

Artículo original

## La intensidad eléctrica y la biorremediación de *Aspergillus niger* en suelos contaminados con hexadecano, en Loreto, Perú

[Electrical intensity and bioremediation of *Aspergillus niger* in contaminated soils with hexadecano, in Loreto, Peru]

Frank Romel León Vargas<sup>\*1,2</sup>, Kosseth Marianella Bardales Grández<sup>1</sup>, Víctor García Pérez<sup>1</sup>, Walter Moreno Eustaquio<sup>3</sup>, Cleto Jara Herrera<sup>1</sup>, José Manuel Perdiz Dávila<sup>1</sup>

1. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Facultad de Ingeniería Química. Av. Grau 1072, Iquitos, Loreto, Perú. Correos electrónicos: frarolevar@hotmail.com (F. R. León \* Autor para correspondencia), koma2326@hotmail.com (K. M. Bardales), vgp\_57@hotmail.com (V. García), cletotojara@gmail.com (C. Jara), josper53@gmail.com (J. M. Perdiz).

2. Universidad Científica del Perú (UCP). Facultad de Ciencias e Ingeniería. Av. Quiñonez km 2,5, San Juan Bautista, Loreto, Perú.

3. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Facultad de Ingeniería Química. Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, La Libertad, Perú. Correo electrónico: wmorenoe255@hotmail.com (W. Moreno).

### Resumen

La conservación del medio ambiente es un tema de interés mundial para aminorar los efectos del cambio climático. Es así que la biorremediación es una técnica que se está desarrollando actualmente por su efectividad y bajo costos. En el presente estudio se determinó la electrobiodegradabilidad del hexadecano empleando *Aspergillus niger* inmovilizado. Se aisló el *Aspergillus niger* de un suelo contaminado con petróleo y se identificó por su morfología macroscópica y microscópica. El soporte fue un suelo estéril tipo franco-arenoso, el cual fue contaminado con 180 mg de hexadecano (HXD)/gramo de suelo. El cultivo de *Aspergillus niger* se reactivó en agar papa dextrosa y las esporas se cultivaron en agua destilada más Tween 80 e inmovilizaron en alginato de calcio. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ), las intensidades de corriente eléctrica usadas fueron de 5 mA, 10 mA y 15 mA, durante un periodo de 12 días. El hexadecano residual se determinó por cromatografía de gases. Se concluye que la intensidad de corriente eléctrica óptima en el rendimiento de disminución de hexadecano por esporas de *Aspergillus niger* inmovilizado en alginato de calcio es 10 mA, con un valor de 14975,76 mg/kg por día. Se logró electrobiodegradar el 99,83% de hexadecano.

**Palabras clave:** Electrobiodegradación, Hexadecano, Inmovilización, Petróleo.

### Abstract

The environment conservation is a topic of world interest to lessen the effects of climate change. Consequently, bioremediation is a technique that is currently being developed for its effectiveness and low costs. In the present study, the electrobiodegradability of hexadecane was determined using immobilized *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* was isolated from oil-contaminated soil and it was identified by its macroscopic and microscopic morphology. The support was a sterile sandy-loam soil, which was contaminated with 180 mg of hexadecane (HXD) / gram of soil. *Aspergillus niger* culture was reactivated on potato dextrose agar and the spores were cultured in distilled water plus Tween 80 and immobilized in calcium alginate. The tests were carried out at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ), the electric current intensities used were 5 mA, 10 mA and 15 mA, for a period of 12 days. The residual hexadecane was determined by gas chromatography. It is concluded that the optimal electric current intensity in the hexadecane reduction performance by spores of *Aspergillus niger* immobilized in calcium alginate is 10 mA, with a value of 14975,76 mg / kg.day. It was possible to electrobiodegrade 99,83% of hexadecane.

**Keywords:** Electrobiodegradability, Hexadecane, Immobilization, Oil.

## INTRODUCCIÓN

Loreto por su área de extensión es considerado el más grande departamento del Perú, su extensión es de 369 mil km<sup>2</sup> de territorio de selva amazónica; donde existen gran parte de los pozos de extracción de petróleo de nuestro país. Iquitos es su capital y sirve de centro logístico de operaciones de las compañías petroleras. En la actualidad existen 12 pozos de petróleo activos en Loreto y 4 en exploración, con una producción de 14 250 barriles diarios (Perupetro, 2019). En Loreto la actividad petrolera se inició en el año 1971, siendo dos empresas las que iniciaron estas actividades: la operadora nacional Petroperú en el Lote 8X y la empresa estadounidense Occidental Petroleum Company (OXY), en el Lote 1AB; durante decenas de años de explotación, la deficiente política ambiental del gobierno y el desinterés de las empresas que aprovecharon el deficiente control estatal a sus actividades extractivas y de transporte de petróleo, provocaron muchos daños por derrames de petróleo en diferentes localidades de Loreto (Observatorio Petrolero de la Amazonía Norte, 2019).

En los derrames de petróleo, los ecosistemas y las poblaciones aledañas se ven profundamente afectados toda vez que es necesario un tiempo determinado para su recuperación, lo cual depende de la cantidad de hidrocarburo que se diseminó y también de las características de las especies vivas para desarrollarse y adaptarse al contaminante. También podemos observar que los ecosistemas se recuperan lentamente hasta lograr un nivel de toxicidad baja, con el cual los organismos pueden resurgir nuevamente (Vargas *et al.*, 2010). El hexadecano (HXD) es un hidrocarburo alifático incoloro, insoluble en agua, cuyo peso molecular es de 226 g/mol, el cual es el mayor componente del Diésel (Velasco, 2006). Esta molécula se utiliza como modelo para la investigación en biodegradación de hidrocarburos alifáticos, por sus siguientes características: está presente en los lugares contaminados por hidrocarburos, es un indicador importante de la biodegradación de hidrocarburos por ser una molécula de poca solubilidad en

agua y de fácil asimilación para los microorganismos (Velasco *et al.*, 2010; Sánchez, 2012; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2015). Por estos motivos, en la presente investigación se enfocará al estudio de hidrocarburos alifáticos, específicamente al hexadecano.

Una propiedad relevante en los hidrocarburos es que son compuestos biodegradables (cambio en la estructura química de un compuesto llevado a cabo por los microorganismos) de forma aerobia. Los procesos ecológicos a través de microorganismos han llamado la atención para la limpieza de contaminantes mediante la biorremediación de sitios contaminados con petróleo, así como para una mejor recuperación del crudo de petróleo de los depósitos (Sajna *et al.*, 2015; Varjani y Upasani, 2016). La biorremediación es un método tecnológico, con el cual se obtiene la recuperación de lugares que se encuentren contaminados por hidrocarburos de petróleo u otros compuestos tóxicos y es más económica que otros métodos de remediación. Los factores externos, tales como los pH, humedad, temperatura, nutrientes, oxígeno, entre otros son variables importantes para poder tener condiciones favorables para la biorremediación. La eficiencia de la biorremediación de los hidrocarburos puede ser inhibido por la baja biodisponibilidad y toxicidad, la no uniforme distribución espacial de microorganismos y contaminantes, la baja capacidad del metabolismo microbiano, etc. (Li *et al.*, 2017).

La degradación microbiana de HXD y sus derivados son un importante campo de investigación, donde el pH, la temperatura y otros factores de crecimiento requerido por los organismos deben ser óptimos (Abdel *et al.*, 2010). Algunos microorganismos como las bacterias y hongos tienen la capacidad de degradar compuestos complejos mediante enzimas extracelulares que tienen una función catabólica de moléculas específicas, desdoblándolas en compuestos más simples y que de esta forma pueden ingresar en las vías metabólicas normales de cada organismo. Se afirma que un compuesto orgánico se cataboliza completamente cuando este es retornado al ambiente en forma inorgánica

o mineral de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (mineralización) en el caso de los procesos aerobios. La descontaminación microbiológica del suelo contaminado con hidrocarburos es una alternativa eficiente, económica y versátil para degradar los contaminantes basados en petróleo (Sherafatmand y Ng, 2015).

La electrobiorremediación (EK-BIO) es la técnica mixta que suma los efectos de la electroremediación a la degradación microbiana de diferentes tipos de contaminantes (Baztan *et al.*, 2015); es un método tecnológico innovador para la limpieza de suelos orgánicos contaminados (Huang *et al.*, 2015). La EK-BIO es una tecnología prometedora para el tratamiento in situ y remediación de muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos en el suelo y las aguas subterráneas (Gill *et al.*, 2014), puede combinarse con alguna otra técnica de limpieza de suelo y así alcanzar mejores resultados (Alvarado *et al.*, 2015). Existe un gran número de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos capaces de utilizar hidrocarburos como fuente única de carbono y energía (Velasco, 2006).

Los hongos y su facultad para transformar un gran número de compuestos orgánicos de elevado peso molecular como son algunos plásticos, así mismo los hidrocarburos poliaromáticos y llevarlos hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O ofrece un potencial innegable para su uso en procesos de tratamiento de descontaminación. Los hongos de tipo filamentosos se han sugerido como buenos candidatos para la degradación de hidrocarburos, dentro de estos hongos destaca *Aspergillus niger*; el cual presenta una actividad muy importante en la biodegradación de moléculas tóxicas, desechos industriales o ambos (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003). Este hongo tiene apariencia esponjosa, la formación del micelio es a partir de las hifas de color blanco el cual se torna de color negro a medida que se forman las esporas (Velasco, 2006). La ruta metabólica usada por los microorganismos como vía general de biodegradación para hidrocarburos alifáticos tal como es el hexadecano. Según Velasco (2011), estas reacciones consisten en la catabolización del hexadecano en ácido palmítico y esta acción

es catalizada por proteínas nombradas como sistema alcano hidroxilasas. El palmitoil-CoA es el compuesto final de esta fase. Formado el palmitoil-CoA, debe haber la presencia un transportador para hacerlo ingresar al interior de la matriz mitocondrial, puesto que todo compuesto Acil-CoA no puede traspasar la membrana mitocondrial interna por ser impermeable a estos, de los cuales se obtendrá energía en el interior de las mitocondrias para ser usada por el microorganismo. El hexadecano realizara siete ciclos de  $\beta$ -oxidación en el interior de la mitocondria, obteniendo al final de su degradación 7 moléculas de FADH<sub>2</sub>, 7 moléculas de NADH y 8 moléculas del compuesto Acetil-CoA. Los FADH<sub>2</sub> y NADH que se obtuvo en la  $\beta$ -oxidación se dirigen a oxidarse en la cadena respiratoria y los compuestos acetil-CoA se incorporan en el ciclo de Krebs en donde se obtendrá GTP y moléculas de NAD<sup>+</sup> y FAT. El ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbónicos es una ruta metabólica que proporciona el NADH necesario para la obtención de energía en forma de ATP en la cadena respiratoria y como producto final de las sustancias orgánicas catabolizadas produce CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, siendo liberados al ambiente para ser utilizados por las plantas, en una relación de simbiosis del hongo con las raíces (Wackett *et al.*, 1989). La corriente eléctrica al ser aplicada en baja intensidad (0,42 mA/cm<sup>2</sup>) estimula el metabolismo catabólico de *A. niger*, el cual es capaz de degradar altos niveles de hexadecano en un corto período de tiempo (Velasco *et al.*, 2010). El metabolismo de *A. niger* se modifica, por efecto del pretratamiento electroquímico, de tal manera que el consumo de hexadecano tanto en medio sólido como en medio líquido son mucho más eficientes que el biocatalizador no pre-tratado (Sánchez, 2012). Cuando aplicamos una diferencia de potencial de corriente eléctrica entre los electrodos, los iones del ecosistema de los poros del suelo se mueven hacia la carga opuesta (electromigración). Además, los iones, así como los coloides cargados, incluido el biocoloide (electroforesis) en el ánodo, el cátodo y el suelo, migran hacia el electrodo con cargas opuestas; estas reacciones juegan un papel importante en la eliminación de contaminantes de las partículas del

suelo (Mokhtarani *et al.*, 2016). Hasta la fecha los estudios han estado dirigidos al uso de bacterias y en menor proporción a hongos de tipo filamentosos, microorganismos que han mostrado tener un elevado potencial de aplicación en la biorremediación ambiental. Sin embargo, a la fecha no existen trabajos relacionados con el uso de *Aspergillus niger*, aislado de suelos contaminados con petróleo de Loreto (Perú), inmovilizado en alginato de calcio utilizado en la biodegradación de suelos contaminados con hexadecano (HXD), que es un componente ordinario en el petróleo y el componente de mayor presencia del diésel. En la presente investigación se propuso como objetivos: determinar si el *Aspergillus niger* tiene actividad biodegradable en el suelo contaminado con hexadecano y determinar el amperaje óptimo para la mejor eficiencia de biodegradación del hexadecano en el suelo contaminado, por el *Aspergillus niger*.

## MATERIALES Y MÉTODO

El método utilizado se puede observar en la Figura 1, tiene como base el usado por Velasco (2006) en su investigación titulada "Efecto de un campo eléctrico en la degradación de hexadecano por *Aspergillus niger* en un soporte inerte", al cual se le realizó modificaciones que fueron observadas en el trabajo realizado por Baldera y Noriega (2018), titulado "Electrobiodegradación de suelos contaminados con hexadecano utilizando *Aspergillus niger* inmovilizado".

### **Preparación del *Aspergillus niger***

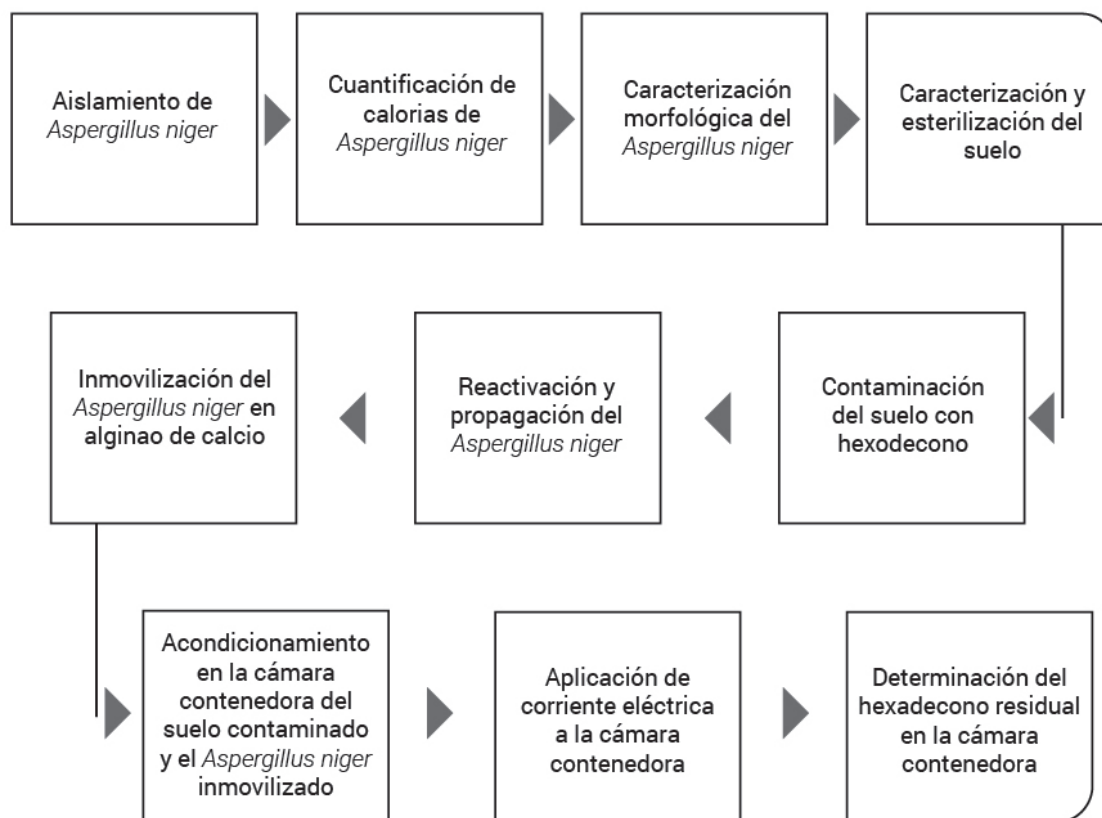
Para el aislamiento se pesaron 10 gramos de suelo contaminado con petróleo producto de un derrame en la Comunidad Nativa Monte Rico (Coordenadas UTM 449934N – 9462362E), se diluyó en 100 ml de solución salina estéril. Se homogenizó y se dejó reposar por 15 minutos. Se inoculó 100 µL en una placa Petri conteniendo agar papa dextrosa, se sembró por superficie y se incubó a 30 °C por 5 días. Cumplido el tiempo de incubación, a partir de una colonia con características de *Aspergillus niger*, se sembró por puntura en tubos conteniendo agar extracto levadura-glucosa-oxytetraciclina (OGY),

la incubación se realizó a 30°C durante 7 días. Para la cuantificación de *Aspergillus niger*, se tomó un gramo del suelo tratado y se diluyó al décimo, con una solución de buffer fosfato 0,1 N, por cinco veces. Del sobrenadante se tomó 100 µL y se inoculó en una placa Petri con agar Sabouraud, se utilizó un asa de Digralsky para sembrar por superficie. Se incubó a 30 °C por 5 a 7 días hasta la presencia de colonias (Velasco, 2006). Y para la caracterización se basó en las estructuras morfológicas microscópicas y macroscópicas de *Aspergillus niger* de acuerdo a INS (2017).

### **Preparación del suelo inerte**

Para la caracterización del suelo, que se utilizó como soporte para el ensayo, se tomó una muestra de suelo de las instalaciones de la Facultad de Ciencias Forestales en la ciudad universitaria de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana en Zungarococha, San Juan Butista, Maynas, Loreto, Perú. Se colocaron cuatro kilogramos de suelo en bandejas y se dejó secar a temperatura ambiente (30 ± 2 °C); luego, se tamizó con una malla N°10 con un tamaño de poro de 2,00 mm. Luego se procedió a realizar los análisis físico-químico en el Laboratorio del Departamento de Ingeniería de la Facultad de Ingeniería Química (UNAP). Para la esterilización del suelo se tamizaron 800 gramos de suelo con una malla N°16 cuyo tamaño de poro es 1,19 mm; luego se colocaron en un vaso y se esterilizó en estufa a 180 °C durante 1 hora. Este tratamiento físico tiene como objetivo eliminar a los agentes patógenos del mismo. Finalmente, el suelo estéril se le contaminó artificialmente con 180 mg de hexadecano. La contaminación con HXD, se realizó según la modificación a la propuesta de Velasco (2010): Se solubilizó el HXD en n-heptano en una relación de 1,90 ml de heptano por cada 180 mg de hexadecano. Se impregnó y homogenizó el suelo con la solución de HXD – n- heptano. El suelo contaminado se extendió en un recipiente de metal y se dejó evaporar el heptano a temperatura ambiente (30 ± 2 °C). El suelo contaminado se depositó en recipientes de vidrio estéril y se almacenó hasta el momento de su uso, máximo 7 días después de procesado.





**Figura 1.** Flujograma de Metodológico del presente trabajo de investigación.

### **Preparación del inóculo**

**Reactivación del cultivo de *Aspergillus niger*:** El cultivo refrigerado fue reactivado en caldo Sabouraud glucosado y se incubó a 30 °C durante 72 horas. Cumplido este tiempo se sembró por estrías en placas Petri conteniendo PDA (Agar Papa Dextrosa) y se incubó en las mismas condiciones anteriores. Se verificó la pureza macroscópica y microscópica. A partir del cultivo puro se sembraron tubos conteniendo PDA. Luego de la incubación se conservó hasta el momento de su uso.

A partir del cultivo reactivado se resembró en placas Petri con agar papa dextrosa y se incubó por siete días a 30 °C. El procedimiento se repitió en matraces Erlenmeyer (250 ml) hasta completar tres ciclos. Luego se sembró en cuatro placas Petri conteniendo agar papa dextrosa y se incubó a 30 °C durante 7 días hasta alcanzar la esporulación; las esporas se cosecharon

con agua destilada estéril más Tween 80. Las esporas fueron inmovilizadas por atrapamiento en geles de alginato de calcio; para ello, en un Erlenmeyer se disolvió alginato de sodio en agua (3% W/V) y se adicionó la suspensión de esporas de *A. niger* y se dejó gotear lentamente en una solución estéril de cloruro de calcio (0,2 M) agitando lentamente a medida que las gotas formen pequeños geles esféricos, los cuales se agitaron y se lavaron con agua estéril con la finalidad de eliminar el exceso de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Vaidehi *et al.*, 2014).

### **Unidad Experimental**

**Diseño de la cámara contenedora del suelo:** El diseño de la cámara contenedora se basó de acuerdo a los trabajos de Murillo (2006), adaptándose con algunas modificaciones para el proyecto de investigación. La cámara contenedora de suelo fue cilíndrica, con un diámetro de 5,1 cm, una altura de 9,8 cm y resultando con

un volumen de 200,09 cm<sup>3</sup>; además en ambos extremos se encuentran dos compartimientos, el pozo anódico y catódico para contener los electrolitos. Cada compartimiento posee un diámetro de 6,5 cm, una altura de 3,3 cm y un volumen de 109,45 cm<sup>3</sup>. La cámara se aseguró herméticamente con tornillos de acero y teflón. Electrodo: Se utilizaron dos electrodos de cobre con un área de contacto con la cámara contenedora de 37,37 cm<sup>2</sup>. Estos electrodos permiten cerrar el circuito eléctrico a través de las reacciones de oxidación y reducción del agua.

### **Acondicionamiento**

Se colocaron 20 gramos de suelo estéril contaminado con hexadecano dentro de la cámara contenedora del suelo. Luego se añadieron 2 gramos de esporas de *A. niger* inmovilizado en alginato de calcio que equivale 4x10<sup>8</sup> esporas/ml, utilizando la cámara de Neubauer. Posteriormente se adicionaron 30 ml de solución electrolítica de fosfato 0,1 M dentro de los depósitos de cada electrodo. Las cámaras fueron instaladas en paralelo. Finalmente se aplicó corriente eléctrica continua a 5 mA, 10 mA y 15 mA por medio de los electrodos de cobre ubicados dentro de los compartimientos de la cámara. La corriente fue controlada por una resistencia variable (reóstato), se mantuvo el voltaje constante. Se incubó por 12 días manteniendo las corrientes constantes.

### **Determinación de hexadecano residual**

El hexadecano residual fue medido con el método 8015C de EPA, Rev. 3.2007 y la técnica aplicada fue Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography, con un cromatógrafo de Gases RQ1300 con columna TG-5MS (Length 30 m; I.D. 0,25 mm; Film 0,25 um) marca Thermo Scientific. El procedimiento se realizó en el Laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.

### **Diseño Experimental**

Se realizó en tres etapas para determinar la intensidad de corriente óptima de degradación de hexadecano utilizando *Aspergillus niger* inmo-

vilizado en alginato de calcio, realizando cuatro experimentos aplicando una intensidad eléctrica de 5 mA, 10 mA y 15 mA y una muestra control sin aplicación de intensidad eléctrica ni microorganismo, de manera triple durante 12 días y tomando una medida control en el sexto día, esta prueba se realizó a temperatura ambiente (30 ± 2 °C). De cada experimento se realizaron tres repeticiones de cuyos resultados se encontró el valor promedio de hexadecano residual.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Aislamiento y caracterización del microorganismo**

A partir de suelo contaminado con petróleo se aisló un hongo filamentoso con las características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus niger* que fue codificado como BN01 y se describen en la Tabla 1.

### **Caracterización del Suelo**

La clase textural es de tipo franco arenoso (Tala 2). Dicho tipo de suelo natural presenta una elevada concentración de arena, por lo que posee una permeabilidad alta, que afecta la electrocinética del proceso. Mena *et al.* (2012) concluyeron que las propiedades del suelo tienen influencia sobre el proceso electrocinético, lo cual nos lleva a afirmar que el suelo natural tiene una menor eficiencia que en el suelo artificial, como la perlita y vermiculita.

### **Electrobiodegradación de hexadecano**

La investigación se fundamenta en la caracterización y acondicionamiento del suelo contaminado con hexadecano y la aplicación de intensidades eléctricas de 5 mA, 10 mA y 15 mA para medir el rendimiento en la biodegradación del hexadecano por *Aspergillus niger* inmovilizado en alginato de calcio. Velasco (2006) argumenta que se deben aplicar corrientes de intensidad baja, no superiores a 50 mA, debido a que, con intensidades superiores, obtendríamos un aumento gradual en la temperatura por encima de 30°C; este aumento de temperatura puede disminuir la actividad metabólica de *A. niger*,

**Tabla 1.** Caracterización morfológica de *Aspergillus niger*.

Macroscópica	Microscópica
Colonias de inicio blanco algodonosa, luego toma un color amarillo claro que con el tiempo se cubre de cabezuelas de color negro.	Presencia de conidio, fiálide, vesícula, conidióforo y una cabeza aspergilar. Hifas tabicadas.

**Tabla 2.** Caracterización del suelo utilizado como soporte para los ensayos de degradación de hexadecano.

	M.O. (%)	2,2
	C.E. (1:1) (dS/m)	0,21
<b>Parámetros físico-químicos</b>	CaCO <sub>3</sub> (%)	0
	pH (1:1)	6,2
	K (ppm)	82,3
	P (ppm)	7,2
<b>Análisis mecánico</b>	Arena (%)	75
	Arcilla (%)	13
	Limo (%)	12
<b>Clase textural</b>		Franco arenoso
<b>CIC</b>		17,20
<b>Ca<sup>++</sup></b>		13,06
<b>Mg<sup>++</sup></b>		3,24
<b>K<sup>+</sup></b>		0,25
<b>Na<sup>+</sup></b>		0
<b>Al<sup>3+</sup> + H<sup>+</sup></b>		0,65

**Tabla 3.** Hexadecano residual (mg/kg) a diferentes intensidades de corriente eléctrica.

N°	Tratamiento (Intensidad de corriente eléctrica)	Tiempo (Días)	Repeticiones	Hexadecano Residual mg/kg	Promedio hexadecano residual mg/kg	
MA.1	5 mA	06	MA.1.1	18051,40	18051,75	
			MA.1.2	18049,25		
			MA.1.3	18054,60		
MA.2		12	12	MA.2.1	3495,86	3495,88
				MA.2.2	3491,20	
				MA.2.3	3500,59	
MB.1	10 mA		06	MB.1.1	1197,95	1198,48
				MB.1.2	1199,36	
				MB.1.3	1198,12	
MB.2		12	12	MB.2.1	289,42	290,87
				MB.2.2	292,13	
				MB.2.3	291,06	
MC.1	15 mA		06	MB.1.1	36100,53	36092,47
				MB.1.2	36092,63	
				MB.1.3	36084,25	
MC.2		12	12	MB.2.1	9351,37	9351,23
				MB.2.2	9345,58	
				MB.2.3	9356,73	
Control 01	Control (No se usa intensidad de corriente eléctrica, ni microorganismo)		06	Control 1.1	180000,00	179998,15
				Control 1.2	179998,76	
				Control 1.3	179995,70	
Control 02		12	12	Control 2.1	180000,00	179998,11
				Control 2.2	179997,45	
				Control 2.3	179996,90	

**Tabla 4.** Rendimiento de electrobiodegradación y porcentaje de eliminación de hexadecano por *Aspergillus niger* inmovilizado en alginato de calcio.

Intensidades de Corriente	Rendimiento (mg /kg. día)	% de eliminación
Control	0,16	0,001
5 mA	14708,67	98,06
10 mA	14975,76	99,83
15 mA	14220,73	94,80



debido a que su temperatura óptima para su normal funcionamiento metabólico es de 30°C. Por lo antes mencionado, en este trabajo se utilizó intensidades de corriente eléctrica de 5 mA, 10 mA y 15 mA; en la Tabla 3 se muestra los resultados de la electrobiodegradabilidad realizados a 6 y 12 días, en ella se puede observar que con una intensidad de 10 mA a los 6 días se obtuvo una alta disminución de la concentración de hexadecano, logrando una significativa biodegradación correspondiente al 99,33%; en los análisis al día 12, dicho porcentaje tuvo un incremento de 0,50% llegando a alcanzar el 99,83%, con referencia al promedio del control realizado en el sexto día.

Estos resultados obtenidos se asemejan a los estudios realizados por Volke-Sepúlveda *et al.* (2003) en Iztapalapa, Mexico, quienes reportan una alta eficiencia de la biodegradación mediante *Aspergillus niger* en concentraciones elevadas de hexadecano (180-717 mg g<sup>-1</sup>), lográndose un 100% de degradación en 15 días. Tomando en cuenta el área de los electrodos utilizados en este trabajo, la tasa de disminución correspondería a 0,27 mA/cm<sup>2</sup>; los valores obtenidos compaginan con lo expresado por Velasco *et al.* (2010), quienes informaron una disminución de (96 ± 1,4%) de hexadecano durante 8 días aplicando una intensidad de corriente de 6 mA (0,42 mA cm<sup>-2</sup>) utilizando *Aspergillus niger* y un soporte de perlita, razón por la cual podemos afirmar que la diferencia en los resultados obtenidos radica en el soporte utilizado para el estudio.

Los resultados obtenidos demuestran que existe degradación de hexadecano por acción de *Aspergillus niger*, concordando con el estudio realizado por Volke-Sepúlveda *et al.* (2003), quienes concluyen que el *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso capaz de degradar HXD (como molécula modelo de hidrocarburos alifáticos de cadena larga) en medio sólido y líquido. Este hongo tiene una serie de reacciones que no han sido estudiadas en la presente investigación, pero se cuenta con los reportes dados por Parshikov *et al.* (2015).

Asimismo, Velasco (2011), indica que la sensibilidad de los hidrocarburos a la biodegradación microbiana radica en el gasto de energía que es necesaria para dar comienzo a la oxidación. En la primera fase, los microorganismos añaden oxígeno molecular a los hidrocarburos, por la actuación de las enzimas monooxigenasas y/o dioxigenasas, y entre mayor sea el número de anillos aromáticos asociados o más extensa es la cadena alifática, será necesario un mayor gasto energético.

Observando la Tabla 4, se muestra que se obtuvo el mejor rendimiento de la electrobiodegradación de hexadecano y su porcentaje de eliminación por acción del *Aspergillus niger* inmovilizado en alginato de calcio a una intensidad eléctrica de 10 mA durante un periodo de 12 días, obteniéndose un rendimiento de biodegradación de hexadecano a una intensidad eléctrica de 10 mA con una disminución de 14975,76 mg de hexadecano/kg.día y un 99,83% de eliminación de hexadecano presente en el suelo contaminado, en comparación a los resultados obtenidos por Velasco *et al.* (2010), quienes informaron una disminución de (96 ± 1,4%) de hexadecano durante 8 días aplicando una intensidad de corriente eléctrica de 6 mA (0,42 mA cm<sup>-2</sup>) utilizando *Aspergillus niger* y un soporte de perlita.

Los resultados obtenidos hasta el momento se asemejan a la investigación realizada por Al-Hawash *et al.* (2019) quienes concluyeron que el *Aspergillus sp.* logró una remoción del 60,3% del petróleo crudo en el día 7 de incubación en lodo contaminado con petróleo de Rumaila, lo que nos demuestra una alta actividad del microorganismo en el corto periodo; por otro lado en la investigación realizada por Perera *et al.* (2019) logró un 52,92 ± 8,81% de remoción de hexadecano en 14 días de tratamiento con el *Aspergillus sp.* sin el uso de corriente eléctrica, demostrando la especificidad de este hongo por el hexadecano; observando los resultados obtenidos en la investigación realizada por Contreras y Carreño (2018) donde se obtuvo un 73% de remediación en 90 días de tratamiento con el *Aspergillus sp.* en suelo afectado con hidrocar-

buros de petróleo, evidenciando que en nuestro estudio el uso de una intensidad de corriente eléctrica regulada nos permite obtener una biorremediación en un tiempo significativamente menor.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, en un futuro se podría hacer otro estudio con un consorcio de microorganismos, añadiendo como referencia el estudio realizado por Varjani y Upasani (2016b) en el que comprueba que un consorcio de microorganismos tiene más posibilidades que los cultivos individuales para metabolizar o degradar los hidrocarburos del petróleo. Según Zhao *et al.* (2017), concluye que la aplicación simultánea de varios microorganismos y manteniendo las condiciones adecuadas para estos, nos pueden proporcionar una descomposición mejorada de los hidrocarburos.

## CONCLUSIÓN

En la Región de Loreto es factible la electrobiodegradación del hexadecano presente en un suelo franco arenoso y se obtiene un mejor promedio de rendimiento de eliminación diaria de hexadecano por las esporas de *Aspergillus niger* inmovilizado a una intensidad de corriente eléctrica de 10 mA con un valor de 14975,76 mg/kg.día, lográndose remover hasta el 99,83 % del hidrocarburo en 12 días a temperatura ambiente.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana y al Grupo de Investigación de Ingeniería en Bioprocesos y Biomateriales del Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Megeed, A., Al-Harbi, N. y Al-Deyab. (2010) Hexadecane degradation by bacterial strains isolated from contaminated soils. *African Journal of Biotechnology*, 9(44), 7486-7494.
- Alvarado, J., Navarro, K., Terán, K. y Vizcarra, C. (2015) Electrobiorremediación, una técnica innovadora para la limpieza de suelos contaminados. *Unison, Epistemus*, 18, 96-99.
- Al-Hawash, A. B., Zhang, X. y Ma, F. (2019) Eliminación y biodegradación de diferentes hidrocarburos de petróleo utilizando el hongo filamentoso *Aspergillus sp.* RFC-1. *Microbiología Abierta*, 8 (1), e00619. DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.619>.
- Baldera, J.; Noriega, L. (2018) Electrobiodegradación de suelos contaminados con hexadecano utilizando *Aspergillus niger* inmovilizado. (Tesis de Grado). Universidad Nacional de Trujillo.
- Baztan, M., Pucci, O. y Pucci, G. (2015) Electrobiorremediación de un suelo con una contaminación antigua de hidrocarburo. *Acta Biológica Colombiana*, 20, 145-152.
- Contreras, H. y Carreño, C. (2018) Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.25127/ucni.v1i1.269>.
- Gill, R., Harbottle, M., Smith, J. & Thornton, S. (2014) Electrokinetic-enhanced bioremediation of organic contaminants: A review of processes and environmental applications. *Elsevier, Chemosphere*, 107, 31-42.
- Huang, X., Ailijiang, N., Chang, J., Liang, P., Li, P., Wu, Q. y Zhang, X. (2015) Electrical stimulation on biodegradation of phenol and responses of microbial communities in conductive carriersupported biofilms of the bioelectrochemical reactor. *Elsevier, Bioresource Technology*, 201, 1-7.
- Instituto Nacional de Salud (2017) *Atlas para el diagnóstico micológico*. Perú: Ministerio de Salud.

- Li, J., Yuan, G.-L., Li, P., Sun, Y., Yu, H.-H. y Wang, G.-H. (2017) The emerging source of polycyclic aromatic hydrocarbons from mining in the Tibetan Plateau: distributions and contributions in background soils. *Science of the Total Environment*, 584, 64-71.
- Mena, E., Rubio, P., Cañizares, P., Villaseñor, J. y Rodrigo, M. A. (2012) Electrokinetic transport of diesel-degrading microorganisms through soils of different textures using electric fields. *Journal of Environmental Science and Health-Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(2), 274-279.
- Mokhtarani, B., Babaei, S., Mortaheb, H. R. y Tabar Heidar, K. (2016) Effect of electrokinetic on biodegradation of fluorene and phenanthrene in soil. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 13(2), 71-79.
- Murillo, B. (2006) *Diseño de un dispositivo para evaluar y caracterizar la electrorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 1-126.
- Observatorio Petrolero de la Amazonia Norte (2019) *Línea de tiempo: 42 años de explotación petrolera en territorios indígenas de Loreto*. Perú. Disponible en: <https://observatoriopetrolero.org/infografias/linea-de-tiempo-42-anos-de-explotacion-petrolera-en-territorios-indigenas-de-loreto/>
- Parshikov, I., Woodling, K. y Sutherland J. (2015) Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(17), 6971-6986.
- Perera, M., Wijayarathna, D., Wijesundera, S., Chinthaka, M., Seneviratne, G. y Jayasena, S. (2019) La degradación sinérgica mediada por biofilm del hexadecano por una comunidad formada naturalmente que comprende el complejo *Aspergillus flavus* y el grupo *Bacillus cereus*. *Microbiología de BMC*, 19 (1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1460-4>.
- Perupetro (2019) *Informe mensual de actividades setiembre 2019*. Lima. Perú. Disponible en: <https://www.perupetro.com.pe/wps/wcm/connect/corporativo/13fd0531-f5cc-459b-94e9-7a805273b001/2019-09+Informe+Mensual+de+Actividades.pdf?MOD=AJPERES&2019-09%20Informe%20Mensual%20de%20Actividades>.
- Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D. y Pandey, A. (2015) Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology*, 191, 133-139.
- Sánchez, V. (2012) *Evaluación de la actividad catalítica de la biomasa de Aspergillus niger, pre-tratada con un campo eléctrico, en el consumo de hexadecano*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Sánchez-Vázquez, V., González, I., y Gutiérrez-Rojas, M. (2015) Electric field as pre-treatment to enhance the activity of a whole-cell biocatalyst for hydrocarbon degradation in contaminated water. *Chemical Engineering Journal*, 260, 37-42.
- Sherafatmand, M. y Ng, H.Y. (2015) Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresource Technology*, 195, 122.
- Vargas, O., Reyes S., Gómez P. y Diaz J. (2010) *Guías técnicas para la restauración ecológica de ecosistemas*. Grupo de restauración ecológica. Universidad Nacional de Colombia.
- Vaidehi, C., Gomashe, A. y Shrunji, P. (2014) Production of lipase by Immobilized Cells of *Aspergillus niger*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8, 703-707.
- Varjani, S. J. y Upasani, V. N. (2016) Core flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo- and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, 220, 175-182.
- Velasco, N. (2006) *Efecto de un campo eléctrico en la degradación de hexadecano por As-*

- pergillus niger* en un soporte inerte (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Velasco, N. (2011) *Alteración en el metabolismo de Aspergillus niger expuesto a una corriente eléctrica, durante la degradación de hexadecano*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Velasco, N., González, I., Damian, P. y Gutiérrez, M. (2010) Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system. *Elsevier, Biore-source Technology*, 102, 1509–1515.
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez, L. y Torres, F. (2003) Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Biore-source Technology*, 87, 81–86.
- Wackett, L., Brusseau, G., Hueseholder, S. y Hansen, R. (1989) Survey of microbial oxygenase: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2960-2964.
- Zhao, O. Y., Zhang, X. N., Feng, S. D., Zhang, L. X., Shi, W., Yang, Z., Chena, M. M. y Fanga, X. D. (2017). Starch-enhanced degradation of HMW PAHs by *Fusarium* sp. in an aged polluted soil from a coal mining area. *Chemosphere*, 174, 774-780.

### **Conflicto de interés**

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de interés, estando de acuerdo con el orden de los autores y con el contenido de todo el manuscrito del artículo científico.