas del Mediterráneo. Con la técnica de espectrofotometría infrarroja, estos microorganismos revelaron al octavo día de tratamiento la capacidad de degradar hidrocarburos parafínicos y aromáticos (Abu-Elgheit & Yusef, 1980).

En Chile el 19 de junio de 1950, se promulgó la Ley 9.618 que creó la Empresa Nacional del Petróleo, (ENAP). En las décadas siguientes, se construyeron oleoductos y nuevos terminales para recibir la producción de petróleo proveniente de Magallanes. En el plano internacional, la empresa se adhiere a la normativa emanada de tratados y acuerdos internacionales de carácter ambiental y sanitario para la calidad y manipulación de combustibles, preocupándose también por minimizar el riesgo de accidentes ecológicos en el transporte de sus productos. En este aspecto, destacan el Convenio Internacional firmado en 1954, relativo a la intervención en alta mar en casos de accidentes que causen una contaminación por hidrocarburos (Empresa Nacional del Petróleo, 2004).

Los análisis de petróleo crudo magallánico solicitados por ENAP a empresas particulares, indican que las características son: bajo en contenido de azufre (dulce) y de acuerdo a su densidad API es ligero o súper ligero, parafínico de cadena larga (Alcanos). En la Tabla 1, se indica la clasificación del crudo de acuerdo a su densidad API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo, que diferencia las calidades del crudo).

**TABLA 1. Clasificación del crudo de acuerdo a su densidad API.**

<b>Aceite Crudo</b>	<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Densidad grados API</b>
Pesado	1,0 - 0,92	10,0 - 22,3
Mediano	0,92 - 0,87	22,3 - 31,1
Ligero	0,87 - 0,83	31,1 – 39
Superligero	<0,83	>39

Fuente: [Instituto Mexicano del Petróleo. www.imp.mx/petroleo/apuntes/tipos.htm](http://www.imp.mx/petroleo/apuntes/tipos.htm) (2004).

En los últimos años, en algunos suelos de Magallanes cercanos a los sitios de acopio de petróleo, poliductos, procesamiento de petróleo, etc., se han determinado distintos niveles de contaminación por petróleo crudo o algunos derivados. Las áreas

contaminadas por parte de la ENAP, no presentan registros detallados del tipo de suelo contaminado, tipo de hidrocarburos del petróleo contaminante o fecha del derrame. La ENAP consciente de la alteración de estos suelos y de acuerdo a las normativas medioambientales imperantes en Chile, se ha hecho eco y deber de recuperar estos suelos para uso agrícola o forestal.

Basándose en los antecedentes expuestos se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

Hongos aislados desde suelos de la XII Región de Chile contaminados con petróleo crudo son capaces de degradar algunas fracciones de hidrocarburos en condiciones de laboratorio.

Para aceptar o rechazar la hipótesis enunciada, se plantean los siguientes objetivos específicos.

1. Aislar cepas fúngicas desde suelos controles y contaminados con hidrocarburos de la XII Región de Chile.
2. Identificar las cepas fúngicas aisladas hasta el rango de género.
3. Preseleccionar de acuerdo al incremento de peso, cepas fúngicas degradadoras de petróleo en medio de cultivo líquido adicionado de este compuesto.
4. Realizar ensayos de degradación de petróleo con cepas fúngicas seleccionadas y determinar las fracciones del petróleo degradado por espectrofotometría infrarroja.

## 3. MATERIALES Y METODOS

### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. Biológico

Se emplearon 240 cepas fúngicas aisladas de suelos contaminados y no contaminados con petróleo crudo recolectadas en tres zonas de muestreos de la XII Región de Magallanes y la Antártica chilena.

#### 3.1.2. Reactivos

Los reactivos utilizados en la fase experimental se indican a continuación en orden alfabético: agar extracto malta al 2% (AEM), agar Czapek's al 2% (Acz), agar-agar, agar papa dextrosa al 2 % (PDA), alcohol de 90°, antibiótico (penicilina G. sódica 0.5 %; estreptomicina 0.25 %), azul de lactofenol, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloruro de potasio (KCl), fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sodio (NaOH), rojo congo, sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

#### 3.1.3. Equipos

Agitador orbital Lab.Line Orbil Environ-shaker, autoclave Orsa, balanza Precisa 2200C, balanza analítica Sartorius 2462, cámara de incubación Kotterman GMB type S430; cámara fría Eurofrigo, espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer FTIR bx II, estufa

de secado Trilab, horno microondas, microscopio óptico Carl Zeiss, pHmetro Hi 9321 microprocessor pH meter, Refrigerador Trotter.

#### **3.1.4. Otros**

Aceite de inmersión, agua destilada, aguja de siembra, algodón, bolsas de nylon, botellas plásticas de 50 mL, cubreobjetos (18 x 18 mm), embudos de vidrio, espátula, lápiz marcador, matraces Erlenmeyer 200 mL, mecheros, muestras de suelo contaminados y no contaminados con petróleo, olla a presión Megafensa, papel filtro Whatman 2, petróleo crudo, papel aluminio, parafilms, pinzas, pipeta Pasteur, pipetas graduadas de 1 y 5 mL, pisceta, placas Petri (85 mm de diámetro), portaobjetos (75 x 25 mm de diámetro), tijera, tubos ensayo (15 mm de diámetro), vasos precipitados de 500 y 2000 mL.

## **3.2. METODOS**

### **3.2.1. Lugar de estudio.**

La zona en estudio corresponde a las instalaciones de la Empresa Nacional del Petróleo (ENAP) en la XII Región de Chile. La Región está ubicada en el extremo sur del continente americano. Es la región más austral y extrema del país. Sus límites son: por el norte, la Región de Aysén (48° 36'); por el sur, las aguas internacionales del Mar de Drake (56° 30'); por el este, la República Argentina; y por el oeste el Océano Pacífico Sur Oriental. La empresa se encuentra ubicada a unos 30 Km de Punta Arenas, capital de la Región.

Su diversidad climática, se refleja en las bajas temperaturas y fuertes vientos durante todo el año. En esta zona las precipitaciones anuales fluctúan entre 200 y 300 mm, mientras que la temperatura media anual es de 4,8° C ( Covacevich & Ruz, 1996 ). En general las precipitaciones disminuyen de Occidente a Oriente y las temperaturas aumentan en la misma dirección. La presencia de largos valles cordilleranos, ventisqueros y ríos hacen variar el clima, permitiendo la existencia de microclimas con mayores temperaturas. Los suelos de Magallanes están constituidos por materiales de origen glacial y fluvio-glacial, depositados sobre un subsuelo formado por arenisca y arcillas del terciario. Las texturas son variables, siendo común las franco-arenosas y franco-arcillo-arenosas en superficie ( Saez, 1994 ). Los principales recursos económicos en la Región, son la minería y destacándose el petróleo, gas y carbón.

### **3.2.2. Periodo de muestreo.**

Se efectuó la colecta de suelos en las tres localidades, en el mes de marzo del año 2004 para realizar el presente estudio.

### **3.2.3. Recolección de muestras de suelo.**

Las muestras de suelo fueron recolectadas a dos profundidades (0-20 y 20-40 cm), desde tres suelos contaminados y no contaminados con petróleo de la XII Región de Chile. Los derrames de petróleo se deben al rompimiento de los calentadores situados

cada cierto tramo de los ductos que transportan el petróleo. Los suelos desde los que se obtuvieron las muestras se denominan, Posesión ubicado a 240 Km al norte de Punta Arenas, Catalina Sur y Clarencia ubicados en Tierra del Fuego. (Figura 1). En el sitio de muestreo se delimitó una parcela de 5 x 5 m y luego con ayuda de una pala estéril y de la profundidad antes señalada se recolectaron 3 muestras de suelo, cada una de 500 g que fueron depositados independientemente en bolsas plásticas y transportadas al Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, para su análisis microbiológico.

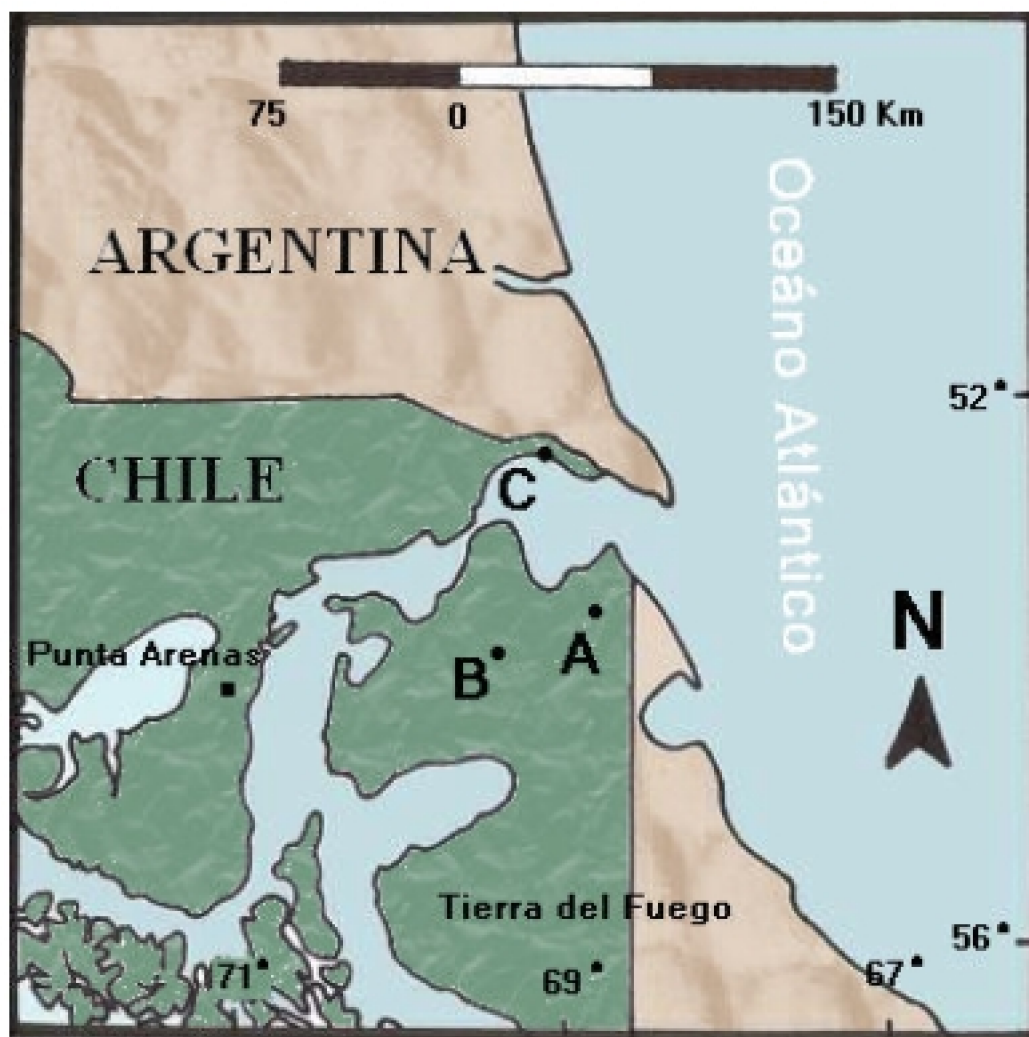


FIGURA 1. Ubicación geográfica del área de estudio donde se recolectaron las muestras de suelo, A: Catalina Sur, B: Clarencia y C: Posesión.

#### 3.2.4. Procesamiento de las muestras de suelo y aislamiento de cepas fúngicas.

Independientemente a cada suelo con ayuda de una pinza estéril se le retiraron los restos vegetales, luego las tres muestras de un mismo suelo y de la misma profundidad se mezclaron para obtener una muestra compuesta y representativa. De la muestra compuesta se pesaron 10 g de suelo y se depositaron en un matraz que contenía 100 mL de agua destilada estéril, luego la mezcla se agitó vigorosamente durante 3 a 5 minutos

para su homogenización y a continuación se realizaron las diluciones seriada (hasta la dilución  $10^{-6}$ ) como se indican. A partir de la suspensión que se obtuvo en el matraz (dilución  $10^{-1}$ ) con ayuda de una pipeta estéril se tomó 1 mL y se depositó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, obteniéndose así una dilución  $10^{-2}$ , a partir del tubo que contenía la dilución  $10^{-2}$  previamente agitado y con ayuda de una nueva pipeta estéril se extrajo 1 mL y se depositó en un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, obteniéndose así una dilución  $10^{-3}$ . Esta metódica se realizó hasta obtener una dilución  $10^{-6}$ . Para el aislamiento de los hongos cada una de las diluciones obtenidas se sembró independientemente y por triplicado en placas Petri que contenían agar extracto malta al 2% (AEM), para ello, en la placa Petri vacía y estéril se depositó 1 mL de la dilución respectiva más 0.5 mL de una mezcla de antibióticos (estreptomina y penicilina) y 10 mL de AEM al 2% fundido y enfriado, luego la mezcla se homogenizó manualmente y una vez solidificado el agar las placas se incubaron a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  por 10 días, diariamente se inspeccionaron las placas para detectar la formación de colonias fúngicas. Las colonias que surgieron fueron repicadas con ayuda de una aguja de siembra estéril en tubos que contenían AEM 2% inclinado. Los tubos sembrados se incubaron a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  hasta que el micelio cubriera las tres cuartas partes del medio de cultivo (aprox. 10 días). Los cultivos obtenidos se almacenaron en una cámara fría a  $4^\circ \text{C}$  hasta su posterior identificación.

Esta misma metodología y condiciones de cultivo se aplicaron a los suelos no contaminados con petróleo. Así se aislaron 20 cepas de cada suelo y profundidad correspondiente (Catalina Sur, Clarencia y Posesión), obteniéndose un total de 240 cepas.

### **3.2.5. Selección de cepas fúngicas en medio mineral adicionado de petróleo.**

Cada una de las cepas fúngicas aisladas desde las muestras de suelo no contaminados y contaminados con petróleo fueron cultivadas independientemente en placas Petri que contenían agar mineral inorgánico (anexo 2) adicionado de petróleo crudo (1% vol/vol). Para ello, a partir de un cultivo fresco de la cepa fúngica en estudio se extrajo con un sacabocado de 15 mm de diámetro un círculo de agar con micelio y se depositó en el centro de la placa que contenía el agar mineral inorgánico añadido de petróleo, paralelamente de la misma cepa en estudio se sembró un círculo de agar con micelio de 15 mm en una placa que contenía AEM al 2% (medio de control). Las placas sembradas fueron incubadas a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  por 20 días, período en que se realizó la evaluación. Como criterio para seleccionar las potenciales cepas que utilizan el petróleo (24 en total, dos cepas de cada suelo y a cada profundidad) se utilizó el diámetro de la colonia alcanzado a los 20 días de incubación y el peso micelial fúngico a igual período de incubación. Este último se determinó pesando en una balanza analítica círculos de agar con micelio de 15 mm de diámetro extraídos desde las placas de agar mineral adicionadas de petróleo, obteniéndose así el peso fresco micelial, luego los círculos de agar con micelio fueron secados en la estufa de secado a  $60^\circ \text{C}$  hasta la obtención de peso seco constante. Para obtener el peso micelial se utilizó la siguiente fórmula:

$$P_f - P_s = M$$

Donde  $P_f$  corresponde a peso fresco micelial,  $P_s$  es peso seco micelial y  $M$  peso

micelial.

#### **3.2.6. Cultivo de cepas fúngicas en caldo mineral inorgánico más petróleo.**

Cada una de las cepas preseleccionadas (24 cepas) de acuerdo a lo señalado en el punto 3.2.5 fueron sembradas en forma individual y por duplicado en matraces de 200 mL, que contenían 100 mL de caldo mineral inorgánico adicionado con petróleo crudo al 1% (CMI+P), para ello al interior del matraz se depositaron 3 círculos de agar con micelio de 15 mm de diámetro obtenidos desde un cultivo fresco de la cepa en estudio. Sembrados los matraces se depositaron en un agitador orbital y se incubaron a  $23 \pm 2$  °C, 1.500 r.p.m por 18 días. Al término del período de incubación, independientemente el contenido de cada matraz fue filtrado a través del papel filtro Whatman 2. El micelio del hongo retenido en el filtro fue depositado en una placa Petri y luego pesado en una balanza analítica, obteniéndose así el peso fresco micelial. Para determinar el peso seco, la placa que contenía el micelio se depositó en una estufa de secado a 60 °C hasta la obtención del peso seco constante del micelio, para luego obtener el peso micelial fúngico, como se indicó en el punto 3.2.5.

Para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo, se seleccionaron 3 cepas fúngicas (independiente del tipo de suelo y profundidad analizada) de acuerdo al mayor peso micelial fúngico.

#### **3.2.7. Cinética degradativa de petróleo crudo.**

Para determinar de las tres cepas fúngicas seleccionada (según el punto 3.2.6) la mejor cepa degradadora de petróleo crudo o de algunos de sus constituyentes se realizó una cinética degradativa de petróleo a lo largo del tiempo, para ello cada una de las cepas seleccionadas se trató individualmente y por duplicado. La cepa en estudio (50.000 propágulos fúngicos) se sembró en matraces que contenían 200 mL de medio inorgánico líquido más 2% de petróleo crudo, los matraces sembrados se incubarán en un agitador orbital a  $23 \pm 2$  °C, 1.500 r.p.m, y al tiempo 0, 9, 18 y 36 días se retiraron los matraces respectivos y su contenido se filtró a través del papel filtro Whatman 2. El micelio retenido en el filtro se pesó para determinar el peso fresco y seco (como se señaló en el punto 3.2.5) obteniendo así el peso micelial. El filtrado fue analizado por espectrofotometría infrarroja en los laboratorios de ENAP Magallanes, para determinar las fracciones del petróleo que han sido biodegradadas.

#### **3.2.8. Determinación de fracciones de petróleo.**

Para determinar las fracciones del petróleo degradadas, los filtrados del ensayo (indicado en el punto 3.2.7) fueron enviados a la Empresa Nacional de Petróleo (ENAP), ubicada en la ciudad de Punta Arenas, donde técnicos utilizaron protocolos estándares para establecer por la técnica de espectrofotometría infrarroja las fracciones de hidrocarburos que habían sido degradadas.

#### **3.2.9. Identificación taxonómica de cepas fúngicas.**

A los cultivos puros de cepas fúngicas obtenidas de acuerdo al punto 3.2.4, se les procedió a realizar su identificación taxonómica hasta el rango de género. En primer lugar se realizó una caracterización macroscópica de los cultivos fúngicos cultivados en AEM al 2% luego de 7 días de incubación a  $23 \pm 2$  °C, se determinó la forma de la colonia, color,

textura y velocidad de crecimiento. Las cepas fúngicas presumiblemente pertenecientes al género *Penicillium*, fueron sembradas en agar Acz (agar czapecks) al 2%, siendo incubado a  $23 \pm 2$  °C por 14 días y aquellas del género *Fusarium* en PDA (agar papa dextrosa) incubadas a  $23 \pm 2$  °C por 7 días. Microscópicamente mediante preparaciones en fresco a cada cepa se le determinó la forma, tamaño y color de sus células conidiogénicas, esporas, estructuras de resistencia (si las hay) y tipo de hifas.

Los datos macro-microscópicos obtenidos se confrontaron con los que aparecen en las claves taxonómicas de Von Arx (1981). Para lograr una mejor identificación se consultaron distintos textos y monografías micológicas, como Domsch, *et al* (1980), Ainsworth & Bisby`S (1995), para *Penicillium sp*, Ramírez (1982), para *Fusarium sp*. Both (1997) y para *Pithomyces* y *Ulocladium sp*.Ellis (1976).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento de cepas fúngicas muestras de suelo.

De acuerdo al procesamiento de las muestras de suelos no contaminados y contaminados con petróleo se obtuvo un total de 240 cepas fúngicas, 20 de cada suelo en estudio (Catalina Sur, Clarencia y Posesión) y profundidad analizada (0-20 y 20-40 cm). El listado de la taxa fúngica y la distribución correspondientes a los suelos contaminados y no contaminados con petróleo a sus respectivas profundidades, se detallan en el Anexo 1, Tabla 1 y 2.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en la identificación y distribución de las cepas fúngicas aisladas de las muestras de suelo. Como se observa en la Figura 2a a 2d para el suelo Catalina Sur (no contaminado y contaminado con petróleo) a las profundidades 0-20 y 20-40 cm. Para las 20 cepas aisladas del suelo Catalina Sur (Fig. 2a) no contaminado (prof. 0-20 cm), se determinó que el mayor número de cepas (11) pertenecen al género *Penicillium* y el menor número de cepas (1) corresponde al género *Acremonium*. En la Figura 2b, del suelo contaminado con petróleo a la misma profundidad, se observa una mayor variedad de taxa, siendo las cepas aisladas en mayor número (9) pertenecientes a *Penicillium* y las cepas con menor número (1) a *Cunninghamella* y *Phoma*. En la Figura 2c, del suelo no contaminado (prof. 20-40 cm)

presentó una gran variedad de taxa, siendo las cepas aisladas en mayor número (8) pertenecientes a *Penicillium* y las cepas con menor número (1) pertenecientes a los géneros *Acremonium*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Pithomyces*. Por último en la Figura 2d, del suelo contaminado con petróleo a la misma profundidad se observa que el mayor número de cepas (8) pertenecen al género *Penicillium* y el menor número (2) al género *Cladosporium*.

Las 20 cepas aisladas del suelo Clarencia no contaminado y contaminado a las profundidades 0-20 y 20-40 cm se agruparon taxonómicamente de la siguiente manera: en la Figura 3a, del suelo no contaminado (prof. 0-20 cm), presentan un mayor número de cepas fúngicas (15) que corresponden a *Penicillium* y el menor número (1) a *Absidia* y *Mortierella*. Por su parte, del suelo contaminado con petróleo a la misma profundidad (Fig. 3b), se puede observar que el mayor número (15) de cepas aisladas pertenecen al género *Absidia* y el menor número de cepas (1) corresponden a los géneros *Aspergillus* y *Acremonium*. En la Figura 3c, del suelo no contaminado (prof. 20-40 cm), se puede observar que el mayor número de cepas fúngicas (13) pertenecen al género *Penicillium* y las cepas con menor número (1) pertenecen a *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Phoma*. Por último, en la Figura 3d, del suelo contaminado con petróleo y a la misma profundidad, el mayor número de cepas (6) pertenecen a *Penicillium*, y el menor número (1) a *Acremonium* y *Mucor*.

Las 20 cepas aisladas del suelo Posesión no contaminado y contaminado a las profundidades 0-20 y 20-40 cm se agrupan taxonómicamente de la siguiente forma: en la Figura 4a, se puede observar que del suelo no contaminado a la profundidad 0-20 cm, un número mayor de cepas (15) corresponden a *Penicillium* y el menor número de cepas (1) pertenecen a *Mortierella*. En la Figura 4b, del suelo contaminado con petróleo a la misma profundidad, el mayor número de cepas (15) pertenecen al género *Penicillium* y el menor número (1) a *Aspergillus*, *Ulocladium* y micelio estéril. En la Figura 4c, del suelo no contaminado a la profundidad 20-40 cm, se determinó que el mayor número de cepas fúngicas (10) pertenecen a *Penicillium* y un menor número (1) a *Cladosporium*. Finalmente en la figura 4d, del suelo contaminado con petróleo a la misma profundidad, se aislaron un mayor número de cepas (17) pertenecientes a *Penicillium* y el menor número (1) a *Absidia*, *Aspergillus* y *Phoma*.

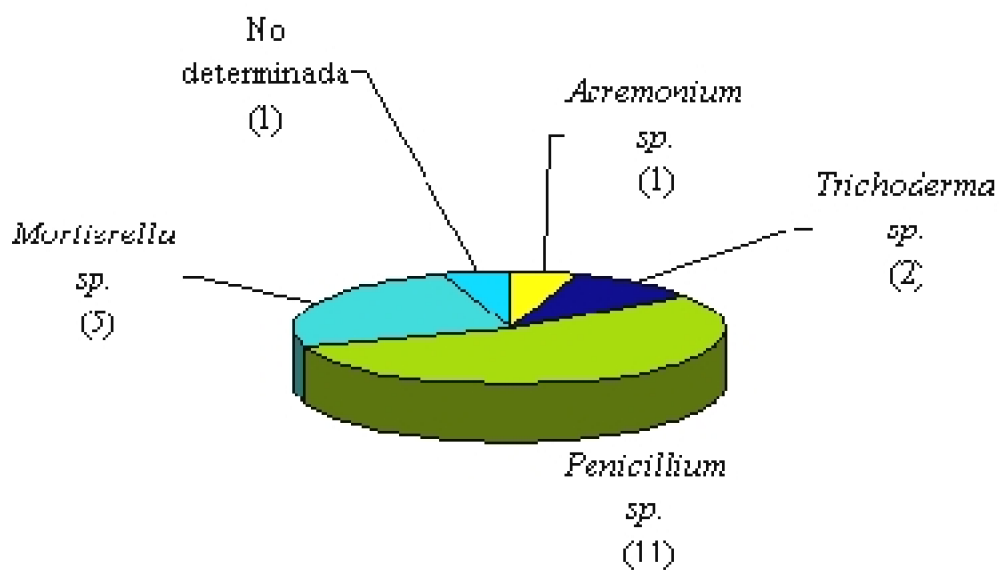


FIGURA 2a. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Catalina Sur no contaminado a la profundidad 0-20 cm.

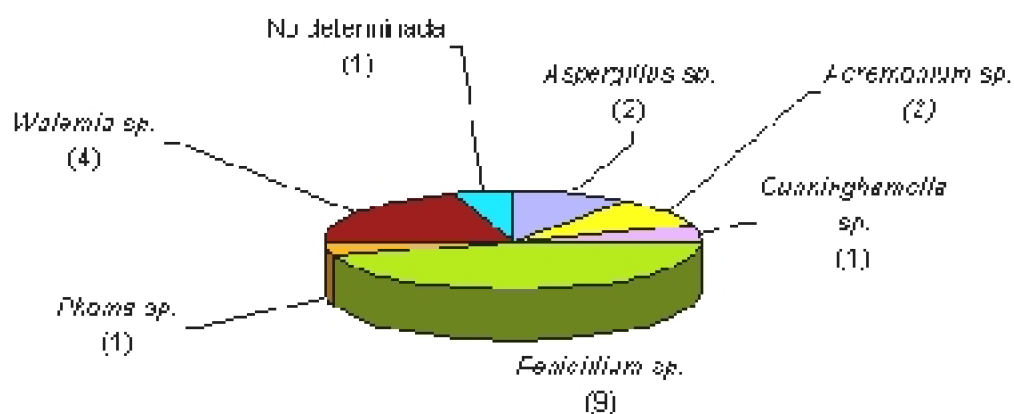


FIGURA 2b. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Catalina Sur contaminado con petróleo a la profundidad 0-20 cm.

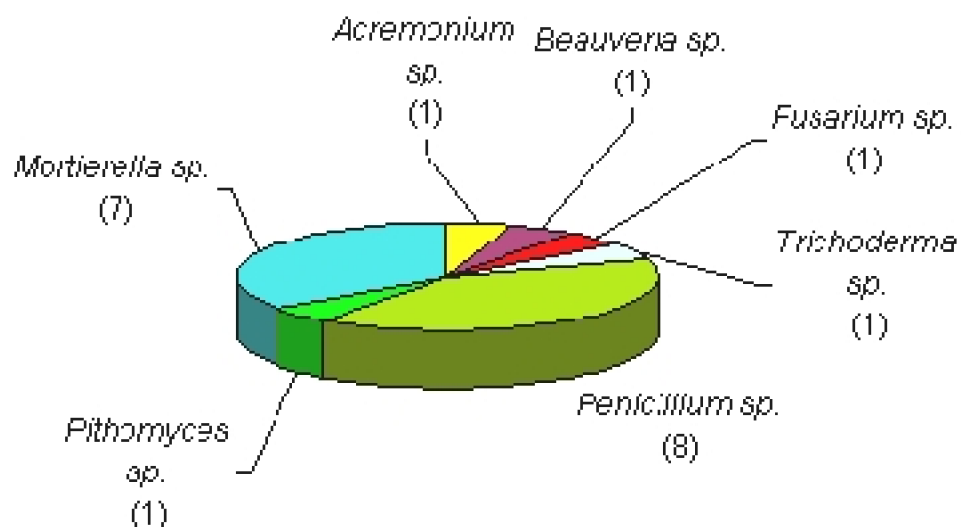


FIGURA 2c. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Catalina Sur no contaminado a la profundidad 20-40 cm.

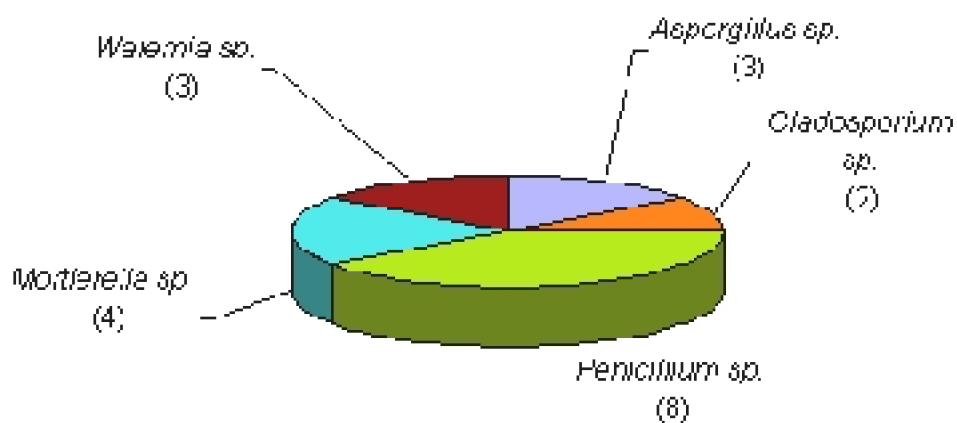


FIGURA 2d. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Catalina Sur contaminado con petróleo a la profundidad 20-40 cm.

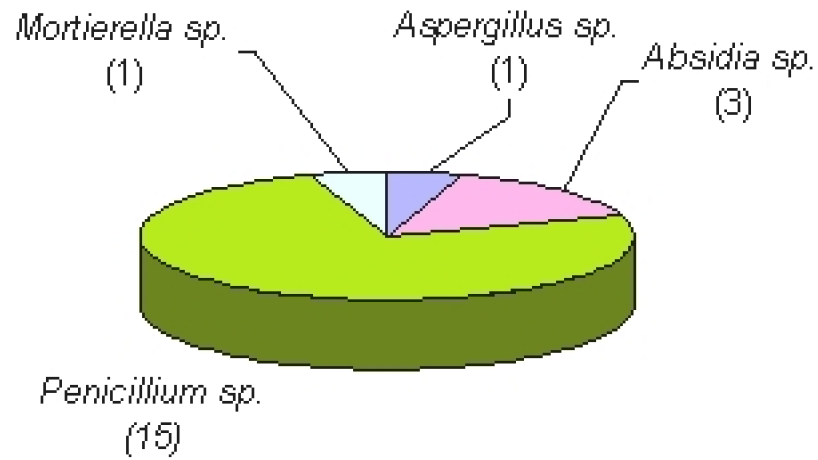


FIGURA 3a. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Clarencia no contaminado a la profundidad 0-20 cm.

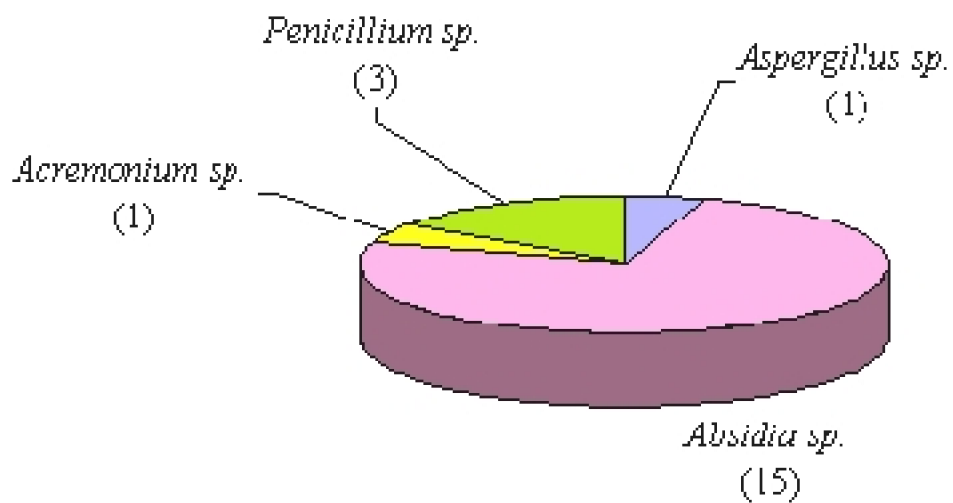


FIGURA 3b. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Clarencia contaminado con petróleo a la profundidad 0-20 cm.

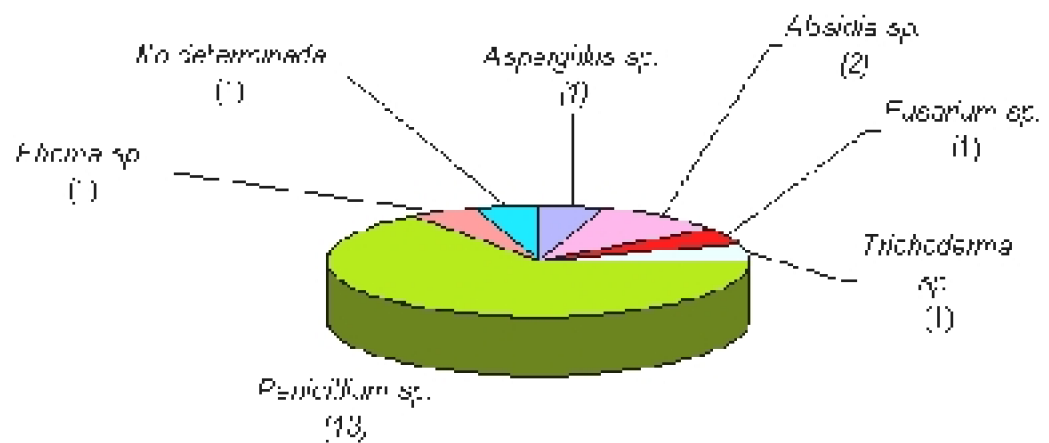


FIGURA 3c. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Clarencia no contaminado a la profundidad de 20-40 cm.

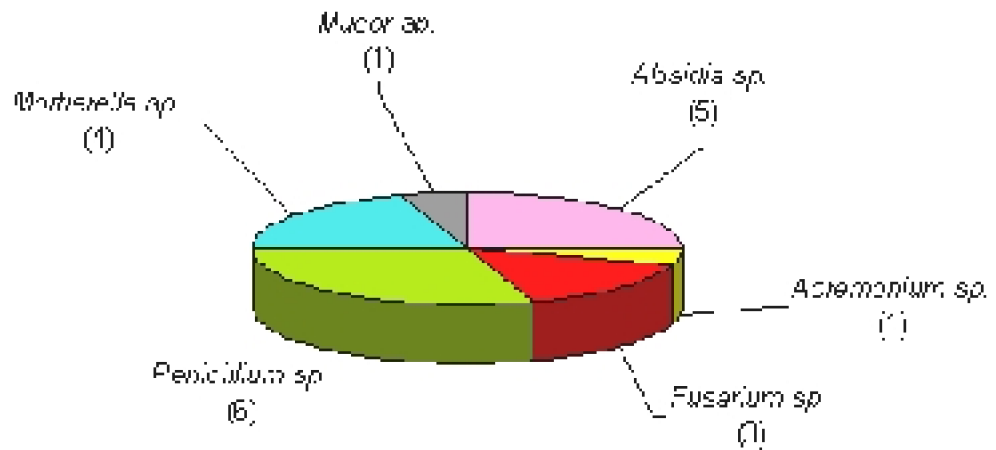


FIGURA 3d. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Clarencia contaminado con petróleo a la profundidad 20-40 cm.

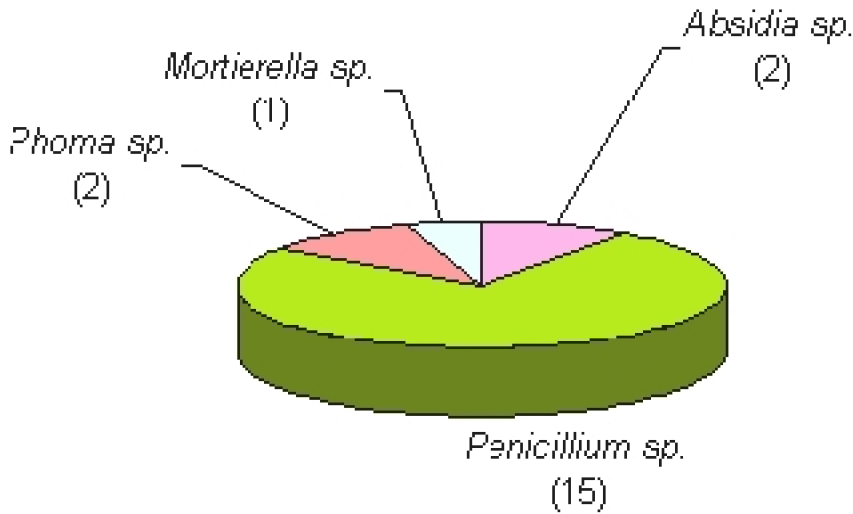


FIGURA 4a. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Posesión no contaminado a la profundidad 0-20 cm.

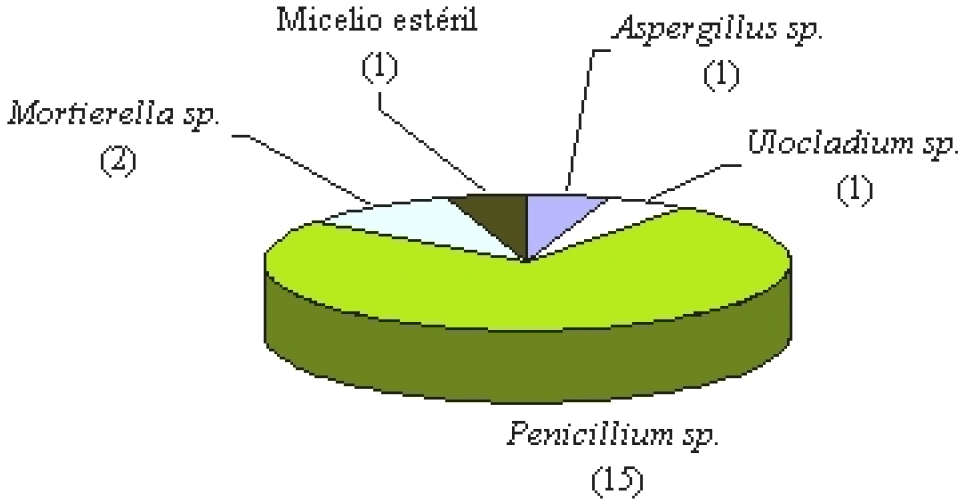


FIGURA 4b. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Posesión contaminado con petróleo a la profundidad 0-20 cm.

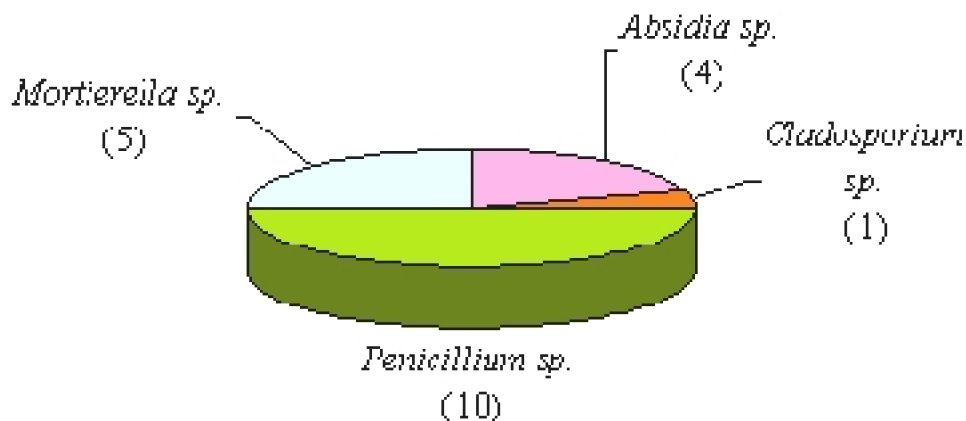


FIGURA 4c. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Posesión no contaminado a la profundidad 20-40 cm.

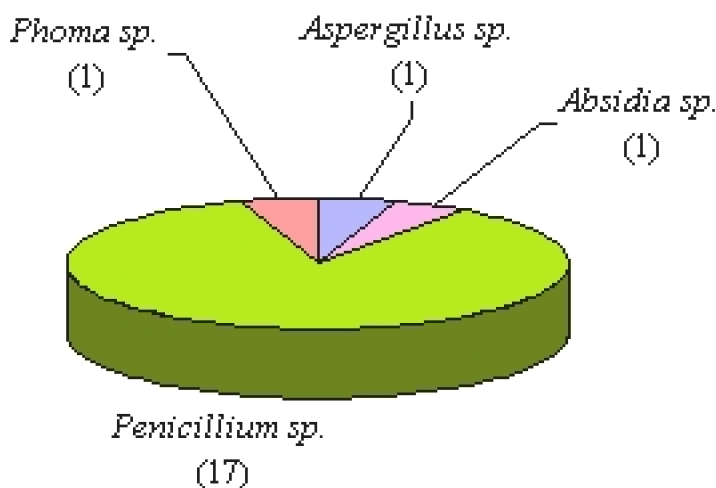


FIGURA 4d. Taxa de cepas fúngicas determinadas del suelo Posesión contaminado con petróleo a la profundidad 20-40 cm.

## 4.2. Determinación del crecimiento de cepas fúngicas en agar mineral inorgánico adicionado de petróleo.

Las cepas fúngicas ensayadas corresponden a aquellos aislados desde los suelos contaminados y no contaminados con petróleo de la XII Región de Chile, recolectados a dos profundidades (0-20 y 20-40 cm).



En las Tablas 2 a la 4, en la primera y quinta columna se indican las siglas de las cepas fúngicas ensayadas. En la segunda y sexta columna de las respectivas tablas se muestra el diámetro de las colonias fúngicas en agar extracto de malta al 2% (AEM 2%) utilizado como medio control. En la tercera y séptima columna se señala el diámetro de la colonia fúngicas tras su cultivo en agar mineral inorgánico adicionado de petróleo al 1% (AMI+P). Por último, en la cuarta y octava columna se indica el peso micelial (peso fresco – peso seco) de las cepas fúngicas ensayadas durante su cultivo por 20 días en AMI + P.

En la Tabla 2, se observa que las cepas fúngicas del suelo Catalina Sur (no contaminado y contaminado con petróleo, a las profundidades 0-20 y 20-40 cm) cultivadas en AEM al 2% formaron colonias cuyo máximo diámetro fue de 7,0 cm y cuyo mínimo diámetro fue de 1,5 cm. También se observa en la Tabla 2, que el máximo tamaño de las colonias fúngicas alcanzadas en AMI + P fue de 7,0 cm, y que tres cepas (C15, C16 y C21) de las 80 aisladas de este suelo no crecieron en el AMI + P. Por otra parte, al relacionar el diámetro de las colonias en AMI + P, de acuerdo a la profundidad de la muestra de suelo que fueron obtenidas las cepas y el grado de contaminación del suelo con petróleo (contaminado y no contaminado), como se deduce en la Tabla 2, un mayor número (14 cepas) del suelo Catalina Sur contaminado con petróleo profundidades 0-20 y 20 40 cm presentaron un diámetro de colonia menor tras su cultivo en AMI + P en comparación a este mismo parámetro evaluado en AEM 2%, por el contrario un mayor número de cepas del suelo Catalina Sur no contaminado con petróleo (profundidad 0-20 cm, 10 cepas fúngicas y profundidad 20-40 cm, 9 cepas fúngicas) presentando un diámetro de colonia mayor en AMI + P en comparación a este mismo parámetro evaluado en AEM al 2%. El resto de las cepas fúngicas ensayadas presentaron un diámetro de colonia igual en AMI+P y AEM 2%.

En lo que respecta al peso micelial de las colonias fúngicas tras su cultivo en AMI + P como se observa en la Tabla 2, el mayor peso micelial (0,38 g) lo registró la cepa Cc 410 aislada de las muestras de suelo de 20-40 cm de profundidad del suelo Catalina Sur contaminada con petróleo. Por su parte, las cepas C15, C16 y C21 no registraron un incremento del peso micelial. Por último, si se relaciona el peso micelial de las colonias fúngicas tras un cultivo en AMI + P, de acuerdo a la profundidad del suelo del cual fueron aisladas y del grado de contaminación del suelo con petróleo; como se deduce de la Tabla 2, para las cepas aisladas desde 0-20 cm, un mayor número de ellas (3 cepas) del suelo Catalina Sur no contaminado y una cepa del suelo contaminado con petróleo registraron un peso micelial mayor a 0,30 g y 6 cepas registraron un peso micelial menor a 0.10 g, (3 cepas del suelo Catalina Sur no contaminado y 3 cepas del suelo Catalina Sur contaminado con petróleo). Por otra parte para las cepas aisladas desde la profundidad 20-40 cm, una cepa fúngica del suelo Catalina Sur no contaminado y dos cepas del suelo contaminado con petróleo presentaron un peso micelial mayor a 0,30 g y no se registraron cepas con peso micelial menor a 0,10 g tanto el suelo no contaminado y contaminado con petróleo.

En la Tabla 3, se observa que las cepas fúngicas del suelo Clarencia (no contaminado y contaminado con petróleo, a las profundidades 0-20 y 20-40 cm) cultivadas en AEM al 2% formaron colonias cuyo máximo diámetro fue de 7,0 cm y cuyo mínimo diámetro fue de 1,5 cm. También se observa en la Tabla 3, que el máximo

tamaño de las colonias fúngicas alcanzado en AMI+P fue de 7,0 cm y el menor diámetro de colonia corresponde a 1,0 g. Por otra parte, al relacionar el diámetro de las colonias en AMI + P, de acuerdo a la profundidad de la muestra de suelo que fueron obtenidas las cepas ensayadas y el grado de contaminación del suelo con petróleo (contaminado y no contaminado), como se deduce en la Tabla 3, un mayor número de cepas (7) del suelo Clarencia contaminado con petróleo (profundidades 0-20 cm y 20-40 cm) presentó un diámetro de colonia menor vía su cultivo en AMI+P en comparación a este mismo parámetro evaluado en AEM 2%, y por el contrario un mayor número de cepas del suelo Clarencia no contaminado con petróleo (profundidad 0-20 cm, 10 cepa fúngica y profundidad 20-40 cm, 11 cepas fúngicas) presentó un diámetro en la colonia mayor tras su cultivo en AMI + P en comparación a este mismo parámetro evaluado en AEM 2%. El resto de las cepas fúngicas presentaron un diámetro de colonia igual en AMI+P y AEM 2%.

En lo que respecta al peso micelial de las colonias fúngicas tras su cultivo en AMI + P como se observa en la Tabla 3, el mayor peso micelial (0.33 g) lo registró la cepa D68 aislada de las muestras de suelo de 0-20 cm de profundidad del suelo Clarencia no contaminada con petróleo. Por su parte, la cepa D58 registró el menor peso micelial (0.01 g). Por último, si se relaciona el peso micelial de las colonias fúngicas tras su cultivo en AMI + P, de acuerdo a la profundidad del suelo del cual fueron aisladas las cepas y del grado de contaminación del suelo con petróleo; como se deduce de la Tabla 3, para las cepas aislados desde 0-20 cm, una cepa fúngica del suelo Clarencia no contaminado registró un peso micelial mayor a 0,30 g, por el contrario, en el suelo contaminado con petróleo a la misma profundidad no se registraron cepas con peso micelial mayor a 0,30 g, y 7 cepas registraron un peso micelial menor a 0,10 g (6 cepas del suelo Clarencia no contaminado con petróleo y una cepa del suelo contaminado con petróleo). En el mismo suelo no contaminado y contaminado con petróleo a la profundidad 20-40 cm, no se registraron cepas con peso micelial mayor a 3,0 g, y solo 3 cepas del suelo contaminado con petróleo registraron un peso micelial menor a 0,10 g.

En la Tabla 4, se observa que las cepas fúngicas del suelo Posesión (no contaminado y contaminado con petróleo, a las profundidades 0-20 y 20-40 cm) cultivadas en AEM al 2% formaron colonias cuyo máximo diámetro fue de 7,0 cm y cuyo mínimo diámetro fue de 2,5 cm. También se observa en la Tabla 4, que el máximo tamaño de las colonias fúngicas alcanzadas en AMI + P fue de 7,0 cm, y que la cepa P98 de las 80 aisladas de este suelo no creció en el AMI + P. Por otra parte, al relacionar el diámetro de las colonias en AMI + P, de acuerdo a la profundidad de la muestra de suelo que fueron obtenidas las cepas ensayadas y el grado de contaminación del suelo con petróleo (contaminado y no contaminado), como se deduce en la Tabla 4, un mayor número de cepas fúngicas (11 cepas) del suelo Posesión contaminado con petróleo (profundidad 0-20 y 20-40 cm) presentaron un diámetro de colonia menor después de su cultivo en AMI+P en comparación a este mismo parámetro evaluado en AEM 2% y por el contrario un mayor número de cepas del suelo Posesión no contaminado con petróleo (profundidad 0-20 cm, 5 cepas fúngicas y profundidad 20-40 cm, 6 cepas fúngicas) presentaron un diámetro de colonia mayor tras su cultivo en AMI + P en comparación a este mismo parámetro evaluado en AEM 2%. El resto de las cepas fúngicas presentaron

un diámetro de colonia igual en AMI+P y AEM 2%.

En lo que respecta al peso micelial de las colonias fúngicas después de su cultivo en AMI + P como se observa en la Tabla 4, el mayor peso micelial (0.43 g) lo registró la cepa Pp309 aislada de la muestra de suelo de 20-40 cm de profundidad del suelo Posesión contaminada con petróleo. Por su parte, la cepa P98 no registró incremento del peso micelial. Por último, si se relaciona el peso micelial de las colonias fúngicas tras un cultivo en AMI + P, de acuerdo a la profundidad del suelo del cual fueron aisladas las cepas ensayadas y del grado de contaminación del suelo con petróleo; como se deduce de la Tabla 4, para las cepas aisladas desde 0-20 cm de profundidad, dos cepas fúngicas del suelo Posesión no contaminado con petróleo registró un peso micelial mayor a 0,30 g, 3 cepas registraron un peso micelial menor a 0,10 g (una cepa del suelo Posesión no contaminado con petróleo y dos cepas del suelo Posesión contaminado con petróleo). Por otra parte para las cepas aisladas desde 20-40 cm de profundidad, 5 cepas fúngicas del suelo Posesión del suelo contaminado y 4 cepas del suelo contaminado con petróleo registraron un peso micelial mayor a 0,30 g y dos cepas registraron un peso micelial menor a 0.10 g, correspondiente a suelo no contaminado y contaminado con petróleo.

**“Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados con hidrocarburos”**

Región cepas	Suelo Catalina Sur no contaminado			Suelo Catalina Sur contaminado con petróleo			
	AEM	AMI	AMI+P	Región cepas	AMI	AMI+P	AMI+P
Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)
Ca100	3,0	3,0	3,0	10-20 (Ca100)	3,0	3,0	3,0
Ca101	1,0	1,0	1,0	Ca101	1,0	1,0	1,0
Ca102	3,0	3,0	3,0	Ca102	3,0	3,0	3,0
Ca103	1,0	1,0	1,0	Ca103	1,0	1,0	1,0
Ca104	1,0	1,0	1,0	Ca104	1,0	1,0	1,0
Ca105	1,0	1,0	1,0	Ca105	1,0	1,0	1,0
Ca106	1,0	1,0	1,0	Ca106	1,0	1,0	1,0
Ca107	1,0	1,0	1,0	Ca107	1,0	1,0	1,0
Ca108	1,0	1,0	1,0	Ca108	1,0	1,0	1,0
Ca109	1,0	1,0	1,0	Ca109	1,0	1,0	1,0
Ca110	1,0	1,0	1,0	Ca110	1,0	1,0	1,0
Ca111	1,0	1,0	1,0	Ca111	1,0	1,0	1,0
Ca112	1,0	1,0	1,0	Ca112	1,0	1,0	1,0
Ca113	1,0	1,0	1,0	Ca113	1,0	1,0	1,0
Ca114	1,0	1,0	1,0	Ca114	1,0	1,0	1,0
Ca115	1,0	1,0	1,0	Ca115	1,0	1,0	1,0
Ca116	1,0	1,0	1,0	Ca116	1,0	1,0	1,0
Ca117	1,0	1,0	1,0	Ca117	1,0	1,0	1,0
Ca118	1,0	1,0	1,0	Ca118	1,0	1,0	1,0
Ca119	1,0	1,0	1,0	Ca119	1,0	1,0	1,0
Ca120	1,0	1,0	1,0	Ca120	1,0	1,0	1,0
Ca121	1,0	1,0	1,0	Ca121	1,0	1,0	1,0
Ca122	1,0	1,0	1,0	Ca122	1,0	1,0	1,0
Ca123	1,0	1,0	1,0	Ca123	1,0	1,0	1,0
Ca124	1,0	1,0	1,0	Ca124	1,0	1,0	1,0
Ca125	1,0	1,0	1,0	Ca125	1,0	1,0	1,0
Ca126	1,0	1,0	1,0	Ca126	1,0	1,0	1,0
Ca127	1,0	1,0	1,0	Ca127	1,0	1,0	1,0
Ca128	1,0	1,0	1,0	Ca128	1,0	1,0	1,0
Ca129	1,0	1,0	1,0	Ca129	1,0	1,0	1,0
Ca130	1,0	1,0	1,0	Ca130	1,0	1,0	1,0
Ca131	1,0	1,0	1,0	Ca131	1,0	1,0	1,0
Ca132	1,0	1,0	1,0	Ca132	1,0	1,0	1,0
Ca133	1,0	1,0	1,0	Ca133	1,0	1,0	1,0
Ca134	1,0	1,0	1,0	Ca134	1,0	1,0	1,0
Ca135	1,0	1,0	1,0	Ca135	1,0	1,0	1,0
Ca136	1,0	1,0	1,0	Ca136	1,0	1,0	1,0
Ca137	1,0	1,0	1,0	Ca137	1,0	1,0	1,0
Ca138	1,0	1,0	1,0	Ca138	1,0	1,0	1,0
Ca139	1,0	1,0	1,0	Ca139	1,0	1,0	1,0
Ca140	1,0	1,0	1,0	Ca140	1,0	1,0	1,0
Ca141	1,0	1,0	1,0	Ca141	1,0	1,0	1,0
Ca142	1,0	1,0	1,0	Ca142	1,0	1,0	1,0
Ca143	1,0	1,0	1,0	Ca143	1,0	1,0	1,0
Ca144	1,0	1,0	1,0	Ca144	1,0	1,0	1,0
Ca145	1,0	1,0	1,0	Ca145	1,0	1,0	1,0
Ca146	1,0	1,0	1,0	Ca146	1,0	1,0	1,0
Ca147	1,0	1,0	1,0	Ca147	1,0	1,0	1,0
Ca148	1,0	1,0	1,0	Ca148	1,0	1,0	1,0
Ca149	1,0	1,0	1,0	Ca149	1,0	1,0	1,0
Ca150	1,0	1,0	1,0	Ca150	1,0	1,0	1,0
Ca151	1,0	1,0	1,0	Ca151	1,0	1,0	1,0
Ca152	1,0	1,0	1,0	Ca152	1,0	1,0	1,0
Ca153	1,0	1,0	1,0	Ca153	1,0	1,0	1,0
Ca154	1,0	1,0	1,0	Ca154	1,0	1,0	1,0
Ca155	1,0	1,0	1,0	Ca155	1,0	1,0	1,0
Ca156	1,0	1,0	1,0	Ca156	1,0	1,0	1,0
Ca157	1,0	1,0	1,0	Ca157	1,0	1,0	1,0
Ca158	1,0	1,0	1,0	Ca158	1,0	1,0	1,0
Ca159	1,0	1,0	1,0	Ca159	1,0	1,0	1,0
Ca160	1,0	1,0	1,0	Ca160	1,0	1,0	1,0
Ca161	1,0	1,0	1,0	Ca161	1,0	1,0	1,0
Ca162	1,0	1,0	1,0	Ca162	1,0	1,0	1,0
Ca163	1,0	1,0	1,0	Ca163	1,0	1,0	1,0
Ca164	1,0	1,0	1,0	Ca164	1,0	1,0	1,0
Ca165	1,0	1,0	1,0	Ca165	1,0	1,0	1,0
Ca166	1,0	1,0	1,0	Ca166	1,0	1,0	1,0
Ca167	1,0	1,0	1,0	Ca167	1,0	1,0	1,0
Ca168	1,0	1,0	1,0	Ca168	1,0	1,0	1,0
Ca169	1,0	1,0	1,0	Ca169	1,0	1,0	1,0
Ca170	1,0	1,0	1,0	Ca170	1,0	1,0	1,0
Ca171	1,0	1,0	1,0	Ca171	1,0	1,0	1,0
Ca172	1,0	1,0	1,0	Ca172	1,0	1,0	1,0
Ca173	1,0	1,0	1,0	Ca173	1,0	1,0	1,0
Ca174	1,0	1,0	1,0	Ca174	1,0	1,0	1,0
Ca175	1,0	1,0	1,0	Ca175	1,0	1,0	1,0
Ca176	1,0	1,0	1,0	Ca176	1,0	1,0	1,0
Ca177	1,0	1,0	1,0	Ca177	1,0	1,0	1,0
Ca178	1,0	1,0	1,0	Ca178	1,0	1,0	1,0
Ca179	1,0	1,0	1,0	Ca179	1,0	1,0	1,0
Ca180	1,0	1,0	1,0	Ca180	1,0	1,0	1,0

**TABLA 2. Tamaño y peso micelial de colonias fúngicas en agar mineral inorgánico más petróleo.**

AEM: agar extracto de malta; AMI+P: agar mineral inorgánico adicionado de petróleo. Para sigla cepas ver Anexo 1, Tabla 1.

Tamaño micelial (µm)	Agar Extracto de malta (AEM)			Agar mineral inorgánico con petróleo (AMI+P)			
	Volumen micelial (µm <sup>3</sup> )	Volumen micelial (%)	Presencia (%)	Volumen micelial (µm <sup>3</sup> )	Volumen micelial (%)	Volumen micelial (µm <sup>3</sup> )	Presencia (%)
10	0.7	2.1	0.15	1.11	3.0	2.1	0.1
12	1	2.9	0.19	1.22	3.0	2.1	0.15
14	1.3	3.8	0.24	1.33	3.0	2.1	0.2
16	1.7	4.8	0.31	1.44	3.0	2.1	0.25
18	2.1	5.9	0.38	1.55	3.0	2.1	0.3
20	2.6	7.1	0.45	1.66	3.0	2.1	0.35
22	3.1	8.3	0.52	1.77	3.0	2.1	0.4
24	3.7	9.6	0.6	1.88	3.0	2.1	0.45
26	4.3	11.0	0.68	1.99	3.0	2.1	0.5
28	5.0	12.5	0.76	2.10	3.0	2.1	0.55
30	5.8	14.1	0.85	2.21	3.0	2.1	0.6
32	6.7	15.8	0.94	2.32	3.0	2.1	0.65
34	7.7	17.6	1.04	2.43	3.0	2.1	0.7
36	8.8	19.5	1.14	2.54	3.0	2.1	0.75
38	10.0	21.5	1.25	2.65	3.0	2.1	0.8
40	11.3	23.6	1.36	2.76	3.0	2.1	0.85
42	12.8	25.8	1.48	2.87	3.0	2.1	0.9
44	14.4	28.2	1.6	2.98	3.0	2.1	0.95
46	16.2	30.7	1.73	3.09	3.0	2.1	1.0
48	18.1	33.4	1.86	3.20	3.0	2.1	1.05
50	20.2	36.2	2.0	3.31	3.0	2.1	1.1
52	22.4	39.2	2.14	3.42	3.0	2.1	1.15
54	24.8	42.3	2.29	3.53	3.0	2.1	1.2
56	27.4	45.6	2.44	3.64	3.0	2.1	1.25
58	30.1	49.1	2.6	3.75	3.0	2.1	1.3
60	33.0	52.7	2.76	3.86	3.0	2.1	1.35
62	36.0	56.5	2.93	3.97	3.0	2.1	1.4
64	39.2	60.5	3.1	4.08	3.0	2.1	1.45
66	42.6	64.7	3.28	4.19	3.0	2.1	1.5
68	46.2	69.1	3.46	4.30	3.0	2.1	1.55
70	50.0	73.7	3.65	4.41	3.0	2.1	1.6
72	54.0	78.5	3.84	4.52	3.0	2.1	1.65
74	58.2	83.5	4.04	4.63	3.0	2.1	1.7
76	62.6	88.7	4.24	4.74	3.0	2.1	1.75
78	67.2	94.1	4.45	4.85	3.0	2.1	1.8
80	72.0	99.7	4.66	4.96	3.0	2.1	1.85
82	77.0	105.5	4.88	5.07	3.0	2.1	1.9
84	82.2	111.6	5.1	5.18	3.0	2.1	1.95
86	87.6	117.9	5.33	5.29	3.0	2.1	2.0
88	93.2	124.4	5.56	5.40	3.0	2.1	2.05
90	99.0	131.1	5.8	5.51	3.0	2.1	2.1
92	105.0	138.0	6.04	5.62	3.0	2.1	2.15
94	111.2	145.1	6.29	5.73	3.0	2.1	2.2
96	117.6	152.4	6.54	5.84	3.0	2.1	2.25
98	124.2	160.0	6.8	5.95	3.0	2.1	2.3
100	131.0	167.7	7.06	6.06	3.0	2.1	2.35

TABLA 3. Tamaño y peso micelial de colonias fúngicas en agar mineral inorgánico más petróleo.

AEM: agar extracto de malta; AMI+P: agar mineral inorgánico adicionado de petróleo. Para sigla cepas ver Anexo 1, Tabla 1.

“Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados con hidrocarburos”

Sigla cepa	Agar Extracto de malta			Agar Extracto de malta con petróleo			
	Diámetro (µm)	Diámetro (µm)	Peso micelial (µg)	Diámetro (µm)	Diámetro (µm)	Diámetro (µm)	Peso micelial (µg)
P100	70	70	0,12	P3	5,1	7,0	1,12
P101	70	70	0,22	P32	5,1	6,8	1,12
P102	70	70	0,20	P33	5,1	6,7	1,14
P103	70	70	0,20	P34	5,1	7,0	1,12
P104	70	70	0,15	P35	5,1	6,8	1,12
P105	1,6	1,1	0,15	P36	5,1	7,0	1,12
P106	70	70	0,15	P37	4,1	6,2	1,12
P107	70	70	0,22	P38	4,1	7,0	1,12
P108	70	7,2	0,15	P39	2,2	7,0	1,12
P109	70	7,1	0,20	P40	4,1	7,0	1,12
P110	70	7,1	0,14	P41	2	7,2	1,22
P111	70	7,3	0,15	P42	4,1	7,3	1,21
P112	70	6,2	0,1	P43	2,2	6,3	1,22
P113	70	6,2	0,15	P44	4,1	7,0	1,14
P114	1,0	7,2	0,15	P45	2,2	6,2	1,12
P115	6,2	7,2	0,1	P46	2,2	2,0	1,12
P116	70	7,3	0,15	P47	2,7	6,7	1,12
P117	70	7,3	0,15	P48	2,1	7	0
P118	1,5	5,2	0,12	P49	1,1	7,0	1,12
P119	6,2	7,2	0,12	P50	7,2	7,0	1,12
P200	70	7,2	0,25	Pp200	2,2	7,2	1,22
P201	7	2,3	0,1	Pp201	1,1	5,8	1,22
P202	1,5	5,3	0,12	Pp202	1,1	7,0	1,14
P203	1,5	2,3	0,12	Pp203	2,1	6,3	1,22
P204	70	7,2	0,20	Pp204	2,2	2,8	1,22
P205	1,2	6,2	0,1	Pp205	2,2	5,2	1,12
P206	3,6	2,3	0,12	Pp206	2,2	6,0	1,22
P207	2,6	1,5	0,21	Pp207	2,2	7,0	1,12
P208	70	6,2	0,15	Pp208	1,1	7,0	1,12
P209	70	7,3	0,15	Pp209	2,2	1,1	1,12
P210	70	5,2	0,1	Pp210	4,1	6,0	1,22
P211	70	7,3	0,12	Pp211	2,1	4,8	1,21
P212	70	7,3	0,15	Pp212	4,1	2,6	1,22
P213	70	6,2	0,14	Pp213	4,2	3,6	1,24
P214	60	7,3	0,11	Pp214	2,2	2,0	1,22
P215	60	7,3	0,12	Pp215	1,1	7,0	1,12
P216	4,6	7,1	0,14	Pp216	4,2	6,0	1,2
P217	1,0	7,3	0,14	Pp217	2,2	3,7	1,12
P218	70	7,3	0,15	Pp218	2,2	6,8	1,12
P219	70	7,3	0,22	Pp219	4,2	7,0	1,21

TABLA 4. Tamaño y peso micelial de colonias fúngicas en agar mineral inorgánico más petróleo. AEM: agar extracto de malta; AMI+P: agar mineral inorgánico adicionado de petróleo. Para sigla cepas ver Anexo 1, Tabla 1.

En la Tabla 5, se indican las cepas fúngicas seleccionadas para el ensayo en caldo mineral inorgánico mas petróleo, teniendo como criterios el diámetro y peso micelial de la colonia en AMI+P.

Sigla cepas	Colonias A.M.U. - P (cm)	Peso Micelial (g)
C05	7,0	0,37
C14	7,0	0,29
C34	4,5	0,51
C38	7,0	0,35
Cc400	8,0	0,21
Cc410	5,0	0,38
Cc420	7,0	0,19
Cc427	6,3	0,30
D38	7,0	0,28
D39	5,0	0,28
D67	6,7	0,14
D70	5,6	0,29
D4202	7,0	0,19
D4215	7,0	0,23
D4375	7,0	0,20
F4034	7,0	0,25
P90	7,0	0,18
P92	3,5	0,31
P107	7,0	0,40
P110	7,0	0,30
Pp303	8,5	0,29
Pp310	6,0	0,27
Tp300	7,0	0,38
Tp337	7,0	0,30

*TABLA 5. Cepas fúngicas seleccionadas para cultivo en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo crudo (Para sigla cepas ver Anexo 1, Tabla 1).*

### **4.3. Peso micelial de las cepas fúngicas seleccionadas después de su cultivo en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo.**

En la Figura 5, se muestra el gráfico de los pesos miceliales de las 24 cepas fúngicas luego de su cultivo por 18 días en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo. (Sigla taxa y datos numéricos ver Anexo 1, Tabla 1 y 3).

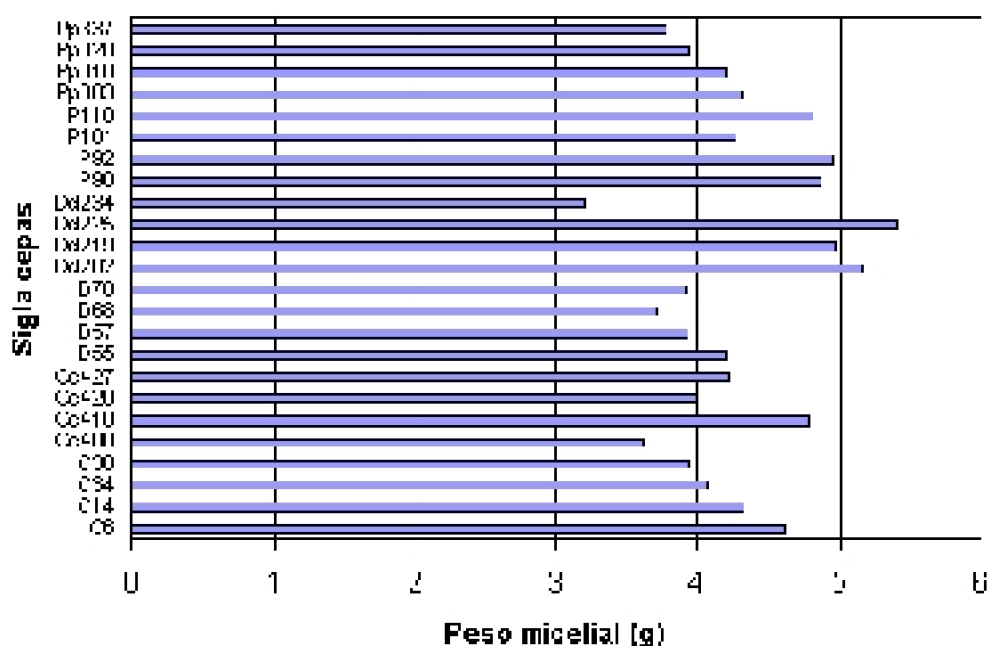


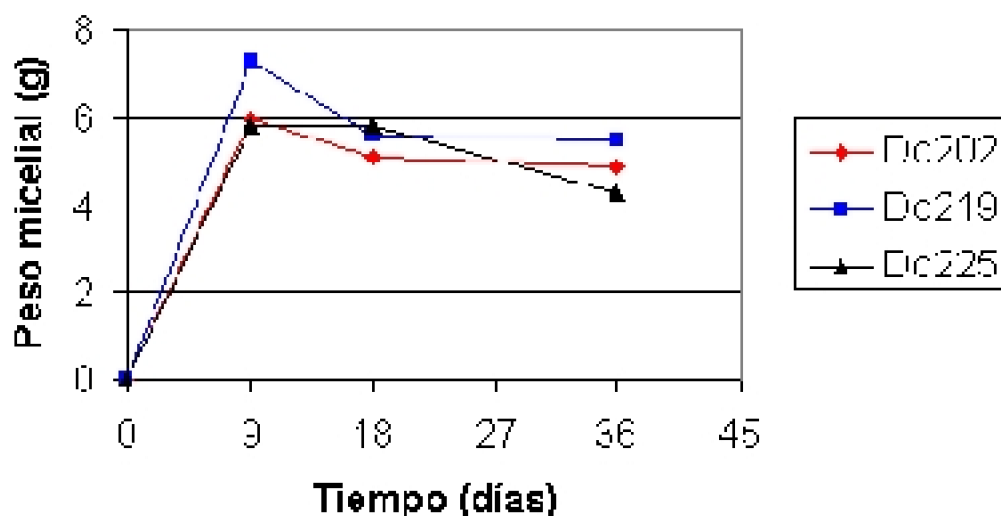
FIGURA 5. Peso micelial de cepas fúngicas ensayadas en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo.

Como se observa en la Figura 5, el mayor peso micelial corresponde a la cepa Dd225 con (5,41g) y el menor peso micelial la cepa Dd234 con (3,21 g). De las 24 cepas ensayadas (15 cepas) registraron peso micelial mayor a 4,0 g. De estas cepas fúngicas se seleccionaron 3 (Dd202, Dd219 y Dd225) de acuerdo al mayor peso micelial para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo. Las cepas fúngicas seleccionadas pertenecen a las muestras de suelo Clarencia de la profundidad 20-40 cm, correspondiendo la cepa Dd219 con 4,98 g a *Mortierella sp.* (suelo contaminado con petróleo); Dd225 con 5,41 g a *Penicillium sp.* (suelo no contaminado) y la cepa Dd202 con 5,16 g perteneciente a *Mortierella sp.* (suelo contaminado con petróleo).

#### 4.4. Cinética degradativa de petróleo crudo adicionado en caldo mineral inorgánico por tres cepas fúngicas seleccionadas.

La Figura 6, muestra el grafico de los pesos miceliales de las tres cepas fúngicas seleccionadas para la cinética degradativa de petróleo crudo a lo largo del tiempo. (Datos numéricos Anexo1, Tabla 4).





*FIGURA 6. Peso micelial de tres cepas fúngicas ensayadas en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo crudo, a través del tiempo.*

Como se observa en la Figura 6, las tres cepas fúngicas muestran un incremento de peso micelial a los nueve días de cultivo en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo, (las cepas Dd202 con 6,00 g; Dd219 con 7,3 g y Dd225 con 5,8 g) siendo la cepa Dd219 la que presenta mayor peso micelial. Luego, al día 18 se determinó un menor peso micelial para las cepas Dd202 (5,1 g) y Dd219 (5,6 g) en comparación al día nueve de incubación. En tanto la cepa Dd225 al día 18 registró un peso micelial de 5,8 g igual al del día 9. Al final del experimento (36 días) todas la cepas presentan un descenso en el peso micelial comparado con el periodo anterior, Dd202 (4,9 g) y Dd219 (5,5 g), siendo la cepa Dd225 (4,3 g) la que registró el menor peso micelial en relación con las otras dos cepas en estudio.

#### **4.5. Determinación de fracciones del petróleo por espectrofotometría infrarroja tras la cinética degradativa con tres cepas fúngicas seleccionadas.**

Las cepas seleccionadas Dd202, Dd219 y Dd225 fueron ensayadas en caldo mineral inorgánico más petróleo a los 0, 9, 18 y 36 días, los filtrados de los cultivos fueron analizados por espectrofotometría infrarroja, lo que arrojó las fracciones degradadas de los compuestos del petróleo.

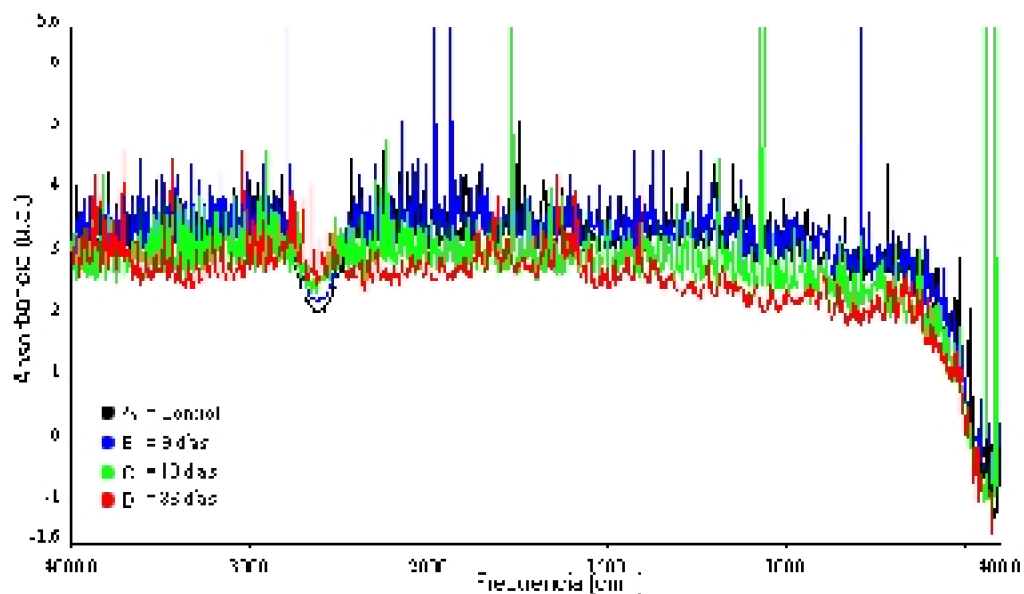


FIGURA 7. Espectro infrarrojo de petróleo crudo degradados por la cepa Dd202 (*Mortierella sp.*) adicionado a caldo mineral inorgánico.

En la Fig. 7, se observan los espectros de absorbancia para petróleo crudo (A), y para las fracciones remanentes del petróleo luego del cultivo con la cepa Dd202 a los 9 (B), 18 (C) y 36 días de incubación. Se puede apreciar en el espectro del petróleo que presentó degradación parcial en los intervalos de tiempo (9, 18 y 36 días). En el día 9 se observa que fracciones de petróleo fueron degradadas, formando picos que indican la degradación de ciertas fracciones generando otros constituyentes, los picos corresponden a las frecuencias  $2800\text{ cm}^{-1}$  (aldehídos);  $1990\text{ cm}^{-1}$  y  $1950\text{ cm}^{-1}$  (aromáticos); y  $750\text{ cm}^{-1}$  enlaces C-Cl; En el día 18, se observa que siguen disminuyendo las fracciones formándose nuevamente picos en las fracciones  $1250\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a anhídridos y a la frecuencia  $1050\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a enlaces C-O, C-N y C-Cl. Al día 36 la degradación sigue ocurriendo sin la formación de otros constituyentes.

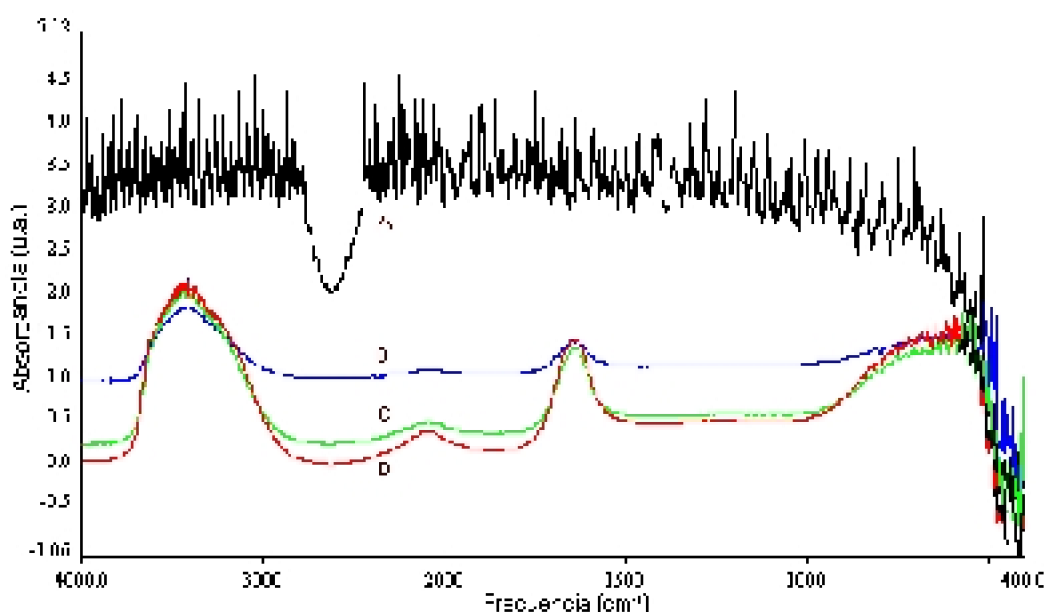


FIGURA 8. Espectro infrarrojo de petróleo crudo degradado por la cepa Dd219 (*Mortierella sp.*) adicionado a caldo mineral inorgánico.

En la Fig. 8, se observan los espectros de absorbancia para petróleo crudo (A), y para las fracciones remanentes del petróleo luego del cultivo con la cepa Dd219 a los 9 (B), 18 (C) y 36 (D) días de incubación. En el día 9 de incubación se puede apreciar una degradación parcial de prácticamente todos los componentes del petróleo crudo, siendo las fracciones más degradadas correspondientes a las frecuencias entre  $2800\text{ cm}^{-1}$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a grupos aldehídos y compuestos nitrogenados; y las fracciones de hidrocarburos correspondientes a las frecuencias desde  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a compuestos alcanos saturados, siendo los posibles compuestos pertenecientes a (metano, etano, propano, butano) entre otros compuestos, alcanos insaturados, que podrían pertenecer a los grupos (etileno, propileno, 1-buteno) entre otros, alquilos, compuestos nitrogenados y otros compuestos con enlaces C-O, C-N y C-Cl. Por el contrario las fracciones de petróleo que fueron degradadas en menor proporción corresponden a las frecuencias entre  $3700\text{ cm}^{-1}$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  (pertenecientes a los grupos aminas, alcoholes, alcanos saturados e insaturados, alquilos y fenoles; y a las frecuencias desde  $1750\text{ cm}^{-1}$  a  $1560\text{ cm}^{-1}$  (correspondientes a los grupos amidas, alcanos insaturados, aldehídos, cetonas y ésteres); y en las frecuencias desde  $800\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  pertenecientes a arilo disulfuro (S-S), y disulfuro (C-S y S-S). En los días 18 y 36 la degradación de petróleo para las fracciones más degradadas, presentó la misma tendencia en comparación con el día 9 de incubación y para las fracciones de petróleo menos degradadas, casi no presentaron variación con el día 9.

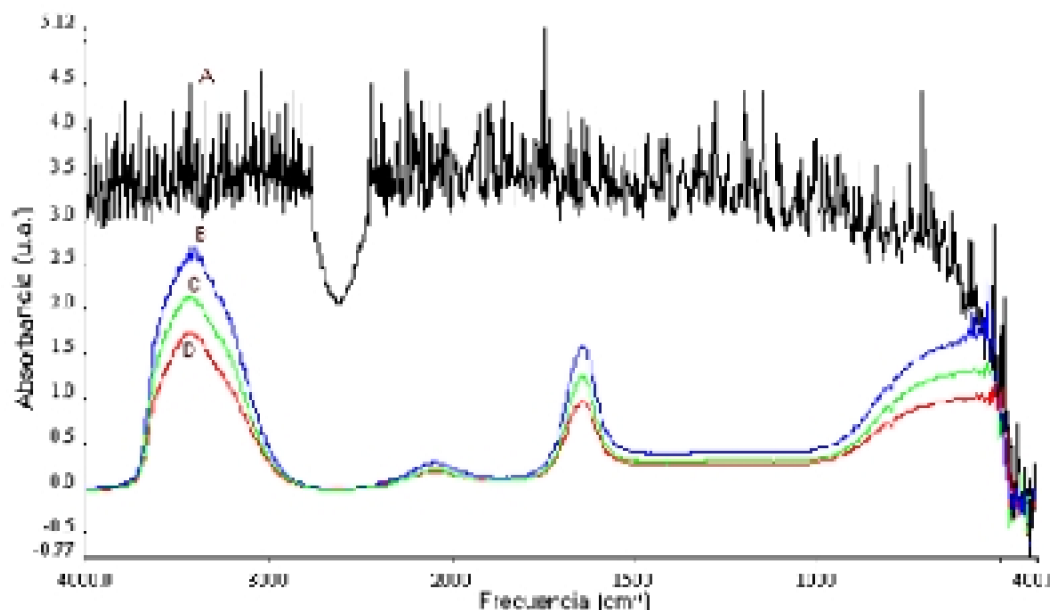


FIGURA 9. Espectro infrarrojo de petróleo crudo degradados por la cepa Dd225 (*Penicillium sp*) adicionado a caldo mineral inorgánico.

En la Fig. 9, se observan los espectros de absorbancia para petróleo crudo (A), y para las fracciones remanentes del petróleo luego del cultivo con la cepa Dd225 a los 9 (B), 18 (C) y 36 (D) días de incubación. En el día 9 se aprecia una degradación total de las fracciones de las frecuencias entre 2800  $\text{cm}^{-1}$  y 2400  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a grupos aldehídos. También se observa una degradación parcial de prácticamente todos los constituyentes del petróleo crudo, siendo las fracciones más degradadas las de las frecuencias entre 1900  $\text{cm}^{-1}$  y 1800  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos anhídridos; y las fracciones de hidrocarburos correspondientes a las frecuencias desde 1500  $\text{cm}^{-1}$  a 1000  $\text{cm}^{-1}$  donde se encuentran los grupos alcanos saturados e insaturados, alquilos, compuestos nitrogenados y enlaces C-O, C-N y C-Cl. Por el contrario las fracciones que fueron degradadas en menor proporción corresponden a las frecuencias entre 3700  $\text{cm}^{-1}$  y 2850  $\text{cm}^{-1}$  pertenecientes a los grupos aminos, alcoholes, alcanos saturados e insaturados, alquilos y fenoles; a las frecuencias desde 2300  $\text{cm}^{-1}$  a 1950  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a grupos alquinos y compuestos nitrogenados, a las frecuencias entre 1750  $\text{cm}^{-1}$  y 1560  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos aldehídos, cetonas y esterés; y a las frecuencias desde 800  $\text{cm}^{-1}$  a 500  $\text{cm}^{-1}$  pertenecientes a arilo disulfuro (S-S), y disulfuro (C-S y S-S). Por el contrario, las absorbancia de las fracciones menos degradadas continúan disminuyendo en menor proporción a los días 18 y 36.

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos la cepa Dd225 (*Penicillium sp.*) sería la que degrada una gran variedad de los constituyentes del petróleo, independiente al día de incubación y a la inversa la cepa Dd202 (*Mortierella sp.*) degradó una menor variedad de los constituyentes del petróleo independiente del tiempo de incubación.

## 5. DISCUSION

### 5.1. Aislamiento de cepas fúngicas aisladas de suelo contaminado y no contaminado con petróleo crudo de la XII Región de Chile.

Según Lemos *et al.* (2002) en suelos de Brasil (Guararema) contaminados accidentalmente con petróleo se aislaron hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, y *Fusarium*. Por otra parte, Radwan *et al.* (1995) encontraron en un sembradío de tomates a nivel de la rizósfera contaminada con petróleo hongos de los géneros *Penicillium* y *Fusarium*. Por su parte, April *et al.* (2000) desde pastos de suelos contaminados con petróleo en el oriente y suroeste de Canadá, aislaron en un medio mineral sólido, con petróleo como fuente de carbono, los hongos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Trichoderma* y *Ulocladium*. Por último, Rivera-Cruz *et al.* (2002) aislaron de la rizósfera del pasto *Echinochloa polystacha* en suelo con derrame reciente de petróleo y del pasto *Paspalum virgatum* en Gleysol con derrame crónico hongos pertenecientes a *Trichoderma*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Paecilomyces*. Los resultados del presente estudio coinciden con los de los autores anteriormente señalados, pues en la presente investigación desde las muestras de suelo contaminado con petróleo crudo, se aislaron e identificaron en parte cepas de hongos de los géneros

citados, coincidiendo los de los géneros *Aspergillus*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor* y *Penicillium*. Los géneros *Beauveria*, *Trichoderma* y *Mucor* fueron aislados desde suelos no contaminados con petróleo.

En el presente trabajo se aislaron cepas de los géneros de hongos *Cunninghamella* y *Walemia*, no descritos anteriormente en suelos contaminados con petróleo. El resto de las cepas del presente estudio fueron aisladas tanto de suelos no contaminados y contaminados con petróleo.

## **5.2. Determinación del crecimiento de cepas fúngicas en agar y caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo.**

En el presente estudio en una primera etapa se ensayaron las 240 cepas fúngicas aisladas desde suelos no contaminados y contaminados con petróleo crudo, en un agar mineral inorgánico adicionado de petróleo al 1% (AMI+P), de acuerdo a los resultados del ensayo anterior, se seleccionaron 24 cepas fúngicas teniendo como parámetro de selección el diámetro de las colonias alcanzadas en el medio AMI+P. Las 24 cepas seleccionadas fueron cultivadas en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo al 1% (CMI+P), permitiendo seleccionar 3 cepas fúngicas para realizar la cinética degradativa del petróleo crudo.

Rivera-Cruz *et al.* (2002) ensayaron el cultivo de 46 hongos en un medio de cultivo sólido enriquecido con petróleo al 1%, estos autores señalan que 20 hongos de los 46 ensayados (42 %) crecieron en el sustrato utilizado. También estos autores indican que crecieron 15 hongos de los 46 cultivados en medio líquido con petróleo al 1%. Estos resultados concuerdan con los del presente estudio pues de las 240 cepas ensayadas en AMI+P, solo 4 cepas fúngicas no crecieron y en el ensayo en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo al 1%, crecieron todas la cepas (24) en estudio.

Madigan *et al.* (1999) señala que el petróleo es una rica fuente de materia orgánica, y los hidrocarburos que contienen son fácilmente atacables por diferentes microorganismos en condiciones aeróbicas. En cuanto a los hongos que en el presente estudio no crecieron en el medio AMI+P, esto podría explicarse por que las cepas ensayadas no poseen las enzimas para degradar los constituyentes del petróleo. Por su parte, Baldrían & Gabriel (1997) y Mandal *et al.* (1998) señalan que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) a menudo están acompañados de la presencia de altas cantidades de metales pesados como cadmio, cobre o mercurio, que se saben que son tóxicos para los hongos que producen pudrición blanda y para la microflora del suelo.

## **5.3. Determinación de fracciones del petróleo tras su**

---

## tratamiento con cepas fúngicas seleccionadas determinadas por espectrofotometría infrarroja y su relación con el peso micelial.

Según Colwell & Walker (1977) los hidrocarburos del petróleo están constituidos principalmente por grupos saturados (metano, etano, butano, propano, etc), aromáticos (benceno, tolueno, bifenilo, naftaleno), asfáltenos (fenoles, cetonas, esterres y porfirinas) y resinas (piridinas, quinolonas, carbazoles, sulfoxidos, y amidas). De los compuestos señalados Pinieta-Flores & Mesta-Howard (2001) indican que los asfáltenos son uno de los más difíciles de degradar por su estructura molecular extremadamente compleja, los cuales presentan distintas proporciones de N, S y O. Siendo el tiempo de eliminación de los asfáltenos desde una semana para las estructuras más simples, hasta 990 días para aquellos con varios anillos aromáticos condensados. Lo que concuerda con las fracciones de los grupos cetonas, fenoles y amidas degradadas en menor proporción por las tres cepas fúngicas ensayadas a través del tiempo.

Abu-Elgheit & Yusef (1980), en un estudio de degradación de petróleo con cepas de *Penicillium* aisladas desde áreas expuestas a contaminación de petróleo en las costas del mediterráneo, determinaron que al octavo día de tratamiento del petróleo las cepas de *Penicillium* habían degradado hidrocarburos parafínicos y aromáticos. En otros estudios de degradación de petróleo Oudot *et al.* (1993) determinaron que *Penicillium janthinellum* tiene la capacidad de degradar fracciones de alifáticos y aromáticos, y catabolizando parcialmente fracciones de resinas del petróleo crudo. Launen *et al.* (1995) y Kiehlmann *et al.* (1996) reportaron que *Penicillium janthinellum*, *Penicillium pinophilum* y *Penicillium thomii* podrían transformar pireno y benzo[a]pireno a fenoles, dioles y quinonas. Esto concuerda con los resultados obtenidos para la cepa Dd225(*Penicillium sp.*) del presente estudio, que degradó, al noveno día de la cinética fracciones de hidrocarburos, compuestos aromáticos, aminos y alquilos, entre otros. Por otra parte, en el presente estudio se determinó que las cepas Dd202 y Dd219 que pertenecen al género *Mortierella sp.* presentaron igual capacidad para degradar los constituyentes del petróleo que la cepa Dd225, en la literatura consultada no se encontraron antecedentes de especies de *Mortierella* que degraden fracciones específicas de petróleo crudo. Pero Alexander (1994) señala que la mayoría de las especies de *Mortierella* son humíferas y presentan una gran capacidad para degradar los constituyentes aromáticos que forman parte del humus.

En el presente estudio las cepas seleccionadas Dd202 y Dd219 para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo, presentaron un peso micelial fúngico mayor a los nueve días de incubación y un descenso a los días 18 y 36 de incubación. De acuerdo a Alexander, (1994) algunas especies de hongos incrementan rápidamente su micelio después de agregar la fuente de carbono, pero disminuyen su crecimiento poco tiempo después del incremento inicial; debido a la mayor disponibilidad de sustratos carbonados oxidados.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las cepas aisladas y ensayadas, la hipótesis del presente estudio se acepta como está formulada.





## 6. CONCLUSIONES

De los suelos de la XII Región de Chile contaminado con petróleo se aisló un número mayor de taxa fúngicas (13 cepas) que de estos mismos suelos no contaminados con petróleo crudo (11 cepas).

De las 240 cepas fúngicas ensayadas en agar mineral inorgánico adicionado de petróleo crudo al 1% solo 4 cepas no crecieron y de las 24 cepas fúngicas que fueron seleccionadas para ser ensayadas en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo crudo al 1% todas crecieron.

Las tres cepas seleccionadas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo, degradaron primordialmente las fracciones de los compuestos cuyas frecuencias se encuentran entre  $2850\text{ cm}^{-1}$  a  $1800\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a aldehídos, alquinos, y anhídridos; y las fracciones del petróleo cuyas frecuencias se encuentran entre  $1510\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a alcanos (saturados e insaturados), aromáticos y grupos alquilos.

De acuerdo al peso micelial obtenido de la cinética degradativa del petróleo, no se estableció una relación entre el peso micelial fúngico con la degradación de las fracciones del petróleo.



---

## BIBLIOGRAFIA

- Abu-Elgheit, M. & Yusef, H. (1980). Isolation of hydrocarbon-degrading microorganisms in mediterranean waters. *Environment International*. 4: 417-420.
- Ainsworth, G. & Bisby S. (1995). *Dictionary of the fungi*. Octava edición. 616 p.
- Alexander, M. (1994). *Introducción a la Microbiología del Suelo*. Segunda edición. Reimp. Agt Editor, S.A. México, D.F. 491 p.
- April, T., Foght, J & Currah, R. (2000). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. Microbiol.* 46: 38-49.
- Atlas, R. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon: An environmental perspective. *Microbial. Rev.* 45: 180-20.
- Atlas, R., Horowitz, A., Krichevky, M. & Bej, K. (1991). Response of microbial population of environmental disturbance. *Microbiol. Ecol.* 22: 249-256.
- Baldrían, P. & Gabriel, J. (1997). Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes. *Folia Microbiol.* 42:521-523.
- Boddenec, G., Desmarquest, P., Jensen, B. & Kantin, R. (1987). Evolution of hydrocarbons an the activity of bacteria in marine sediments contaninated with discharge of petroleum. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 29: 153-178.
- Booth, C. (1997). *Fusarium*. Surrey: Commonwealth Mycological Institute. 58 p.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F. & Vandecasteele, J. (1996). *Les hydrocarbures*

- aromatiques polycycliques dans l' environnement. Revue de l' Institut français du pétrole. 51: 797-828.
- Colwell, R. & Walker, J. (1977). Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 5:423-445.
- Covacevich, N. & Ruz. E. (1996). Praderas en la zona austral; XII Región (Magallanes). In: *Praderas para Chile*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile, 639 - 655 p.
- Domsch, K., Gams, W. & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi*. Academic press London. 859 p.
- Ellis, M. (1976). *More dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. 507 p.
- Empresa Nacional del Petróleo, ENAP. (2004). [www.ENAP.cl](http://www.ENAP.cl)
- Hou, F., Leung, D., Milke, M. & Macpherson, D. (1999). Improvement in ryegrass seed germination for diesel contaminated soils by PEG treatment technology. *Environmental Technology*. 20:413-418.
- Instituto Mexicano del Petróleo, IMP. (2004). [www.IMP.mx](http://www.IMP.mx)
- Jushasz, A. & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 45: 57-88.
- Kiehlmann, E., Pinto, L. & Moore, M. (1996). The bioremediation of chrysene to trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene by filamentous fungi. *Can. J. Microbiol.* 42:604-608.
- Launen, L., Pinto, L., Wiebe, C., Kiehlmann, E. & Moore, M. (1995). The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Can. J. Microbiol.* 41:477-488.
- Lemos, J., Rizzo, C., Millioli, V., Soriano, U., Sarquis, M. & Santos dos, R. (2002). Petroleum degradation by filamentous fungi. In: *9th Annual International Petroleum Conference*, October 21-25, Novo México, EUA.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (1999). *Brock Biología de los microorganismos*. Octava edición. Prentice may Iberia, Madrid. 1064 p.
- Mandal, T., Baldrían, P., Gabriel, J., Nerud, F. & Zadrazil, F. (1998). Effect of mercury on the growth of wood-rotting basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Serpula lacrymans*. *Chemosphere*. 36:435-440.
- Mesta, A. (1998). Degradación de parafinas. XXXIX Congreso Nacional de Microbiología. Oaxtepec, Mor., Junio. Mexico.
- Munnecke, D. & Huysmans, K. (1998). Fungal composting processes for polyaromatic hydrocarbons. *Annual AAPG Conventions*. Salt Lake City, Utah, USA. 5:17-20.
- Okerentugba, P. & Ezeronye, O. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2 (9): 288-292.
- Oudot, J., Dupont, J., Haloui, S. & Roquebert, M. (1993). Biodegradation potential of hydrocarbon-degrading fungi in tropical soil. *Soil Biol. Biochem.* 25:1167-1173.

- 
- Pineda-Flores, G. & Mesta-Howard, A. (2001). Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 43 (3):143-150.
- Radwan, S., Sorkoh, N. & El-Nemr, I. (1995). Oil biodegradation around roots. *Nature*. London. 376: 302.
- Ramírez, C. (1982). *Manual and atlas of the Penicilia*. Elsevier biochemical press. Amsterdam. 874 p.
- Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Volke H., Rodríguez, R. & Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra* 20: 423-434.
- Rosenberg, E. & Ron, E. (1998). Bioremediation of petroleum contamination. In: R.L. Crawford Y D.L. Crawford edición. *Bioremediation: Principles and applications*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 100-124 pp.
- Saez, C. (1994). Caracterización de la fertilidad de los suelos de la Región de Magallanes. Informe Final. Fundación Fondo Investigaciones Agropecuarias. Universidad de Magallanes, Punta Arenas. Chile. 82 p.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T. & Harayama, S. (1997). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31: 45-51.
- Von Arx., J. (1981). *The genera of fungi sporulating in pure culture*. Tercera edición. J. Cramer, Germany. 424 p.
- Yateem, A., Balba, M. & Al-Wadhi, N. (1998). White rot fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. *Environment International*. 24: 181-187.



# ANEXOS

## **Anexo 1. Tabla de taxa y peso micelial de las cepas fúngicas aisladas desde las localidades de muestreo de la XII Región de Chile.**

Tabla 1. Sigla de cepas fúngicas y su respectiva taxa de acuerdo a las localidades de muestreo de la XII Región de Chile.

**“Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados con hidrocarburos”**

	<b>Suelo Catalina Sur (0-20) cm.</b>		
<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>	<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>
C1	<i>Aspergillus niger</i>	C21	<i>Mortierella</i> sp.
C2	<i>Aspergillus niger</i>	C22	<i>Mortierella</i> sp.
C3	<i>Penicillium</i> sp.	C23	No determinada.
C4	<i>Penicillium</i> sp.	C24	<i>Mortierella</i> sp.
C5	<i>Penicillium</i> sp.	C25	<i>Mortierella</i> sp.
C6	<i>Penicillium</i> sp.	C26	<i>Penicillium</i> sp.
C7	<i>Penicillium</i> sp.	C27	<i>Penicillium</i> sp.
C8	<i>Penicillium</i> sp.	C28	<i>Penicillium</i> sp.
C9	<i>Penicillium</i> sp.	C29	<i>Penicillium</i> sp.
C10	<i>Penicillium</i> sp.	C30	<i>Penicillium</i> sp.
C11	<i>Walemia sebi</i>	C31	<i>Penicillium</i> sp.
C12	<i>Walemia sebi</i>	C32	<i>Penicillium</i> sp.
C13	<i>Walemia sebi</i>	C33	<i>Penicillium</i> sp.
C14	<i>Walemia sebi</i>	C34	<i>Penicillium</i> sp.
C15	No determinada.	C35	<i>Trichoderma</i> sp.
C16	<i>Phoma</i> sp.	C36	<i>Trichoderma</i> sp.
C17	<i>Acremonium</i> sp.	C37	<i>Penicillium</i> sp.
C18	<i>Acremonium</i> sp.	C38	<i>Mortierella</i> sp.
C19	<i>Penicillium</i> sp.	C39	<i>Penicillium</i> sp.
C20	<i>Cunninghamella</i> sp.	C40	<i>Acremonium</i> sp.
	<b>Suelo Catalina Sur (20-40)cm</b>		
<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>	<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>
Cc400	<i>Mortierella</i> sp.	Cc420	<i>Acremonium</i> sp.
Cc401	<i>Mortierella</i> sp.	Cc421	<i>Penicillium</i> sp.
Cc402	<i>Mortierella</i> sp.	Cc422	<i>Penicillium</i> sp.
Cc403	<i>Mortierella</i> sp.	Cc423	<i>Penicillium</i> sp.
Cc404	<i>Mortierella</i> sp.	Cc424	<i>Penicillium</i> sp.
Cc405	<i>Aspergillus niger</i>	Cc425	<i>Penicillium</i> sp.
Cc406	<i>Aspergillus niger</i>	Cc426	<i>Trichoderma</i> sp.
Cc407	<i>Aspergillus niger</i>	Cc427	<i>Mortierella</i> sp.
Cc408	<i>Penicillium</i> sp.	Cc428	<i>Beauveria</i> sp.
Cc409	<i>Penicillium</i> sp.	Cc429	<i>Mortierella</i> sp.
Cc410	<i>Penicillium</i> sp.	Cc430	<i>Pithomyces</i> sp.
Cc411	<i>Penicillium</i> sp.	Cc431	<i>Penicillium</i> sp.
Cc412	<i>Cladosporium</i> sp.	Cc432	<i>Fusarium</i> sp.
Cc413	<i>Penicillium</i> sp.	Cc433	<i>Mortierella</i> sp.
Cc414	<i>Penicillium</i> sp.	Cc434	<i>Mortierella</i> sp.
Cc415	<i>Penicillium</i> sp.	Cc435	<i>Mortierella</i> sp.
Cc416	<i>Penicillium</i> sp.	Cc436	<i>Penicillium</i> sp.
Cc417	<i>Mortierella</i> sp.	Cc437	<i>Penicillium</i> sp.
Cc418	<i>Cladosporium</i> sp.	Cc438	<i>Mortierella</i> sp.
Cc419	<i>Mortierella</i> sp.	Cc439	<i>Mortierella</i> sp.



Continuación Tabla 1.

“Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados con hidrocarburos”

	<b>Suelo Clarencia</b>	<b>(0-20) cm.</b>	
<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>	<b>Siglas cepa</b>	<b>Taxa</b>
D41	<i>Absidia</i> sp.	D61	<i>Penicillium</i> sp.
D42	<i>Absidia</i> sp.	D62	<i>Absidia</i> sp.
D43	<i>Absidia</i> sp.	D63	<i>Penicillium</i> sp.
D44	<i>Absidia</i> sp.	D64	<i>Aspergillus niger</i>
D45	<i>Absidia</i> sp.	D65	<i>Penicillium</i> sp.
D46	<i>Absidia</i> sp.	D66	<i>Mortierella</i> sp.
D47	<i>Absidia</i> sp.	D67	<i>Absidia</i> sp.
D48	<i>Absidia</i> sp.	D68	<i>Penicillium</i> sp.
D49	<i>Absidia</i> sp.	D69	<i>Penicillium</i> sp.
D50	<i>Absidia</i> sp.	D70	<i>Penicillium</i> sp.
D51	<i>Absidia</i> sp.	D71	<i>Penicillium</i> sp.
D52	<i>Absidia</i> sp.	D72	<i>Penicillium</i> sp.
D53	<i>Absidia</i> sp.	D73	<i>Penicillium</i> sp.
D54	<i>Absidia</i> sp.	D74	<i>Absidia</i> sp.
D55	<i>Absidia</i> sp.	D75	<i>Penicillium</i> sp.
D56	<i>Penicillium</i> sp.	D76	<i>Penicillium</i> sp.
D57	<i>Penicillium</i> sp.	D77	<i>Penicillium</i> sp.
D58	<i>Aspergillus niger</i> sp.	D78	<i>Penicillium</i> sp.
D59	<i>Penicillium</i> sp.	D79	<i>Penicillium</i> sp.
D60	<i>Acremonium</i> sp.	D80	<i>Penicillium</i> sp.
	<b>Suelo Clarencia</b>	<b>(20-40) cm.</b>	
<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>	<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>
Dd200	<i>Mortierella</i> sp.	Dd220	<i>Penicillium</i> sp.
Dd201	<i>Mortierella</i> sp.	Dd221	<i>Penicillium</i> sp.
Dd202	<i>Mortierella</i> sp.	Dd222	<i>Penicillium</i> sp.
Dd203	<i>Absidia</i> sp.	Dd223	<i>Penicillium</i> sp.
Dd204	<i>Absidia</i> sp.	Dd224	<i>Penicillium</i> sp.
Dd205	<i>Fusarium</i> sp.	Dd225	<i>Penicillium</i> sp.
Dd206	<i>Penicillium</i> sp.	Dd226	<i>Penicillium</i> sp.
Dd207	<i>Absidia</i> sp.	Dd227	<i>Absidia</i> sp.
Dd208	<i>Penicillium</i> sp.	Dd228	<i>Absidia</i> sp.
Dd209	<i>Penicillium</i> sp.	Dd229	<i>Penicillium</i> sp.
Dd210	<i>Penicillium</i> sp.	Dd230	<i>Penicillium</i> sp.
Dd211	<i>Penicillium</i> sp.	Dd231	<i>Phoma</i> sp.
Dd212	<i>Penicillium</i> sp.	Dd232	<i>Aspergillus niger</i>
Dd213	<i>Absidia</i> sp.	Dd233	<i>Penicillium</i> sp.
Dd214	<i>Absidia</i> sp.	Dd234	<i>Fusarium</i> sp.
Dd215	<i>Fusarium</i> sp.	Dd235	No determinada.
Dd216	<i>Fusarium</i> sp.	Dd236	<i>Penicillium</i> sp.
Dd217	<i>Acremonium</i> sp.	Dd237	<i>Penicillium</i> sp.
Dd218	<i>Mucor</i> sp.	Dd238	<i>Trichoderma</i> sp.
Dd219	<i>Mortierella</i> sp.	Dd239	<i>Penicillium</i> sp.

Continuación Tabla 1.

**“Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados con hidrocarburos”**

	<b>Suelo Posesión</b>	<b>(0-20) cm.</b>	
<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>	<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>
P81	<i>Penicillium</i> sp.	P101	<i>Absidia</i> sp.
P82	<i>Penicillium</i> sp.	P102	<i>Penicillium</i> sp.
P83	<i>Penicillium</i> sp.	P103	<i>Penicillium</i> sp.
P84	<i>Penicillium</i> sp.	P104	<i>Penicillium</i> sp.
P85	<i>Penicillium</i> sp.	P105	<i>Penicillium</i> sp.
P86	<i>Penicillium</i> sp.	P106	<i>Penicillium</i> sp.
P87	<i>Penicillium</i> sp.	P107	<i>Penicillium</i> sp.
P88	<i>Penicillium</i> sp.	P108	<i>Penicillium</i> sp.
P89	<i>Penicillium</i> sp.	P109	<i>Penicillium</i> sp.
P90	<i>Penicillium</i> sp.	P110	<i>Penicillium</i> sp.
P91	<i>Aspergillus niger</i>	P111	<i>Phoma</i> sp.
P92	<i>Penicillium</i> sp.	P112	<i>Penicillium</i> sp.
P93	<i>Penicillium</i> sp.	P113	<i>Mortierella</i> sp.
P94	<i>Penicillium</i> sp.	P114	<i>Phoma</i> sp.
P95	<i>Penicillium</i> sp.	P115	<i>Penicillium</i> sp.
P96	<i>Penicillium</i> sp.	P116	<i>Penicillium</i> sp.
P97	<i>Mortierella</i> sp.	P117	<i>Absidia</i> sp.
P98	Micelio estéril	P118	<i>Penicillium</i> sp.
P99	<i>Mortierella</i> sp.	P119	<i>Penicillium</i> sp.
P100	<i>Ulocladium</i> sp.	P120	<i>Penicillium</i> sp.
	<b>Suelo Posesión</b>	<b>(20-40) cm.</b>	
<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>	<b>Sigla cepa</b>	<b>Taxa</b>
Pp300	<i>Aspergillus niger</i>	Pp320	<i>Absidia</i> sp.
Pp301	<i>Phoma</i> sp.	Pp321	<i>Mortierella</i> sp.
Pp302	<i>Absidia</i> sp.	Pp322	<i>Penicillium</i> sp.
Pp303	<i>Penicillium</i> sp.	Pp323	<i>Penicillium</i> sp.
Pp304	<i>Penicillium</i> sp.	Pp324	<i>Penicillium</i> sp.
Pp305	<i>Penicillium</i> sp.	Pp325	<i>Penicillium</i> sp.
Pp306	<i>Penicillium</i> sp.	Pp326	<i>Penicillium</i> sp.
Pp307	<i>Penicillium</i> sp.	Pp327	<i>Cladosporium</i> sp.
Pp308	<i>Penicillium</i> sp.	Pp328	<i>Penicillium</i> sp.
Pp309	<i>Penicillium</i> sp.	Pp329	<i>Mortierella</i> sp.
Pp310	<i>Penicillium</i> sp.	Pp330	<i>Mortierella</i> sp.
Pp311	<i>Penicillium</i> sp.	Pp331	<i>Mortierella</i> sp.
Pp312	<i>Penicillium</i> sp.	Pp332	<i>Mortierella</i> sp.
Pp313	<i>Penicillium</i> sp.	Pp333	<i>Absidia</i> sp.
Pp314	<i>Penicillium</i> sp.	Pp334	<i>Absidia</i> sp.
Pp315	<i>Penicillium</i> sp.	Pp335	<i>Absidia</i> sp.
Pp316	<i>Penicillium</i> sp.	Pp336	<i>Penicillium</i> sp.
Pp317	<i>Penicillium</i> sp.	Pp337	<i>Penicillium</i> sp.
Pp318	<i>Penicillium</i> sp.	Pp338	<i>Penicillium</i> sp.
Pp319	<i>Penicillium</i> sp.	Pp339	<i>Penicillium</i> sp.

Tabla 2. Taxa fúngica aislada desde suelos no contaminados y contaminados con petróleo a sus respectivas profundidades de las tres localidades de la XII Región de Chile.

TAXA	Suelo Catalina Sur				Suelo Clarencia				Suelo Posesión	
	A	A	B	B	A	A	B	B	A	A
	0-20cm	20-40cm	0-20cm	20-40cm	0-20cm	20-40cm	0-20cm	20-40cm	0-20cm	20-40cm
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	2	3	1	1	1	-	-	-
<i>Absidia</i> sp.	-	-	-	-	3	2	15	5	2	4
<i>Acremonium</i> sp.	1	1	2	-	-	-	1	1	-	-
<i>Beauveria</i> sp.		1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1
<i>Cunninghamella</i> sp.	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	1	-	-	-	1	-	3	-	-
<i>Ulocladium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Mortierella</i> sp.	5	7	-	4	1	-	-	4	1	5
<i>Mucor</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	11	8	9	8	15	13	3	6	15	10
<i>Pithomyces</i> sp.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	1	-	-	1	-	-	2	-
<i>Walemia sebi</i>	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-
Micelio estéril	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No determinadas	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-
TOTAL	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

A: no contaminado; B: contaminado con petróleo.

Tabla 3. Peso micelial de cepas fúngicas seleccionadas y ensayadas en caldo mineral inorgánico adicionado de petróleo.

**“Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados con hidrocarburos”**

<b>Sigla Cepa</b>	<b>Peso fresco</b>	<b>Peso seco</b>	<b>Peso micelial</b>
	(g)	(g)	(g)
C6	4,63	0,02	4,61
C14	4,34	0,02	4,32
C34	4,07	0,01	4,07
C38	3,96	0,02	3,94
Cc400	5,24	1,61	3,62
Cc410	6,75	1,10	4,80
Cc420	6,04	2,05	3,99
Cc427	6,25	2,03	4,21
D55	4,24	0,03	4,21
D57	3,94	0,01	3,93
D68	3,82	0,04	3,72
D70	3,94	0,02	3,92
Dd202	5,18	0,02	5,16
Dd219	5,00	0,02	4,98
Dd225	5,44	0,03	5,41
Dd234	3,27	0,06	3,21
P90	4,89	0,02	4,87
P92	5,01	0,06	4,95
P101	4,27	0,01	4,27
P110	4,83	0,02	4,81
Pp303	6,33	2,02	4,32
Pp310	6,23	2,02	4,21
Pp320	5,10	2,05	3,95
Pp337	5,81	2,02	3,79

Tabla 4. Peso micelial de tres cepas fúngicas ensayadas en cinética degradativa de petróleo crudo a través del tiempo.

Días	cepa Dd202 peso micelial (g)	cepa Dd219 peso micelial (g)	cepa Dd225 peso micelial (g)
0	0,0	0,0	0,0
9	6,0	7,3	5,8
18	5,1	5,6	5,8
36	4,9	5,5	4,3

## **Anexo 2. Preparación de medios de cultivo y reactivos utilizados en la obtención de cepas fúngicas aisladas**

---

## desde suelos de la XII Región de Chile.

### 1. Preparación de medios de cultivos y reactivos.

#### 1.1. Agar extracto Malta al 2%.

En una botella que contenga 200 mL de agua destilada se le agrega con una espátula 4 g de extracto de malta, 4 g de agar-agar y luego se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 121° C a 1 atmósfera.

#### 1.2. Caldo mineral inorgánico (pH 6,2).

En un vaso precipitado con 1000 mL de agua destilada, se le agrega con una espátula 0,1 g de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 0,5 g de cloruro de potasio (KCl), 1 g de fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,5 g de sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y 0,2 g de sulfato de magnesio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), se deja agitando por unos minutos para disolver las sales para luego ajustar el pH a 6,2 con la base NaOH a 1 N. Luego se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 121° C a 1 atmósfera. Para preparar agar mineral inorgánico se le agrega 10 g de agar-agar.

### 2. Preparación liquido de montaje.

#### 2.1. Azul de lactofenol.

En un vaso precipitado con 20 mL de agua destilada se le agregan 20 g de ácido láctico, 0,05 g de azul cotton, 40 g de glicerina y 20 g de fenol en cristales, para luego mezclar homogéneamente.

#### 2.2. Rojo congo amoniacal al 1%.

En un matraz se agregan 100 mL de amoniaco y luego 1 mL de rojo congo, para luego mezclar homogéneamente.