

## Potencial de cepas de *Trichoderma* spp. para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo

Marcia Pesántez, Rosa Castro

Facultad de Recursos Naturales, Departamento de Fitopatología, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). Panamericana Sur km 1 ½. Riobamba. Ecuador. CP 06-01-4703.  
e-mail: mpesntez@latinmail.com

### RESUMEN

Especies de hongos pueden degradar compuestos xenobióticos contaminantes del suelo entre los que se encuentran los hidrocarburos. El objetivo de este trabajo fue determinar el potencial de tres cepas de *Trichoderma*, aisladas de suelo contaminado con petróleo, para la biorremediación. *Trichoderma harzianum* CCECH-Te1, *Trichoderma viride* CCECH-Te2 y *Trichoderma pseudokoningii* CCECH-Te3 se incluyeron en un ensayo con cada cepa independiente. El inóculo se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  conidios  $\text{ml}^{-1}$  que se aplicó sobre suelo contaminado por un derrame de petróleo. Después de 96 días de realizada la inoculación, se tomaron muestras de suelo a 10 y 15 cm de profundidad. Se determinó el contenido de hidrocarburos totales, hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados como cadmio, níquel y plomo. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de remoción por cada cepa de los compuestos analizados. Tanto a 10 cm como a 15 cm de profundidad se constató la remoción de los compuestos en porcentajes que alcanzaron entre 47 y 69.1% en los hidrocarburos y hasta 53.72% en los metales pesados. Esto denotó el potencial de las tres cepas para la biorremediación de suelos contaminados.

Palabras clave: compuestos xenobióticos hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados

## Potential of *Trichoderma* spp. strains for the bioremediation of soils contaminated with petroleum

### ABSTRACT

Fungi species can degrade xenobiotic compounds contaminating the soil, including hydrocarbons. The objective of this work was to determine the potential of three strains of *Trichoderma*, isolated from soil contaminated with petroleum, for bioremediation. *Trichoderma harzianum* CCECH-Te1, *Trichoderma viride* CCECH-Te2 and *Trichoderma pseudokoningii* CCECH-Te3 were included in one assay with each independent strain. The inoculum was adjusted to a concentration of  $1 \times 10^{10}$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  which was applied to soil contaminated by an oil spill. After 96 days of inoculation, soil samples were taken at 10 and 15 cm depth. The content of total hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals such as cadmium, nickel and lead were determined. With the data, it was calculated the percentage of removal of the analyzed compounds by each strain. At 10 cm and 15 cm depth, it was observed the removal of the compounds in percentages that reached between 47 and 69.1% in the hydrocarbons and up to 53.72% in the heavy metals. It which denoted the potential of the three strains for bioremediation in contaminated soils.

Keywords: heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, xenobiotic compounds

### INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos y agua por compuestos xenobióticos es un problema mundial. Los xenobióticos son sustancias químicas que son ajenos a los sistemas biológicos e incluyen plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), compuestos aromáticos policlorados, disolventes, hidrocarburos y otros contaminantes como surfactantes, siliconas y plásticos. La eliminación de tales contaminantes requiere del

uso de técnicas físicas, químicas y biológicas. Su elección depende de las propiedades específicas del suelo y los contaminantes (Mule y Melis, 2000).

En Ecuador son frecuentes los derrames de hidrocarburos al suelo y se ha informado de daños considerables al medioambiente por esta causa, principalmente en zonas amazónicas. La restauración de estos ecosistemas exige cada vez más el uso de alternativas amigables con el medioambiente y económicamente viables.

Los contaminantes como plaguicidas, hidrocarburos y metales pueden acumularse en los suelos, sedimentos y las plantas. Los (HAP), son muy preocupantes por su persistencia en el medio ambiente (especialmente en el suelo) y los potentes efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos que estos compuestos tienen sobre los organismos vivos (Bispo *et al.*, 1999; Billiard *et al.*, 2008).

Muchas cepas de bacterias y hongos pueden degradar al menos algunos componentes de hidrocarburos contaminantes. Esto hace de esos dos grandes grupos microbianos del suelo prometedores reservorios de actividad de degradación de dichos compuestos (Pickard *et al.*, 1999; Kanaly y Harayana, 2000; Harms *et al.*, 2011; Stefani *et al.*, 2015). Por esta razón, la biorremediación se perfila como una vía para, además de la destrucción de los compuestos orgánicos, ofrecer una alternativa de bajo costo en comparación con otras técnicas de remediación, que sólo estabilizan o eliminan los contaminantes (Errasquin y Vazquez, 2003; Cerniglia y Sutherland, 2010).

Sin embargo, independientemente del enfoque adoptado, la biorremediación eficaz depende de la capacidad para estudiar microorganismos que son autóctonos de sitios contaminados y que sean capaces de metabolizar esos compuestos. Tanto los métodos de cultivo independientes como dependientes para el análisis de las comunidades microbianas se han utilizado con frecuencia para describir microorganismos de ambientes contaminados con hidrocarburos (Stefani *et al.*, 2015).

Aunque muchas especies de *Trichoderma* son comúnmente empleadas para la producción industrial de enzimas, el control biológico de patógenos, la promoción del crecimiento en plantas, etc. (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Druzhinina *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2015), su uso en la biodegradación de xenobióticos es limitada (Harman *et al.*, 2004; Atagana, 2009; Su *et al.*, 2011; Zafra y Cortés-Espinosa, 2015). Varias referencias indican el potencial de cepas de este género fúngico para metabolizar diferentes hidrocarburos y emplearlos como fuente de carbono en ensayos *in vitro* (Matsubara *et al.*, 2006; Atagana 2009). Sin embargo, su uso para la remoción de contaminantes en el suelo no ha sido extensivo.

La aplicación de *Trichoderma* para el tratamiento de sitios contaminados puede convertirse en una realidad en un futuro próximo, ya que pueden producirse a bajo costo en grandes cantidades a escala industrial y formularse para aplicaciones de campo (Singh y Nautiyal, 2012).

Atendiendo a lo anterior el objetivo de este trabajo fue determinar el potencial de tres cepas de *Trichoderma*, aisladas de suelo contaminado con petróleo, para la biorremediación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas fúngicas

Se emplearon tres cepas pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos de la ESPOCH aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos en la provincia de Esmeraldas: *Trichoderma harzianum* CCECH-Te1, *Trichoderma viride* CCECH-Te2 y *Trichoderma psedokoningii* CCECH-Te3.

### Muestras de suelo

Se realizaron muestreos de suelo en áreas de una refinería en la provincia de Esmeraldas, Ecuador donde se habían producido derrames por la ruptura de calentadores situados cada cierto tramo de los ductos. Se seleccionaron sectores contaminados y sin contaminación por derrame de hidrocarburos cuyas características se muestran en la tabla 1. En cada uno de los sectores se delimitó una parcela de 5 x 5 m de donde se tomaron las muestras de suelo. Se recolectaron independientemente muestras de cada sector que se depositaron en envases plásticos y se transportaron al Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

### Efecto de cepas de *Trichoderma* sobre hidrocarburos y metales pesados en el suelo

Para determinar el efecto de tres cepas de *Trichoderma* en la remoción de hidrocarburos y metales pesados en suelo contaminado se diseñó un ensayo con cada cepa independiente. En cajones de madera de 20 cm de largo por 15 cm de ancho y 25 cm de

Tabla 1. Características físico-químicas del suelo.

Variable	Suelo no contaminado	Suelo contaminado con petróleo
pH	6.6	6.8
Materia orgánica (%)	3.6 M	2.2 B
NH <sub>4</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	21.31 B	16.79 B
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	113.4 A	120.5 A
Mn (mg l <sup>-1</sup> )	27 M	17 M
B (mg l <sup>-1</sup> )	0.27 M	1.32 A
Fe (mg l <sup>-1</sup> )	29 M	18 B
Textura	Franco Limoso	Franco arenosa
Estructura	Suelta	Bloques Subangulares

B=bajo, M=Medio, A=Alto. Análisis por el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

profundidad se colocaron muestras de suelo contaminado a razón de 9 kg/cajón. Como controles se empleó suelo no contaminado y suelo contaminado sin aplicación de *Trichoderma*.

Las cepas de *Trichoderma* crecidas durante 5 días en placas de Petri de 9 cm de diámetro en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) se tomaron para preparar el inóculo. Para ello se adicionaron a las placas de Petri 10 ml de una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) en agua destilada y se removieron los conidios con un asa bacteriológica. La suspensión de conidios obtenida se homogenizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  conidios ml<sup>-1</sup>. Posteriormente, se inocularon por aspersión 25 ml de la suspensión de conidios a cada unidad experimental y se mezclaron con el suelo. Se emplearon tres repeticiones por tipo de suelo y cepa.

Después de 96 días de realizada la inoculación, con la ayuda de un barreno se tomaron muestras de suelo a 10 y 15 cm de profundidad. Las muestras se analizaron por el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH (acreditado por el Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE), con Acreditación No. OAE LE 2C 06-008. Registro Oficial 404). Mediante los protocolos normalizados en este laboratorio se determinó el contenido de hidrocarburos totales, HAP (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno,

antraceno, fluroanteno, pirenodel, antraceno, criseno, fluoranteno, pireno, dibenzo antraceno, pirileno) y metales pesados como cadmio, níquel y plomo. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de remoción por cada cepa de los compuestos analizados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó que con la inoculación de las cepas de *Trichoderma* disminuyó el contenido de compuestos contaminantes en el suelo (Figura 1). La concentración de hidrocarburos totales se redujo en más de 47%, tanto a 10 como a 15 cm. De igual forma, los (HAP) decrecieron en más del 50%. Los porcentajes de remoción se encontraron en valores intermedios con respecto a otros referidos por la literatura científica. En este sentido, se han informado eficiencias que van desde menos del 10% en la degradación de antraceno por *T. harzianum* en suelo (Romero *et al.*, 2002) hasta 85% de diésel por *Trichoderma* spp. (Hadibarata *et al.*, 2007).

Estos resultados confirman la necesidad de evaluar la efectividad de cepas autóctonas en las condiciones en las cuales se realizará la biorremediación (Zafra y Cortés-Espinosa, 2015).

Para los HAP con la cepa *Trichoderma harzianum* a 15 cm de profundidad, se logró la mayor eficiencia para la remoción de estos contaminantes con 69.1%. Este resultado reviste gran importancia por su posible aplicación práctica ya que estos compuestos

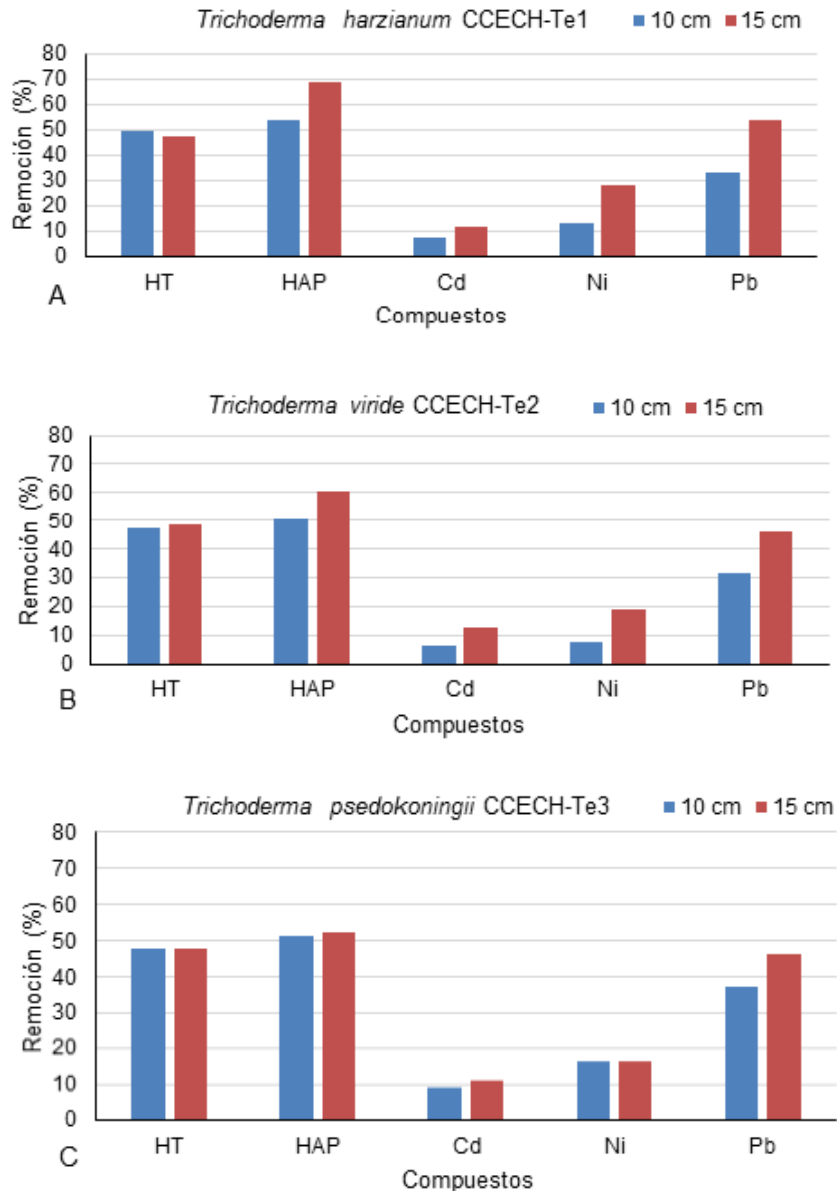


Figura 1. Remoción de hidrocarburos y metales pesados por tres cepas de *Trichoderma* en suelo contaminado por derrame de petróleo. HT hidrocarburos totales, HAP hidrocarburos aromáticos policíclicos.

son de los contaminantes más persistentes en el suelo por sus propiedades que los hacen resistentes al ataque de los microorganismos (Cerniglia y Sutherland, 2010; Zafra y Cortés-Espinosa, 2015). Por otra parte, son contaminantes muy peligrosos ya que han sido encontrados como carcinogénicos, genotóxicos, citotóxicos o ecotóxicos en estudios *in vitro* e *in vivo* (Anyakora, 2007).

Los resultados de este estudio apoyan investigaciones previas que refieren a varias

especies de *Trichoderma* con capacidad de degradar HAP entre las que se destacan *T. harzianum*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. reseei*, *T. koningii*, *T. viride* y *T. asperelum* (Cerniglia y Sutherland, 2010; Argumedo-Delira *et al.*, 2012; Zafra *et al.*, 2015). De igual forma, Chaîneau *et al.* (1999) informaron la capacidad que tienen algunas especies de *Trichoderma* para degradar hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en aceites combustibles. El metabolismo de los HAP por los hongos está mediado principalmente por la producción de

enzimas y otras especies de basidiomicetes, ascomicetes también se han encontrado con actividad degradadora de estos compuestos (Cerniglia y Sutherland, 2010; Zafra y Cortés-Espinosa, 2015).

En este sentido, April *et al.* (2000), identificaron varias especies de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Gliocladium*, George-Okafor *et al.* (2009) comprobaron *in vitro* la actividad de biodegradación de petróleo de aislados fúngicos entre los cuales *Aspergillus versicolor* y *A. niger* exhibieron altos porcentajes de eficiencia en la degradación.

Los metales pesados cadmio y níquel se redujeron en menor cuantía pero en el caso del plomo alcanzó hasta 53.72% a los 15 cm con la cepa *T. harzianum* CCECH-Te1. Estos compuestos se encuentran entre los contaminantes más difíciles de tratar ya que no pueden ser eliminados fácilmente por los microorganismos (Errasquin y Vazquez, 2003; Tripathi *et al.*, 2007). Los resultados confirman hallazgos previos de que cepas de *Trichoderma* pueden tener tolerancia a crecer en presencia de altas concentraciones de metales pesados (Tripathi *et al.*, 2013).

Tanto a 10 cm como a 15 cm de profundidad se constató la remoción de los compuestos lo cual denotó el potencial de las tres cepas para la biorremediación de suelos contaminados con derrames de hidrocarburos y metales pesados. Los resultados de este estudio abren nuevas perspectivas para el uso de cepas autóctonas de *Trichoderma* en la biorremediación de ecosistemas dañados por contaminantes de la industria del petróleo.

## CONCLUSIONES

Cepas autóctonas de *Trichoderma* aisladas de suelo contaminado con petróleo en Esmeralda, Ecuador, tienen potencial para la remoción de hidrocarburos y metales pesados.

## REFERENCIAS

Anyakora C (ed) (2007) Environmental Impact of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Research Signpost, Kerala; ISBN: 978-81-308-0188-9  
April TM, Foght JM, Currah RS (2000) Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit

soils in northern and western Canada. Canadian Journal of Microbiology 46 (1): 38–49

Argumedo-Delira R, Alarcon A, Ferrera-Cerrato R, Almaraz JJ, Pena-Cabriaes JJ (2012) Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. J Environ Manag 95(Suppl):S291 – S299; doi: 10.1016/j.jenvman.2010.08.011

Atagana HI (2009) Biodegradation of PAHs by fungi in contaminated-soil containing cadmium and nickel ions. Afr J Biotechnol 8 (21):5780 –5789; doi: 10.5897/AJB2009.000-9465

Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT (2008) Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: mechanisms and implications for risk assessment. Toxicol Sci 105 (1): 5–23. doi: 10.1093/toxsci/kfm303

Bispo A, Jourdain MJ, Jauzein M (1999) Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Organic Geochemistry 30 (8): 947–952; doi: 10.1016/S0146-6380(99)00078-9

Castro R, Pesántez M, Lema P, Quevedo J, Arichabala P, Alvarado-Capó Y (2015) Potential use of *Trichoderma*-based bioproduct for black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) management in the field. Biocontrol Science and Technology 25 (4): 481-486; doi: 10.1080/09583157.2014.982512

Cerniglia CE, Sutherland GR (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. En: Timmis KN (ed) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, pp. 2079–2110. Springer-Verlag, Berlin; doi: 10.1007/978-3-540-77587-4\_151

Chaineau CH, Morelb UJ, Duponta J, Burya E, Oudota J (1999) Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. Sci Total Environ 227(2-3): 237-247; doi: 10.1016/S0048-9697(99)00033-9

Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodriguez L, Cortes-Penagos C, Lopez-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. Plant Physiol 149 (3):1579–1592; doi: 10.1104/pp.108.130369

Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP (2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat Rev Microbiol 9(10): 749 – 759; doi: 10.1038/nrmicro2637

- Errasquin EL, Vazquez C (2003) Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere* 50(1): 137–143
- George-Okafor U, Tasie F, Florence MO (2009) Hydrocarbon degradation potentials of indigenous fungal isolates from petroleum contaminated soils. *J of physical Nature science* 3(1): 1-6
- Hadibarata T, Tachibana S, Itoh K (2007) Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pak J Biol Sci* 10(15):2535–2543; doi: 10.3923/pjbs.2007.2535.2543
- Harman GE, Lorito M, Lynch JM (2004) Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. *Adv Appl Microbiol* 56:313 – 330; doi: 10.1016/S0065-2164(04)56010-0
- Harms H, Schlosser D, Wick LY (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* 9: 177–192; doi: 10.1038/nrmicro2519
- Kanally RA, Harayama S (2000) Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol* 182 (8): 2059–2067; doi: 10.1128/JB.182.8.2059–2067.2000
- Matsubara M, Lynch JM, De Leij FAAM (2006) A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme Microbiol Technol* 39(7): 1365-1372; doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.04.025
- Mule P, Melis P (2000) Methods for remediation of metal-contaminated soils: preliminary results. *Commun Soil Sci Plant Anal* 31(19-20):3193–3204; doi: 10.1080/00103620009370660
- Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol* 65 (9): 3805-3809
- Romero MC, Salvioli ML, Cazau MC, Arambarri AM (2002) Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environ Pollut* 117(1): 159–163
- Singh PC, Nautiyal CS (2012) A novel method to prepare concentrated conidial biomass formulation of *Trichoderma harzianum* for seed application. *J Appl Microbiol* 113(6): 1442–1450; doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05426.x
- Stefani FOP, Bell TH, Marchand C, de la Providencia IE, El Yassimi A, St-Arnaud M (2015) Culture-Dependent and –Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLoS ONE* 10(6): e0128272; doi:10.1371/journal.pone.0128272
- Su SM, Zeng XB, Bai LY, Li LF, Duan R (2011) Arsenic biotransformation by arsenic-resistant fungi *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1. *Sci Total Environ* 409 (23): 5057 – 5062; doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.08.039
- Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol* 25 (4):158–165; doi: 10.1016/j.tibtech.2007.02.003
- Tripathi P, Singh P, Mishra A, Chauhan P, Dwivedi S, Bais RT, Tripathi R (2013) *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Techn Environ Policy* 15 (4): 541–550; doi: 10.1007/s10098-012-0553-7
- Zafra G, Moreno-Montano A, Absalon AE, Cortes-Espinosa DV (2015) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environ Sci Pollut Res* 22 (2) :1034–1042; doi: 10.1007/s11356-014-3357-y
- Zafra G, Cortés-Espinosa DV (2015) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. *Environ Sci Pollut Res* 22 (24):19426–19433; doi: 10.1007/s11356-015-5602-4

Recibido: 26-07-2015

Aceptado: 10-05-2016