

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



**INFLUENCIA DE LA GLUCOSA EN EL TIEMPO DE BIODEGRADACIÓN
CON DOS CONCENTRACIONES DE BENZO[a]PIRENO POR *Aspergillus
niger* ATCC 6275**

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. Betsy Indira Galindo Flores

Para optar al título profesional de Biólogo.

ASESORA: M.Sc. Luz Marina Ponce Aranibar

CUSCO - PERÚ

2016

Dedico esta tesis a Dios porque está conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar,

A mis padres, Elizabeth y Marcelino, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento;

A mis hermanos Edshon y Dair, quienes son mi inspiración para superarme cada día.

A Diego por su amor y su paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco la cual abre sus puertas a jóvenes como yo, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

A mi asesora de tesis Luz Marina Ponce Aranibar por el apoyo, guía y paciencia brindada; a mis profesores Griselda Muñoz Duran, Elsa Aguilar Ancori, Jorge Choquenaira Paria y Jorge Acurio Saavedra gracias a sus enseñanzas, apoyo y consejos para el desarrollo de la tesis.

A mis amigos del grupo de investigación de Leismaniosis Lugo, María, Yahanda y Ronal; a mí amigo Paul Iturbe Espinosa por toda su ayuda y a mi amiga más cercana Guisela quien me apoyó en todo momento.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

INDICE GENERAL

RESUMEN

INTRODUCCION

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

JUSTIFICACION

OBJETIVOS

HIPOTESIS

CAPITULO I REVISION BIBLIOGRAFICA	1
1.1.Antecedentes Internacionales	1
1.2.Hidrocarburos policíclicos aromáticos	3
• Concepto y características	3
• Benzo[a]pireno	3
1.3.Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos	6
1.3.1. Surfactantes	7
1.3.2. Co-sustratos	8
1.3.3. Hongos ligninolíticos	9
1.4.Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos por hongos ligninolíticos	9
1.4.1. Enzimas ligninolítica	11
1.4.1.1.Manganeso peroxidasa	11
1.4.1.2.Lignina peroxidasa	12
1.4.1.3.Lacasas	13
1.4.1.4.Citocromos P-450	14
1.4.2. Factores que afectan la biodegradación	16
1.4.2.1.Biodisponibilidad	17
1.4.2.2.Estructura química y concentración del contaminante	17
1.5.Técnica de extracción liquido-liquido de hidrocarburos policíclicos	

aromáticos	18
1.6.Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar	
Benzo[a]pireno	18
1.7. <i>Aspergillus Níger</i>	22
1.7.1. Ubicación taxonómica	22
1.7.2. Características macroscópicas	23
1.7.3. Características microscópicas	23
1.8.Normatividad	25
CAPITULO II MATERIALES Y METODOS	27
2.1.Lugar de ejecución	27
2.2.Materiales	27
2.2.1. Material biológico	27
2.2.2. Equipos	27
2.2.3. Reactivos	27
2.2.4. Materiales de vidrio	28
2.2.5. Otros	28
2.3.Métodos	29
2.3.1. Tipo de investigación	29
2.3.2. Identificación de variables	29
2.3.3. Diseño experimental	30
a. Preparación de inóculo y reactivos	33
b. Instalación del experimento	33
c. Preparación de extracción del benzo[a]pireno	34
d. Medición por HPLC de la concentración remanente de benzo[a]pireno	35
e. Análisis de datos	39
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1.Determinación por HPLC de la concentración de benzo[a]pireno	40
3.2.Determinación de la influencia de la glucosa como co-sustrato en la	
biodegradación del benzo[a]pireno por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	49

3.3. Identificación del tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo [a]pireno por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	54
3.4. Determinación de la biodegradación del benzo[a]pireno con dos concentraciones iniciales	70
3.5. Determinación del porcentaje de biodegradación final en cada tratamiento	74
3.6. Evaluación de la influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	75
CONCLUSION	78
SUGERENCIAS	79
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades físico químicas de Benzo[a]pireno	4
Tabla 2	Clasificación de la IARC para los hidrocarburos policíclicos Aromáticos	6
Tabla 3	Ubicación taxonómica de <i>Aspergillus niger</i>	22
Tabla 4	Interacción de variables independientes y dependiente del diseño experimental	31
Tabla 5	Resultados de los cromatogramas obtenidos por HPLC de las concentraciones de benzo[a]pireno.	40
Tabla 6	Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamientoa A, C y E de los 0, 14 y 28 días	43
Tabla 7	Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamientoa B, D y F de los 0, 14 y 28 días	47
Tabla 8	Valores de las Medias de las concentraciones remanentes de benzo[a]pireno de los tratamientos a los 14 días	49
Tabla 9	Valores de las Medias de las concentraciones remanentes de benzo[a]pireno de los tratamientos a los 28 días	50
Tabla 10	Comparación entre tratamientos testigo, MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i> y MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 14	50

Tabla 11	Prueba ANOVA de un factor entre tratamientos Testigo, MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i> y MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 14.	51
Tabla 12	Prueba Tukey para los tratamientos testigo, MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i> y MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 14.	52
Tabla 13	Comparación entre tratamientos Testigo, MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i> y MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 28.	52
Tabla 14	Prueba ANOVA de un factor entre tratamientos testigo, MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i> y MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 28.	53
Tabla 15	Prueba Tukey para los tratamientos testigo, MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i> y MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 28.	54
Tabla 16	Valores de las medias de las concentraciones de benzo[a]pireno de los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 70 mg/L a los 0, 14 y 28 días.	55
Tabla 17	Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento A (Testigo).	55
Tabla 18	Prueba de ANOVA de un factor para identificar la existencia de una diferencia significativa de la concentración de benzo[a]pireno del tratamiento A (Testigo) frente al tiempo de evaluación.	56

Tabla 19	Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento A (Testigo).	57
Tabla 20	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L + <i>Aspergillus niger</i>).	57
Tabla 21	Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L + <i>Aspergillus niger</i>).	58
Tabla 22	Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L+ <i>Aspergillus niger</i>).	59
Tabla 23	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	60
Tabla 24	Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	61
Tabla 25	Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	61

Tabla 26	Valores de las medias de las concentraciones de benzo[a]pireno de los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L a los 0, 14 y 28 días.	62
Tabla 27	Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento B (Testigo).	63
Tabla 28	Prueba de ANOVA de un factor para identificar la existencia de una diferencia significativa de la concentración de benzo[a]pireno del tratamiento B (Testigo) frente al tiempo de evaluación.	64
Tabla 29	Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento B (Testigo).	64
Tabla 30	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L + <i>Aspergillus niger</i>).	65
Tabla 31	Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L + <i>Aspergillus niger</i>).	66
Tabla 32	Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L+ <i>Aspergillus niger</i>).	66

Tabla 33	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	67
Tabla 34	Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	68
Tabla 35	Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	69
Tabla 36	Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 0 días.	70
Tabla 37	Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 14 días.	71
Tabla 38	Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 28 días.	72
Tabla 39	Porcentaje de biodegradación de benzo[a]pireno por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275 considerando el tipo de tratamiento y el tiempo de evaluación.	74
Tabla 40	Influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación de benzo[a]pireno a dos concentraciones por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275.	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura cíclica de Benzo[a]pireno.	3
Figura 2	Estructura de una micela en disolución.	7
Figura 3	Reacciones de la degradación y/o transformación de los hidrocarburos por hongos.	11
Figura 4	Ciclo catalítico de la manganosa peroxidasa.	12
Figura 5	Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa.	13
Figura 6	Ciclo catalítico de la lacasa.	14
Figura 7	Producción de Quinonas a partir de la oxidación de hongos de Benzo [a]pireno.	15
Figura 8	Productos de transformación de benzo [a] pireno por hongos.	16
Figura 9	Esquema de un cromatógrafo líquido HPLC	19
Figura 10	Cromatograma.	20
Figura 11	Características macroscópicas de la colonia de <i>Aspergillus niger</i> .	23
Figura 12	Fotografía de <i>Aspergillus niger</i> al microscopio Electrónico.	24
Figura 13	Fotografía al microscopio óptico de <i>Aspergillus niger</i> aumento 400X.	24
Figura 14	Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i> .	24
Figura 15	Diseño de investigación experimental factorial.	30
Figura 16	Tapones de algodón, gaza, papel aluminio y papel craft.	34
Figura 17	Componentes de un cromatograma y parámetros más	

	característicos para la interpretación de un cromatograma.	36
Figura 18	Cromatograma de 70 mg/L en el día.	37
Figura 19	Cromatograma de 100 mg/L en el día 0.	38
Figura 20	Cromatograma de 70 mg/L como concentración inicial de benzo[a]pireno (día 0 de los tratamientos A, C y E).	41
Figura 21	Cromatogramas del tratamiento A del día 14 y día 28.	42
Figura 22	Cromatogramas del tratamiento C del día 14 y día 28.	42
Figura 23	Cromatogramas del tratamiento E del día 14 y día 28.	43
Figura 24	Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamientos A, C y E de los 0, 14 y 28 días.	44
Figura 25	Cromatograma de 100 mg/L como concentración inicial de benzo[a]pireno (día 0 de los tratamientos B, D y F).	45
Figura 26	Cromatogramas del tratamiento B del día 14 y día 28.	46
Figura 27	Cromatogramas del tratamiento D del día 14 y día 28.	46
Figura 28	Cromatogramas del tratamiento F del día 14 y día 28.	47
Figura 29	Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamientoa B, D y F de los 0, 14 y 28 días.	48
Figura 30	Comparación entre tratamientos Testigo, MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i> y MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 14.	51
Figura 31	Comparación entre tratamientos Testigo, MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i> y MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA en el día 28.	53

Figura 32	Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento A (Testigo).	56
Figura 33	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L + <i>Aspergillus niger</i>).	58
Figura 34	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	61
Figura 35	Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento B (Testigo).	64
Figura 36	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L + <i>Aspergillus niger</i>).	66
Figura 37	Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L + <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA).	68
Figura 38	Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 14 días.	72
Figura 39	Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 28 días.	72
Figura 40	Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 0, 14 y 28 días.	73
Figura 41	Porcentaje de biodegradación de benzo[a]pireno por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275 considerando el tipo de tratamiento y el tiempo de evaluación.	74

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 la cual inicio con la propagación de la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 6275 en medio papa dextrosa agar (PDA) para la preparación del inóculo, bajo el método de conteo de esporas en la cámara de Neubauer, posteriormente se preparó el medio de sales minerales el cual se distribuyó en 18 matraces conjuntamente con el benzo[a]pireno y con el co-sustrato de acuerdo al tratamiento, finalmente después de esterilizar el medio se le agregó el inóculo y se mantuvieron a los reactores biológicos a temperatura y agitación constante, simultáneamente se realizó la medición por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la concentración inicial de benzo[a]pireno (día 0) para tener una referencia en unidades de mAU*sec.

Se estimaron seis tratamientos, en los tratamientos A y B no se presentó una biodegradación considerable ya que estos son tratamientos Testigo de la experimentación, en cuanto al tratamiento C se observa en el día 14 = 54,4% y día 28 = 57,1% en comparación al tratamiento D en el día 14 = 29,2% y día 28 = 44,6%; finalmente tenemos el tratamiento E donde se observa en el día 14= 75,1% y día 28= 92,6% en comparación al tratamiento F en el día 14= 36,4% y día 28= 77,2%.

Se obtuvieron como resultados que el tiempo de evaluación (día 0, día 14, día 28), las concentraciones iniciales (70 mg/L y 100 mg/L) y la presencia de glucosa como co-sustrato son factores que influyen en la biodegradación de benzo[a]pireno ($\text{sig} \leq 0.05$).

Concluyendo que se presentó una mayor biodegradación de benzo[a]pireno a una concentración inicial de 70 mg/L en el día 28 de evaluación con presencia de glucosa al 10% como co-sustrato.

INTRODUCCION

El avance industrial y el desarrollo de la vida urbana han incrementado la gama de contaminantes ambientales, en consecuencia la creciente concientización pública para cuidar el medio ambiente ha despertado marcado interés, especialmente en el deterioro de la calidad del agua y suelo, aspectos que representan una amenaza extrema a la capacidad de autorregulación de la biosfera (Perez, 2010).

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son un grupo de contaminantes orgánicos persistentes, comúnmente encontrados en emplazamientos industriales. Debido a su toxicidad y persistencia ambiental, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos US EPA incluyó 16 de estos compuestos en la lista de contaminantes prioritarios en 1979 (Keith & Telliard, 1979).

El benzo[a]pireno es un hidrocarburo policíclico aromático formado por 5 anillos bencénicos fusionados que comparten un par de átomos de carbono, constituyendo una molécula plana y que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente (Wade., 2009).

El benzo[a]pireno es producido por la industria petroquímica por ser un componente del petróleo crudo, también se origina a partir de fuentes naturales, por la combustión incompleta de material orgánico en la quema de bosques de coníferas; fabricación de medicamentos, pinturas, plásticos, pesticidas y por diversas actividades antropogénicas (Tinoco *et al.*, 1997; Manahan, 2007, Agency for Toxic Substances & Disease Center, 2009); originando la contaminación por HPAs en suelos y en ambientes acuáticos, siendo el principal grupo de sustancias sintéticas encontradas en drenajes municipales e industriales representando riesgos potenciales por los efectos adversos para el hombre y el ambiente en situaciones de exposición incontroladas.

La presencia de benzo[a]pireno en la biosfera representa un riesgo para el ser humano y para los animales, debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas así como teratogénicas (Tinoco *et al.*, 1997; Manahan, 2007; Sudip *et al.*, 2002).

La biodegradación de compuestos orgánicos específicos es una alternativa real para el control de la contaminación. El uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos

orgánicos recalcitrantes y tóxicos son aplicables tanto al tratamiento de aguas residuales municipales e industriales como a la biorremediación de suelos y acuíferos (Torres *et al*, 1997).

El tratamiento de las aguas residuales de este tipo de industrias debería incluir la remoción de compuestos orgánicos tóxicos recalcitrantes, evitando la propagación de la contaminación al ambiente o los subsecuentes problemas de transporte y confinamiento de residuos tóxicos o rellenos sanitarios. Actualmente se reconoce la importancia de los hongos lignolíticos como agentes biodegradadores entre los que destaca los del género *Aspergillus* (Nelson-Smith, 1973).

El interés en la biodegradación de compuestos bioacumulables es creciente debido a la problemática que representan, también es considerada como una alternativa a los procesos de descontaminación físico-química por ser una tecnología más sencilla, menos costosa así como más respetuosa con el medio ambiente.

Es por ello que el presente trabajo de investigación estuvo encaminado a contribuir en el estudio sobre la influencia de la glucosa en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275, el cual servirá de precedente para futuros trabajos de biorremediación de benzo [a]pireno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La creciente problemática de la contaminación ambiental por compuestos bioacumulables y mutagénicos como el benzo[a]pireno hace necesario el presente trabajo de investigación donde se evaluó la influencia de la glucosa como co-sustrato midiendo progresivamente el remanente de benzo [a] pireno a los 0, 14 y 28 días por HPLC en dos concentraciones del hidrocarburo (70 mg/L y 100 mg/L) y teniendo como agente biodegradador a *Aspergillus niger* ATCC 6275, investigación que contribuirá con el conocimiento de nuevos métodos de descontaminación ambiental menos invasivos y más amigables con el medio ambiente que son una alternativa a los métodos físico-químicos los cuales son costosos y de procesos prologados . En este sentido se plantea la siguiente interrogante:

- ¿Cuál es la influencia de la glucosa en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275?

JUSTIFICACIÓN

Mucho se habla de contaminación ambiental, pero la mayor parte de la población peruana desconoce que convivimos con sustancias orgánicas contaminantes que pueden afectar nuestra salud. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) como es el benzo[a]pireno, están diseminados en varios ecosistemas y son contaminantes de gran importancia debido a su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad.

Dada su naturaleza hidrofóbica, los HAPs están enlazados a partículas de suelos y sedimentos, haciéndolos menos biodisponibles. La degradación microbiológica representa principalmente el mecanismo responsable para la recuperación ecológica de sitios contaminados con HAPs por lo que la biodegradación, se proyecta como el proceso biológico para atenuar la contaminación y la detoxificación (Peng *et al.*, 2008).

Aunque se ha avanzado mucho durante los últimos veinte años, el conocimiento actual sobre el metabolismo fúngico de HAPs es mucho menor que el referente al metabolismo bacteriano. Los hongos son capaces de degradar e incluso mineralizar HAPs de más de 4 anillos aromáticos de forma eficiente. Se ha demostrado que varias especies fúngicas pueden metabolizar HAPs, como *Aspergillus niger* (Llado, 2012).

En este sentido, con el presente trabajo de investigación se busca contribuir al conocimiento sobre la influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275, para una aplicación futura en biorremediación de suelos o aguas contaminadas con benzo[a]pireno.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275.

Objetivos específicos:

1. Determinar la influencia de la glucosa como co-sustrato en la biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275.
2. Identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275.
3. Determinar la biodegradación del benzo[a]pireno con dos concentraciones.
4. Determinar el porcentaje de biodegradación final en cada tratamiento.

HIPÓTESIS

Influye la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275.

CAPITULO I

REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1. Antecedentes internacionales

Hadibarata, T., Ayu, R. (2012) en un estudio realizado en la Universidad Tecnológica de Malasia en Malasia, con el que demostraron la capacidad biodegradadora de *Armillaria* frente al Benzo[a]pireno; emplearon cinco co-sustratos glucosa, fructosa, aserrín, maicena, y melaza de caña durante 25 días. Concluyeron que el mejor co-sustrato es la glucosa con una degradación del 76% y el menos recomendado es la melaza de caña que inhibió el crecimiento del hongo, otra de sus conclusiones fue que no existe relación entre el crecimiento del hongo y la biodegradación del hidrocarburo.

Antequera, A. (2010) Realizó un estudio sobre la biodegradación de hidrocarburos poli aromáticos totales en aguas de la bahía de Amuay, utilizando un hongo lignolítico *Aspergillus flavus* como agente de biodegradación. Para probar la capacidad de biodegradación del hongo probó diferentes medios de cultivo como glucosa, sacarosa, Czapek, agua de bahía y Czapek más agua de bahía. Obteniendo una alta remoción para dos de los medios usados, 67 % para el medio de agua de bahía y un 74% para Czapek más agua de bahía; para la determinación de HAPs empleó la espectrofotometría UVVis GENESYS 10 Vis. Este estudio se concretó en la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda de Santa Ana de Coro, Paraguaná de Venezuela.

Machin, C., Morales, D., Martinez, F., Okoh, A., Trejo, M. (2010) Estudiaron la biodegradación bacteriana, fúngica y mixta del Benzo[a]pireno a tres concentraciones 25ppm, 50ppm y 75 ppm empleando siete microorganismos (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Serratia marcescens*, *Bacillus mycoides* y *Pseudomonas sp.*). Todos los estudios se realizaron en medio extracto de levadura durante 20 días obtuvieron un mayor porcentaje de biodegradación para los hongos en comparación a las bacterias, *Penicillium sp.* 83.84% de biodegradación. Este estudio se realizó en Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

Dan, S., Pei, L., Stagnitti, F., Xian, X. (2006) Determinaron la biodegradación de Benzo[a]pireno a 30 mg/Kg, 55 mg/Kg y 100 mg/Kg en un sistema co-inmovilizado y libre, teniendo como sustrato el suelo más minerales y empleando como biodegradadores a *Mucor sp* y *Bacillus sp* en cultivo mixto, este estudio tuvo una duración de 42 días a 25 °C, resultando una biodegradación de 95,3% para el sistema de co-inmovilizado y 79,6 para el sistema libre. Estudio realizado en La Academia China de Ciencias en China.

Adekunle, A., Uaboni-Egbenni, P., Ajayi, T. (2004) estudiaron la biorremediación en aguas contaminadas en refinerías de Nigeria, donde revelaron como resultado la identificación de hongos como los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus* y especies de *Penicillium*, los cuales han sido identificados como potenciales degradadores del crudo de petróleo. En este caso los hongos analizados demostraron que los hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en el agua fueron degradados, siendo los más representativos el *Aspergillus niger* en primer lugar, presentando la mayor tasa de incidencia de 51,5%, mientras que *Rhizopus nigricans* tuvo la menor tasa de incidencia de 6,0%. Así mismo el *Aspergillus flavus* y *Penicillium notatum* poseían una tasa intermedia de incidencia, siendo 24,2% y 18,2% respectivamente. Es por ello, que estos hongos se han divulgado para ser activos degradadores de petróleo siendo capaces de degradar el petróleo crudo con mayor efectividad que las bacterias.

Bravo, A., Volke, T., Gutierrez, M. (2002) Evaluaron la biodegradación de Benzo[a]pireno a una concentración de 500 mg/L, empleando tres cepas fúngicas aisladas de un medio contaminado con hidrocarburos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger* y una cepa no identificada), los tratamientos se realizaron en medio Czapek mas glucosa. Concluyendo que *Phanerochaete chrysosporium* tiene una mayor capacidad de biodegradación con un 56%. Dichos estudios se realizaron en la Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa, México.

1.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

- **Concepto y características:**

Comúnmente conocidos por sus siglas HAPs, son compuestos químicos formados por dos o más bencenos fusionados. Se conocen unos 100 tipos diferentes de HAPs. La estructura atómica del anillo bencénico les confiere una gran estabilidad (Dagley, 1981; Mariño, 2009).

- **Benzo [a]pireno:**

El Benzo[a]pireno es un HAPs, formado por cinco anillos bencénicos fundidos, pueden tener diferentes orígenes, pero los dos más importantes son la pirolisis, que es la exposición de moléculas orgánicas a altas temperaturas, y la petrogénesis, que consiste en una exposición a menor temperatura pero a presiones mucho más elevadas, durante millones de años *Figura 1* (Blumer, 1976).

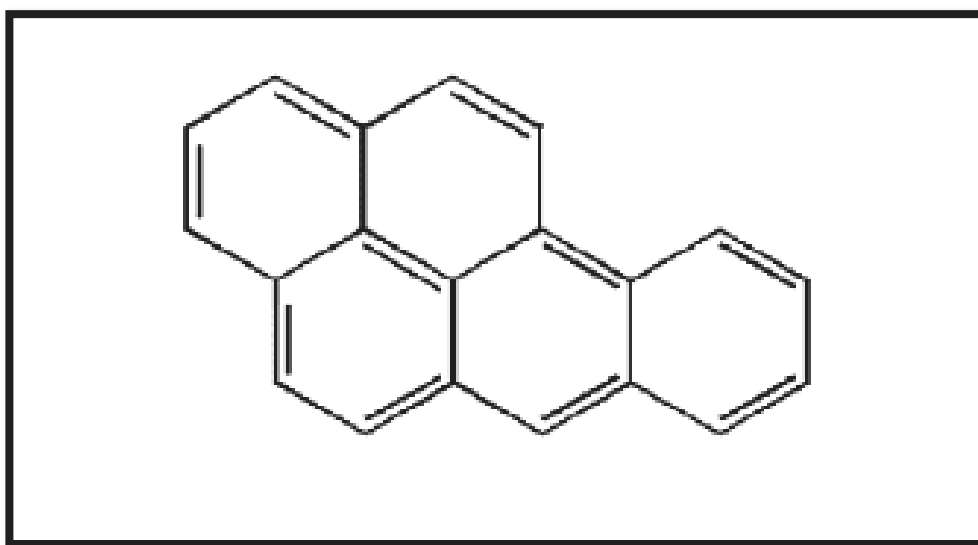


Figura 1. Estructura cíclica de Benzo[a]pireno (Lladó, 2012).

Las características fisicoquímicas de Benzo[a]pireno son las que condicionan su comportamiento, en el medio ambiente. Las dos más importantes son la hidrofobicidad y la recalcitrancia, ambas aumentan como más anillos bencénicos presente la estructura del hidrocarburo. Debido a sus propiedades hidrofóbicas, tiende a adsorberse a las superficies, hecho que dificulta su degradación. Además de su elevada persistencia ambiental, los HAPs suponen un riesgo para la salud pública y en 1979 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US

EPA) incluyó los 16 HAPs de 2 a 6 anillos más frecuentes en su lista de contaminantes de investigación prioritaria (Keith & Telliard, 1979) **Tabla 1**.

Tabla 1

Propiedades físico químicas de Benzo[a]pireno.

COMPUESTO	FORMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	HIDROSOLUBILIDAD	PUNTO DE FUSION	PUNTO DE EBULLICIÓN
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂	252	0,003	178	496

Adaptación de WHO, (1998); EPA, (2007).

El Benzo[a]pireno puede acumularse en la cadena trófica y presentan toxicidad por inhalación, contacto o ingestión (Eisler, 1987). Su baja hidrosolubilidad (Tabla 1) lo convierte en altamente liposoluble, favoreciendo su absorción a través del tracto intestinal de mamíferos y su rápida distribución en los tejidos, preferentemente en el adiposo (Twiss *et al.*, 1999). Posee potencial carcinogénico, mutagénico y genotóxico (tabla 2.), ya que forman aductos con el ADN tras su activación biológica (Goldman, 2001). De entre los 16 HAPs prioritarios de la EPA, el benzo(a)pireno está descrito como uno de los más potentes carcinógenos (Juhasz & Naidu, 2000).

Diversos organismos y agencias han establecido clasificaciones para determinar la carcinogenicidad de sustancias químicas. Actualmente la más aceptada es la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, conocida por sus siglas en inglés IARC. Es una agencia con sede en Lyon (Francia), dependiente de la Organización Mundial de la Salud (International Agency for Research on Cancer).

La IARC considera cuatro grupos principales:

- ✓ **Grupo 1:** sustancias o exposiciones que son cancerígenos para el ser humano.
- ✓ **Grupo 2A:** sustancias o exposiciones que son probables cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo las sustancias que son claramente cancerígenas en experimentación animal pero para las que no hay suficiente información en los seres humanos.
- ✓ **Grupo 2B:** sustancias que son posibles cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo sustancias para las que no hay suficiente información en los seres humanos, y para las que hay pruebas que indican que pueden producir cáncer en animales de experimentación, pero no se puede concluir que sean claramente cancerígenos animales.
- ✓ **Grupo 3:** sustancias para las que no se dispone de suficiente información sobre su capacidad carcinogénica.
- ✓ **Grupo 4:** sustancias que probablemente no son carcinogénicas para los seres humanos.

Cuando una sustancia se clasifica en el grupo 1 significa que no hay duda sobre su potencial para producir cáncer. Deben promoverse acciones de protección de la salud y se deben establecer medidas regulatorias para prevenir la exposición a la misma (Suaterna, 2009).

Tabla 2

Clasificación de la IARC para los hidrocarburos policíclicos aromaticos

GRUPO 1	Benzo[a]pireno.
GRUPO 2A	Ciclopenta[c,d]pireno,Dibenzo[a,h]ant raceno y Dibenzo[a]pireno.
GRUPO 2B	Benzo[j]aceantrileno,Benzo[a]antrace no, Benzo[b]fluoranteno,Benzo[j]fluorant eno, Benzo[k]fluoranteno,Benzo[c]fenantre no, Criseno,Dibenzo[a,h]pireno, Dibenzo[a,i]pireno, Indeno[1,2,3cd]pireno,5-Metilcriseno.

Suaterna, (2009).

1.3.Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Es el resultado de los procesos de digestión, asimilación, y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos. En principio todo compuesto sintetizado biológicamente puede ser descompuesto biológicamente sin embargo, muchos compuestos biológicos (lignina, celulosa) son difícilmente degradados por los microorganismos debido a sus características químicas. De igual manera la biodegradación permite la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, y es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, accediendo la restitución de elementos (carbohidratos, lípidos, proteínas) esenciales en la formación y crecimiento de los organismos (Alexander, 1999).

Dependiendo de tipo de sustrato y de matriz contaminante, así como de la microbiota presente, las estrategias habituales para favorecer la bioestimulación de las poblaciones (humedad óptima, nutrientes en proporciones adecuadas etc.) autóctonas pueden no obtener los resultados que se esperarían, si las condiciones fuesen otras. Como consecuencia de ello, el uso de surfactantes (biológicos y/o químicos) para aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes, de co-

sustratos para añadir una fuente de carbono fácilmente asimilable, para la microbiota capaz de degradar hidrocarburos, o el bioaumentación con hongos lignolíticos para aprovechar su potencial metabólico (Llado, 2012), pueden ser estrategias a tener en cuenta si las condiciones son las adecuadas a escala de laboratorio.

1.3.1. Surfactantes

Una posible forma de aumentar la biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos, como los hidrocarburos, mediante el uso de surfactantes o tensoactivos, que se caracterizan por tener una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Gracias a esta estructura ambifílica, agregados de entre 10 y 200 moléculas, llamados micelas (*Figura 2*), se forman, en solución, cuando la concentración del surfactante está por encima de la concentración crítica micelar (CMC), siendo capaces de disolver moléculas hidrofóbicas en su interior (Llado, 2012).

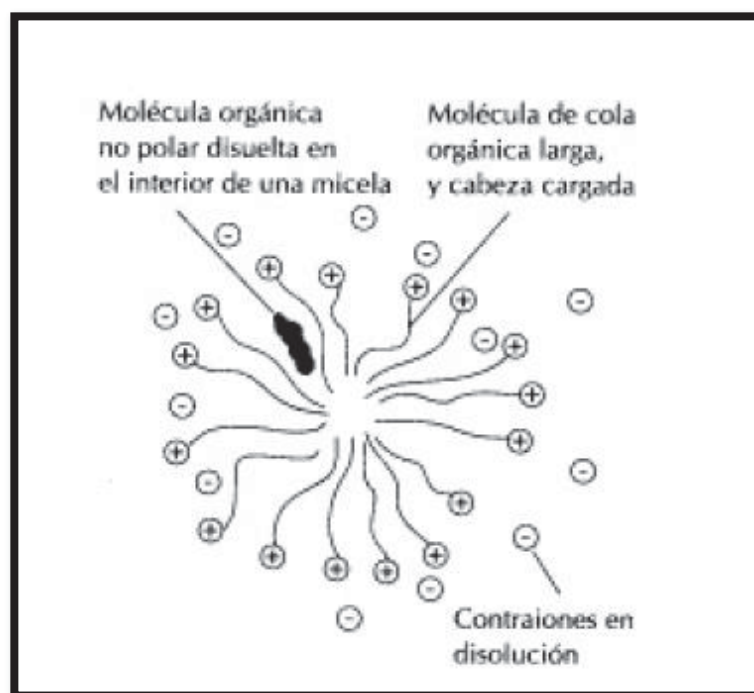


Figura 2: Estructura de una micela en disolución (Llado, 2012).

Dos mecanismos explican el aumento de la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos en presencia de surfactantes. El primero es que aumenta su solubilidad como consecuencia de la fracción lipofílica de las micelas en sustrato

líquido (Edwards *et al.*, 1991) y el segundo es que el transporte del contaminante desde la fase sólida hasta la fase líquida está favorecido en sustrato sólido.

En función de los grupos hidrofílicos que presenten, los surfactantes pueden clasificarse en iónicos y no iónicos. Por otro lado, según su origen se pueden clasificar en químicos (producidos por síntesis química) y biosurfactantes (producidos por microorganismos). Generalmente, los surfactantes no iónicos son menos tóxicos para los microorganismos ya que la carga negativa de la superficie de las células las hace más sensibles a la introducción de surfactantes cargados (Li & Chen, 2009).

Existen muchos trabajos anteriores donde se describe que los surfactantes no iónicos estimulan la biodegradación de HAPs (Kotterman *et al.*, 1998; Marquez *et al.*, 2000; Zheng & Obbard, 2001). Sin embargo, también se pueden encontrar literatura donde los surfactantes inhiben la degradación (Avramova *et al.*, 2008). Este hecho puede ser debido a que los microorganismos no puedan acceder a los hidrocarburos disueltos en las micelas, que los surfactantes puedan resultar tóxicos para la microbiota o incluso que puedan ser utilizados como fuente de carbono y energía (Llado, 2012).

1.3.2. Co-sustratos

Un número considerable de compuestos (glucosa, extracto de levadura, etanol, metanol, piruvato, acetato, etc.) han sido usados en la literatura como co-sustratos en la degradación de hidrocarburos en suelos, sedimentos y agua (Chang *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2007).

Generalmente, la presencia de estos sustratos podría incrementar la presencia de bacterias y hongos autóctonos, y como consecuencia aumentar la biodegradación de los hidrocarburos contaminantes. Además, el co-sustrato puede hacer variar la relación C:N en el suelo, favoreciendo el crecimiento microbiano e incrementando la producción de enzimas involucrados en la degradación de hidrocarburos y sus intermediarios (Lu *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto de los co-sustratos también puede ser adverso, al competir como fuente de carbono y energía con el contaminante (Quantin *et al.*, 2005).

1.3.3. Hongos ligninolíticos

La capacidad para biodegradar y catabolizar la celulosa y hemicelulosa es una característica propia de diversos hongos y otros microorganismos. Sin embargo, al ser la lignina un heteropolímero muy recalcitrante, solamente es mineralizado (transformado hasta dióxido de carbono y agua) en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos (Kirk, 1975).

Estos hongos ligninolíticos, denominados hongos de la pudrición blanca de la madera, comprenden un grupo de organismos cuya característica es su capacidad para mineralizar eficientemente la lignina (Barr, 1994). Presumiblemente, esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía (Have, 2001). Estos organismos secretan varias enzimas extracelulares que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y que en conjunto logran su mineralización (Pointing, 2001).

Los contaminantes recalcitrantes, tales como bifenilos policlorados y explosivos aromáticos (Fernando *et al.*, 1990), los hidrocarburos policíclicos aromáticos como el Benzo [a] pireno (Field, 1993), los plaguicidas clorados (Kennedy *et al.*, 1990) y los plaguicidas organofosforados (Bumpus, 1993), son todos efectivamente mineralizados a CO₂ por varias especies de hongos ligninolíticos. Además, la poca especificidad de las enzimas de estos organismos les permite degradar mezclas complejas de estos contaminantes (Prince, 1993).

1.4. Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos por hongos ligninolíticos

La capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO₂ y H₂O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático que, cuenta con una combinación de enzimas extracelulares, oxidasas y peroxidasas, que contribuyen, en determinadas condiciones, a despolimerizar la compleja estructura de la lignina (De Lorenzo, 1994). La oxidación y ruptura de la molécula de lignina tiene como finalidad principal eliminar dicha barrera química y posibilitar el acceso a los polisacáridos de la madera que constituyen una importante fuente de energía (Johri, 1999).

La peculiar irregularidad estructural del polímero de lignina, hace que estas enzimas se caractericen por unos mecanismos de acción no específicos que oxidan los anillos aromáticos constitutivos de dicho polímero (Huu, 1999). Las enzimas que participan en este proceso son, lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa dependiente de Mn (MnP) y lacasa, una fenoloxidasas que contiene principalmente cobre (Miyamoto, 1997).

El patrón de expresión de esas actividades enzimáticas depende de los diferentes organismos, mientras unos secretan LiP y MnP (no producen lacasas), otros secretan MnP y lacasas (no producen LiP). Existen otras enzimas asociadas con las anteriores en la degradación de lignina de una manera indirecta, glioxal oxidasa y superóxido dismutasa que producen H₂O₂, compuesto requerido para la actividad de LiP y MnP como se observa en la **Figura 3** (Minowa, 1995).

Finalmente, otras enzimas actúan como nexos de unión entre las distintas vías de degradación de la lignocelulosa glucosa oxidasa, aril alcohol oxidasa, celobiosa quinona oxidoreductasa y celobiosa deshidrogenasa han propuesto un modelo de interacción de estas enzimas en el proceso de degradación de lignina por hongos ligninolíticos (Minowa, 1995).

La intensa actividad oxidante de estas enzimas les otorga una considerable capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con una estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina. Entre los diferentes xenobióticos que pueden ser transformados por hongos ligninolíticos, se encuentran fundamentalmente: pesticidas, hidrocarburos aromáticos (benzo - pireno, fenantreno, pireno, etc.) compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados) azocolorantes, entre otros (Bezalel, 1996).

Como se mencionó anteriormente, entre las enzimas más comunes que intervienen en la degradación de los hidrocarburos, están las peroxidases, principalmente la manganeso (MnP) y la lignina peroxidasa (LiP). Las cuales realizan, la oxidación de la lignina en presencia de H₂O₂ (Buswell y Odier, 1987).

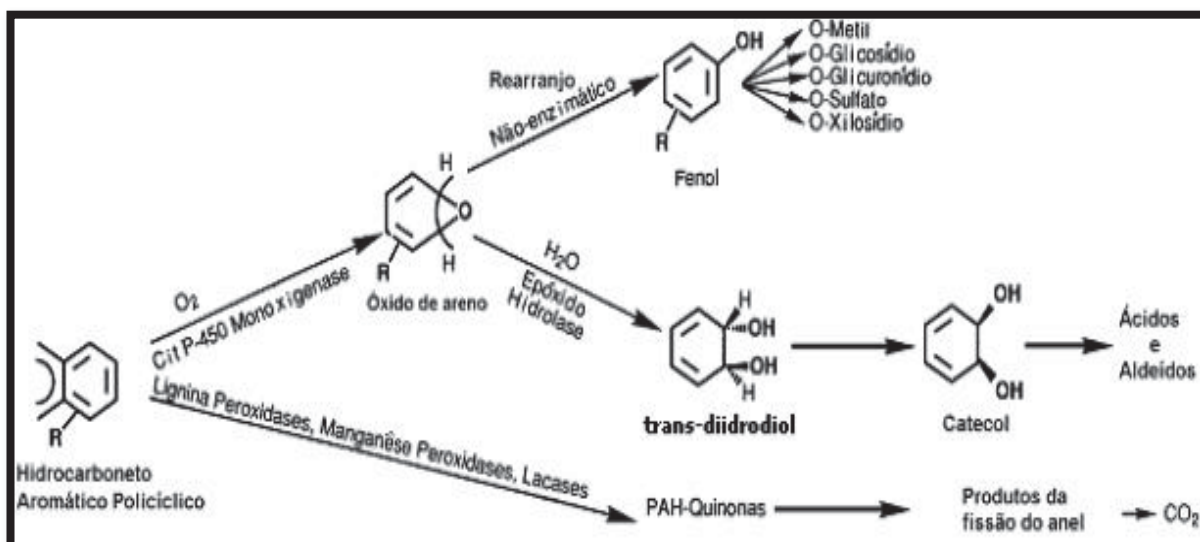


Figura 3: Reacciones de la degradación y/o transformación de los hidrocarburos por hongos (Adaptado de Cerniglia, 1997).

1.4.1. Enzimas ligninolíticas

1.4.1.1. Manganeso peroxidases (MnP)

Son proteínas con grupo hemo que catalizan la oxidación del Mn^{2+} . La MnP es oxidada por 2 electrones del H_2O_2 para generar un intermediario conocido como compuesto I. El compuesto I puede oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} o puede oxidar substratos fenólicos a sus correspondientes radicales, siendo la enzima reducida al intermediario oxidado con un electrón, conocido como compuesto II. Este compuesto II tiene un absoluto requerimiento de Mn^{2+} como reductor, y por la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} la enzima pasa a su estado reducido (Kuan, *et al.*, 1993; Wariishi, *et al.*, 1989). El Mn^{3+} , quelado por un ácido orgánico, es un oxidante capaz de oxidar una gran variedad de substratos fenólicos como se observa en la **Figura 4** (Kishi, *et al.*, 1994).

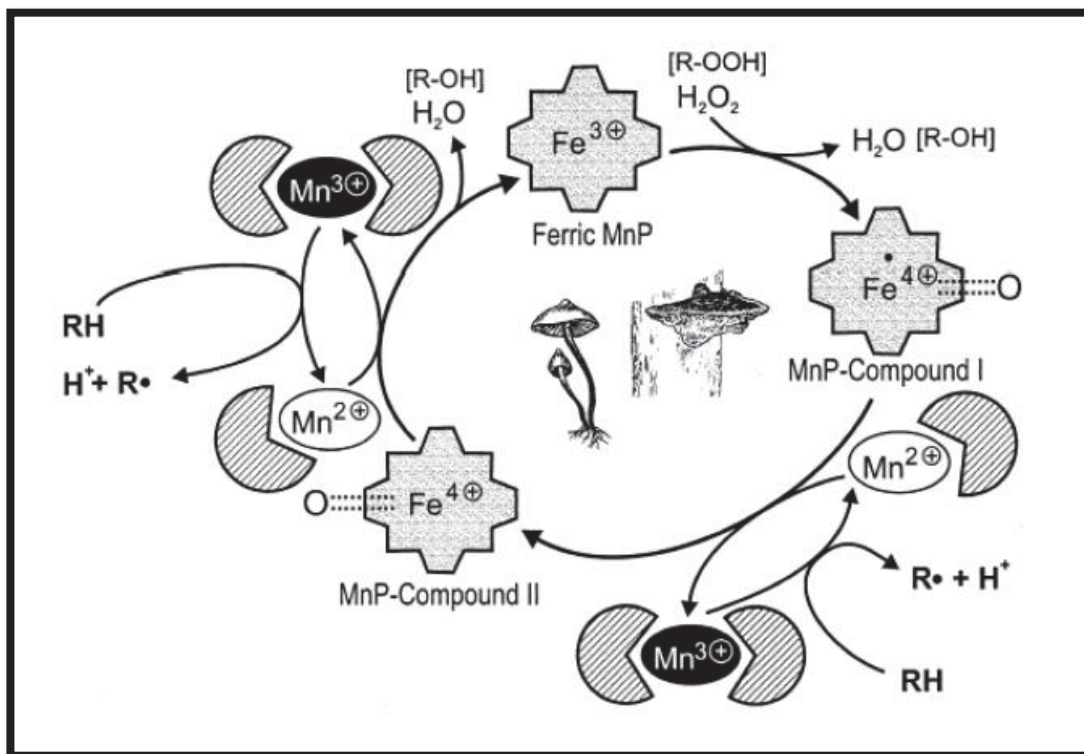


Figura 4: Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa (Hofrichter, 2002).

1.4.1.2. Lignina peroxidasa (LiP)

Es una glicoproteína, inespecífica y extracelular, dependiente de H₂O₂, contiene un mol de protohemo IX por mol de enzima y se encuentra como una serie de isoenzimas (Wariishi y Gold, 1990). Esta enzima actúa por extracción de electrones sencillos de anillos aromáticos de lignina, llegando a la generación de un radical catiónico y al subsecuente rompimiento de los anillos. La enzima interviene también en reacciones de degradación de varios compuestos aromáticos (Bonnarme y Jeffries, 1990).

En el ciclo catalítico el Fe (III) unido a una fracción proteica de LiP es oxidado por H₂O₂ al compuesto I y luego se produce la reducción del compuesto I con alcohol veratrilico al compuesto II como se observa en la **Figura 5** (Wariishi, *et al.*, 1991).

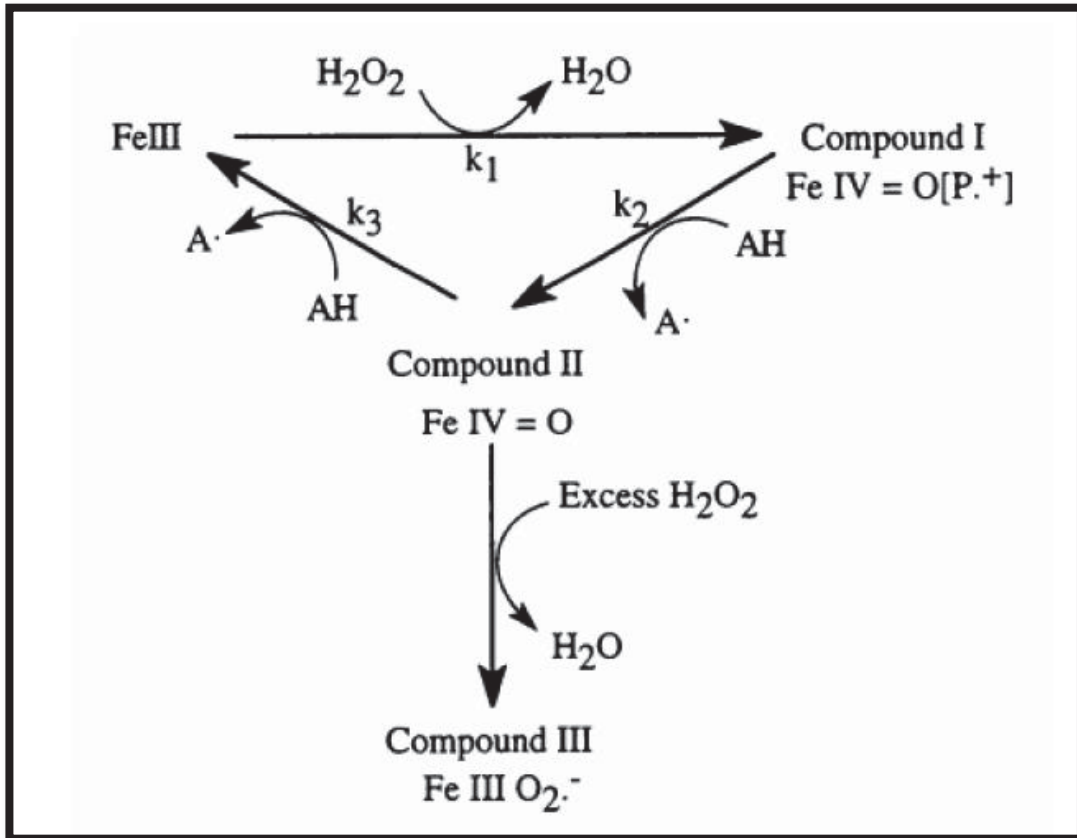


Figura 5: Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa (Castillo, 1997)

1.4.1.3. Lacasas

Pertencen al grupo de las oxidasa azules de cobre, son enzimas de tipo fenoloxidasas cúpricas que contienen cuatro átomos de cobre, los cuales tienen un papel importante en los mecanismos catalíticos de la enzima que se distribuyen en diferentes sitios de la molécula. Las lacasas se han clasificado en tres tipos, lacasa tipo 1 ó azul, tipo 2 ó normal y tipo 3 ó cobre binuclear (Johannes, 2000). En la reacción típica de una lacasa fúngica, el sustrato está sujeto a la oxidación de un electrón para dar un radical oxiaril: por ejemplo, el fenol se oxida para formar el radical fenoxilo, acompañado de la reducción del oxígeno molecular a agua. En la **Figura 6** se observa que las lacasas catalizan la oxidación de compuestos fenólicos como no fenólicos y son capaces de mineralizar un amplio rango de colorantes sintéticos (Abadulla, *et al.*, 2000).

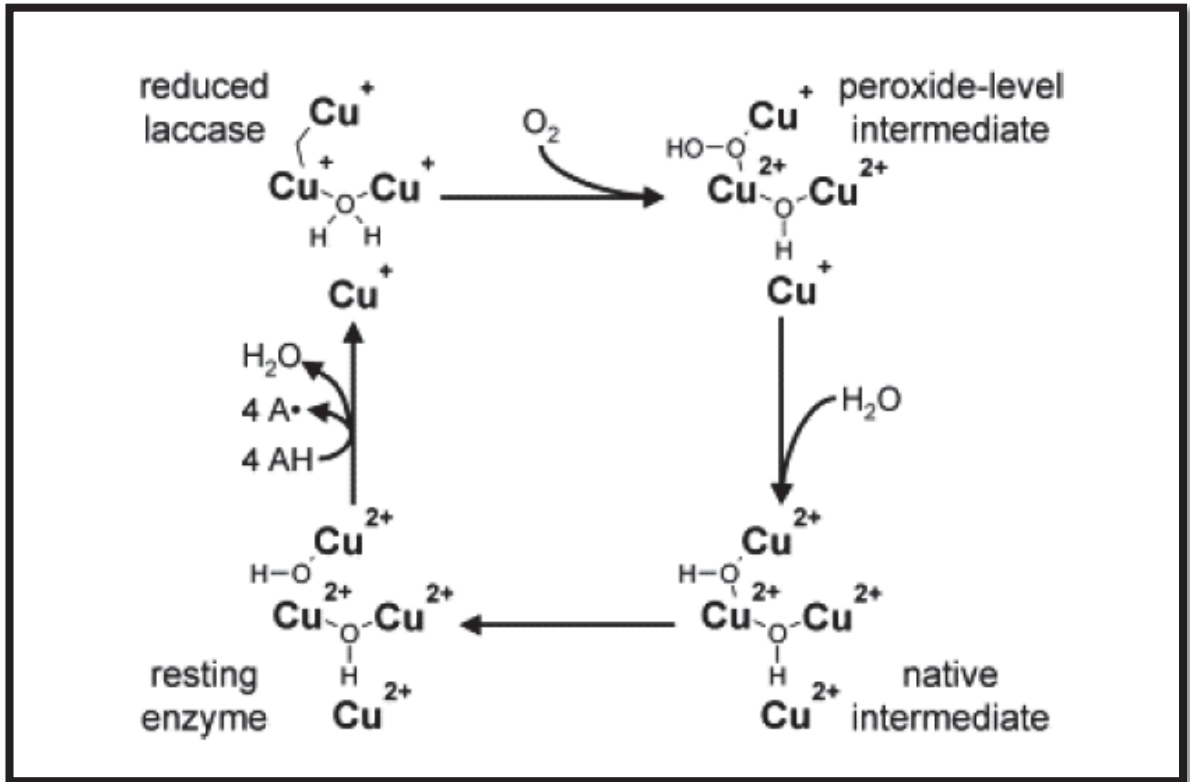


Figura 6: Ciclo catalítico de la lacasa (Wesenberg *et al.*, 2003).

1.4.1.4. Citocromo P-450

El citocromo P-450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. No se trata de un único enzima, sino que en realidad es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes. P-450 interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, también es capaz de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis. Salvo contadas excepciones, el P-450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato. Se trata de reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua. Entre las oxidaciones catalizadas por el P-450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas como se observa en la **Figura 7 y 8** (Omura, 1999).

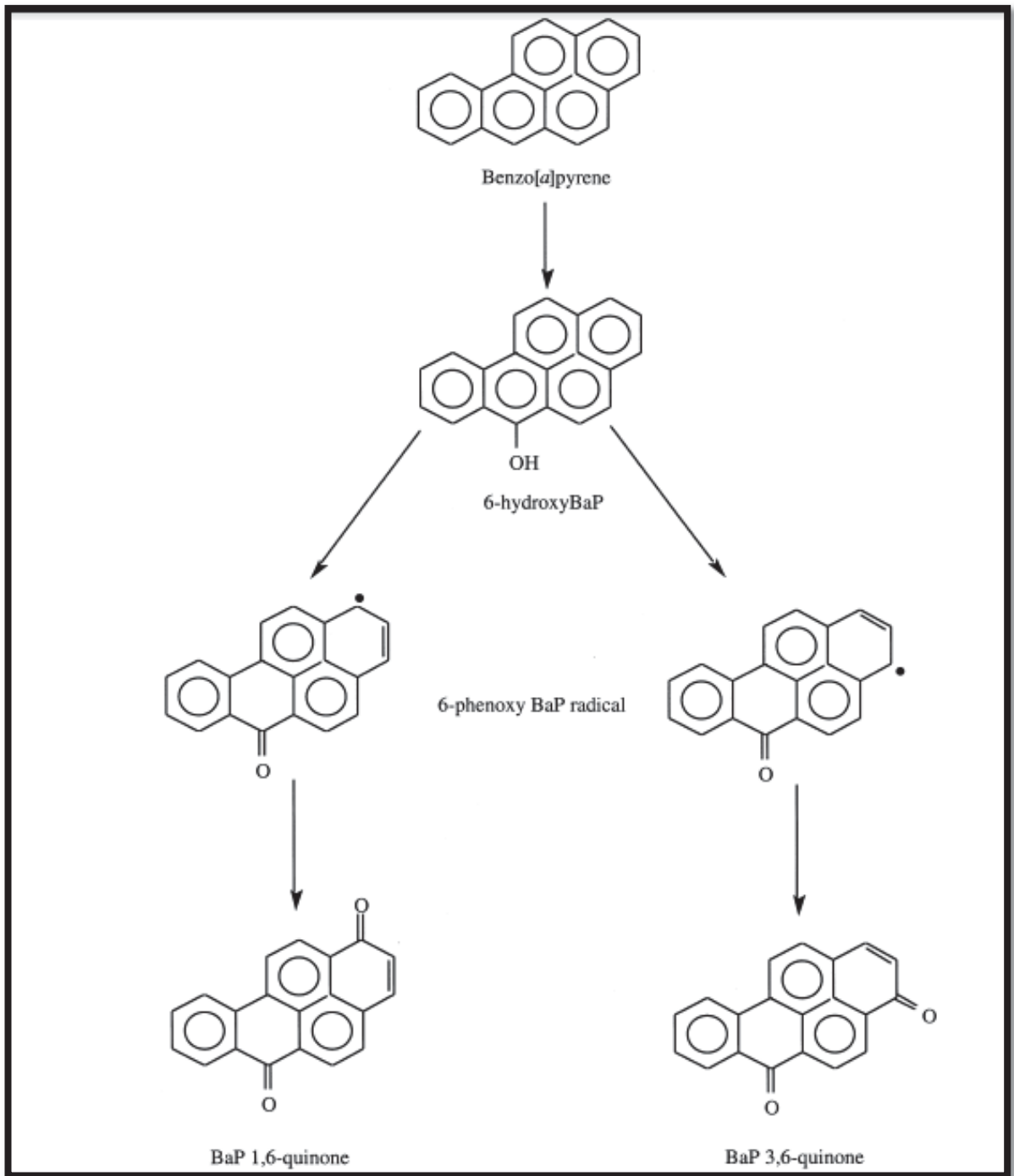


Figura 7: Producción de Quinonas a partir de la oxidación de hongos de Benzo [a]pireno (Adaptado de Cerniglia, 1997).

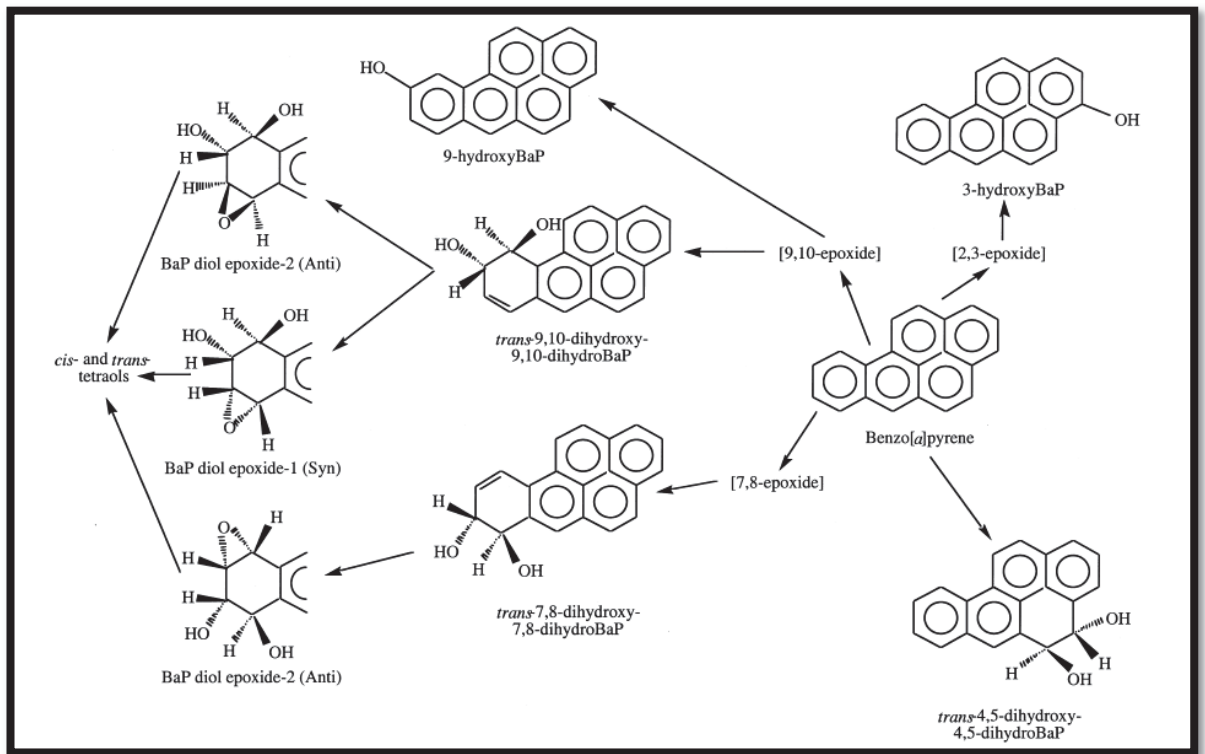


Figura 8: Productos de transformación de benzo [a] pireno por hongos (Adaptado de Cerniglia, 1997).

1.4.2. Factores que afectan la biodegradación

Teniendo en cuenta que la biorremediación depende de la velocidad de biodegradación de los contaminantes es necesario considerar los factores que afectan la biodegradación (Ercoli *et al.*, 2002).

La biodegradación de contaminantes depende de factores abióticos y bióticos y es un proceso que puede durar horas, días, meses o años según las condiciones. Igualmente los factores abióticos o fisicoquímicos agrupan aquellos que se relacionan con el contaminante (estructura química, concentración y biodisponibilidad) y las condiciones medioambientales (pH, humedad, temperatura, disponibilidad de oxígeno y nutrientes); mientras que los bióticos dependen de los microorganismos (población microbiana y cometabolismo (Atlas, 1981).

1.4.2.1. Biodisponibilidad

La metabolización de las diferentes moléculas y su biodegradación está condicionada a su disponibilidad como sustrato por parte de la célula microbiana; es decir, que la molécula penetre hacia el interior de las células; por tanto el término biodisponibilidad se refiere al contacto entre el xenobióticos o contaminante y el sistema biológico para inducir cualquier efecto (Mahro, 2000). Un requisito indispensable para que las moléculas estén más accesibles a las células microbianas en su solubilización es el sistema acuoso de cultivo, la biodisponibilidad puede ser:

- ✓ Limitada: si el contaminante tiene alguna barrera física o química que impide que el microorganismo pueda introducir la molécula en su interior para metabolizarlo.
- ✓ Positiva: si el contaminante penetra al interior de la célula microbiana para su metabolización.

Un exceso de biodisponibilidad puede inducir toxicidad por exceso de concentración, una estrategia comúnmente utilizada para aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los contaminantes poco solubles en el sistema de cultivo es la utilización de tensoactivos sintéticos (etoxilados, bencenosulfonatos) y microbianos (ramnolípidos, lipopéptidos y emulsanos). Esta estrategia ha sido frecuentemente utilizada en el caso de hidrocarburos, la molécula orgánica penetra al medio intracelular a través de las micelas del tensoactivo. (Cerniglia, 1997).

1.4.2.2. Estructura química y concentración del contaminante

La biodegradabilidad de un compuesto orgánico se debe a que es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono (Viñas. *et al.*, 2002). Si el sitio de acción o ataque del enzima degradativo se encuentra bloqueado (isoprenoides o moléculas sustituidas con grupos voluminosos COOH, CH₃), la reacción no tendrá lugar, disminuyendo entonces la actividad biodegradativa. Los compuestos aromáticos o cíclicos se degradan a partir de la ruptura del anillo. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo aromático (Leahy y Colwell, 1990; Viñas, 2005).

1.5. Técnica de extracción líquido-líquido de hidrocarburos policíclicos aromáticos

La extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos asistida por ultrasonido de extracción por solventes (USAE), metodología original empleada en la presente tesis:

Se extrajo cerca de 1,0 g de aceite de pescado purificado tres veces con 5 ml de acetonitrilo con agitación con vórtice durante 3,0 min y luego por USAE de 5,0 min. Entonces, se centrifugaron las muestras (4000 rpm/5 min) y los extractos combinados se evaporaron hasta obtenida sequedad bajo un flujo de nitrógeno en un Turbo Vap. El residuo obtenido se redisolvió en 0,50 ml de acetonitrilo y se cargó para limpieza en un cartucho C18 previamente acondicionado con 10 ml de acetonitrilo. Los lados del tubo se lavaron con 1 ml adicional de acetonitrilo que se pasó a través del cartucho también. Después de esto, el cartucho se secó bajo un flujo de nitrógeno en un TurboVap por 15 min y se eluyó con 60 ml de diclorometano. Los extractos SPE se evaporaron a sequedad y se redisolvió en 2,0 ml de hexano.

Los extractos se limpiaron de nuevo usando columnas de vidrio de Supelco (Sigma-Aldrich, Madrid, España) que contiene 2,0 g de gel de sílice y 2,0 g de Florisil, previamente acondicionado con 20 ml de n-hexano: diclorometano (1: 1, v / v). HAP se eluyeron con 40 ml de n-hexano: diclorometano (3: 1, v / v) y este extracto se concentró hasta sequedad en un Turbo Vap. los extractos obtenidos se volvió a disolver en 1,0 ml de acetonitrilo y se filtra para el análisis HPLC-FD (Yebra *et al.*, 2012).

1.6. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar benzo[a]pireno

La Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método principal de análisis en muchos tipos de laboratorios. HPLC separa mezclas de compuestos en sus componentes individuales por medio de una interacción del compuesto a través de una fase móvil líquida, y una fase estacionaria inerte. En la **Figura 9** se observan las interacciones entre la fase móvil y la fase estacionaria son diversas y dependen de los tipos de compuestos sometidos a la separación y el grado de separación

que se desea. La salida del sistema de análisis de datos es un cromatograma (Venkatesh *et al.*, 2008).

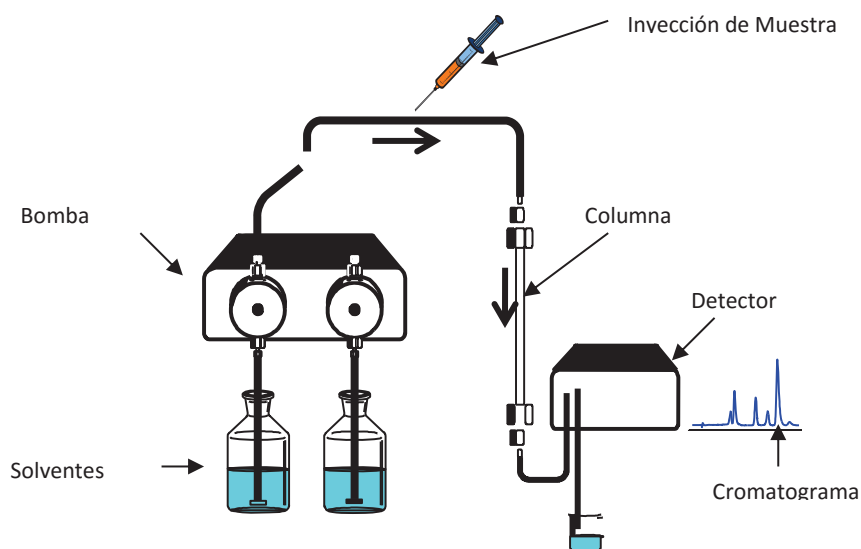


Figura 9: Esquema de un cromatógrafo líquido HPLC (Agilent Technologies Introductions to HPLC, 2014)

El cromatograma es el registro que se obtiene del proceso cromatográfico. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 17, donde el pequeño pico al comienzo es para el soluto sin restricciones y muestra el punto en el que la inyección ha sido detectada (cambio en la presión del sistema). El eje “x” representa el tiempo y el eje “y” representa la respuesta del detector (Agilent Technologies Introductions to HPLC, 2014).

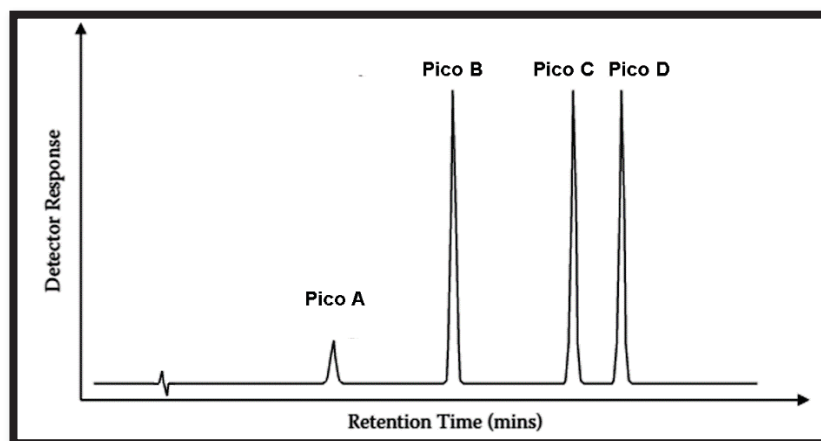


Figura 10: Cromatograma (Bayne & Carlin, 2010).

Un sistema cromatográfico consta de cuatro componentes, como sigue:

a) Dispositivo para la introducción de la muestra

La introducción de la muestra en la columna requiere que una cantidad medida de muestra sea añadida a la fase móvil que fluye, la inyección de la muestra debe ser precisa, exacta y automática. Para tales aplicaciones, se utiliza un muestreador automático o inyector manual, este último muy popular en el pasado, rara vez se utiliza hoy en día (Snyder *et al.*, 2010).

b) Fase móvil

El parámetro más importante para el control de la cromatografía líquida es la composición del eluyente. La Cromatografía líquida es un método de separación de gran alcance con posibilidades ilimitadas en la selección del eluyente. Sin embargo, no es fácil elegir un eluyente adecuado dentro de un corto período de tiempo sin una serie de experimentos de prueba. El factor crucial es controlar la solubilidad de los analitos en el eluyente. El aumento de la solubilidad de los analitos en el eluyente disminuye sus tiempos de retención. La selección de los componentes de un eluyente está en base a las propiedades de los analitos a ser separados como hidrofobicidad, momento dipolar, enlaces de hidrógeno, ionización, y los efectos estéricos (Hanai, 1999).

c) Fase estacionaria

El sistema más popular con más del 50% de las separaciones, es la cromatografía líquida de fase inversa sobre gel de sílice octadecil enlazado. Los analitos son retenidos en la fase estacionaria en base a su hidrofobicidad. Esto significa que los compuestos polares se eluyen más rápido que los compuestos no polares. Cuanto mayor es la hidrofobicidad de la superficie de la fase estacionaria, más tiempo serán los tiempos de retención de los analitos apolares. La unión de grupos donantes de electrones sobre la superficie de la fase estacionaria, produce una retención más fuerte de los compuestos que contienen dipolos. En algunos casos, las interacciones entre los grupos silanol no tratados en la fase estacionaria y los grupos hidroxilo en el analito aumentan la selectividad; sin embargo, los grupos polares en la fase estacionaria son generalmente eliminados para obtener sustancias inertes en esta fase, los cuales son más estables en operaciones a largo plazo (Hanai, 1999).

d) Detector

La detección de los componentes separados es un paso crucial en el procedimiento cromatográfico, ya que proporciona información sobre el carácter de las moléculas. Las características principales de un detector eficaz son: selectividad, especificidad, sensibilidad, estabilidad y linealidad. Es importante que el detector no destruya la muestra, aunque esto no se aplica a algunos detectores como el espectrómetro de masas por Impacto Electrónico (IE), ionización por Electro Spray (ESI) y ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), entre otros (Hefrman, 2004).

El uso del detector por alineamiento de fotodiodos (PDA) o arreglo de diodos DAD, detecta a múltiples longitudes de onda mostrando absorbancia UV-Vis. Facilita la identificación y la pureza de los picos, es el detector preferido para el desarrollo de métodos (Michael, 2006)

Puede ser operado a velocidades rápidas (hasta 40 Hz). En los últimos años la sensibilidad fue mejorada en la adquisición de datos, actualmente es muy común en los equipos HPLC (Corradini, 2012).

1.7. *Aspergillus niger*

La especie *niger* del género *Aspergillus* es miembro de la clase tentativa Deuteromycetes, están ampliamente distribuidos en la naturaleza: frutas, verduras u otros substratos les sirven de alimento. Tienen importancia económica porque se les usa en muchas industrias para la hidrólisis de almidón, en la fermentación que incluye la producción del ácido cítrico y el ácido glucónico; y actualmente está siendo estudiado por su producción de enzimas lignolíticas las cuales pueden ser empleadas para degradar contaminantes recalcitrantes (Landazábal, 2004).

1.7.1. Ubicación taxonómica

Como características utilizadas en la clasificación están: el color de la cabeza conidiana, la forma de la vesícula, los cambios que se dan en el conidióforo y forma de las células en nuez (Hulle) cuando están presentes y la existencia o no de esclerotes y estructuras asexuadas (Velez, 1989).

Tabla 3

Ubicación Taxonómica de *Aspergillus niger*.

Dominio	Eucharya
Reino	Fungi
División	Amastigomycota
Forma Subdivisión	Deuteromycotina
Forma Clase	Hyphomycetes
Forma Familia	Moniliaceae
Forma Orden	Moniliales
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>Niger</i>

Ainsworth, (1973). The fungi.

1.7.2. Características Macroscópicas de la colonia:

En Agar PDA a 25 °C la colonia del *Aspergillus niger* es densa, mostrando canales o surcos de longitudes variables; crece con un diámetro de 2.5 a 3.5 cm en 7 días. Las colonias crecen rápidamente, el micelio basal compuesto es de color amarillo y da origen a estructuras conidiales negras; las cabezas conidiales son grandes, negras y globulares, las cuales después de un tiempo se hacen radiadas o se rompen para formar conidios sueltos (Klich *et al.*, 1988).



Figura 11: Características Macroscópicas de la colonia de *Aspergillus niger* (Maccas & Méndez, 2012).

1.7.3. Características microscópicas

Aspergillus niger presenta las siguientes características microscópicas (Samson *et al.*, 1984).

- **Cabeza conidial:** es radiada y está formada por una vesícula, las fialides y las conidias; las conidias son globulares con un diámetro de 4 a 5 μm con un color amarillento o ligeramente marrón cerca de los ápices.
- **Vesículas:** De forma globular y mide alrededor de 30 a 75 μm de diámetro, origina esterigmas (fialides) en toda la superficie.
- **Esterigmatas (fialides):** células formadoras de conidias (fialosporas) que se forman sobre la vesícula de esterigmatas II. Se encuentran en dos series (biseriadas). Las primeras son largas (30 μm por 6 μm) de color pardo y pueden ser tabicadas. Las segundas son cortas (8 μm por 3 μm) y de ella brotan conidias.

- **Conidias (fialosporas):** Son de forma globular con un diámetro de 4 a 5 μm , su color varía de castaño a negro y su superficie es rugosa.
- **Micelio:** Compuesto por hifas septadas, pueden ser de colores claros o fuertemente coloreadas.

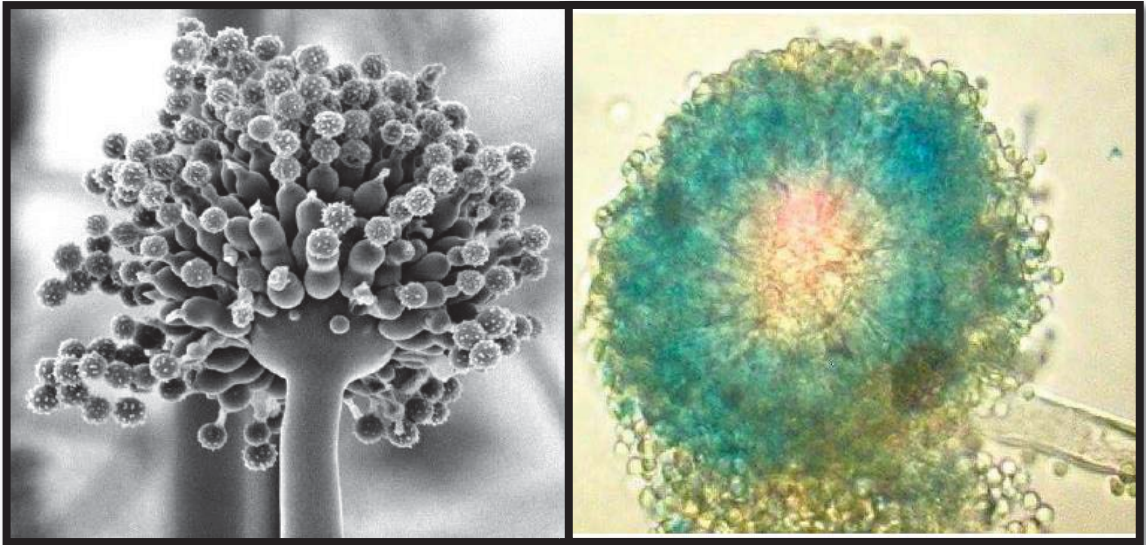


Figura 12: Fotografía de *Aspergillus niger* al microscopio electrónico (Gómez, 2012).

Figura 13: Fotografía al microscopio óptico de *Aspergillus niger*, aumento 400X (Gómez, 2012).

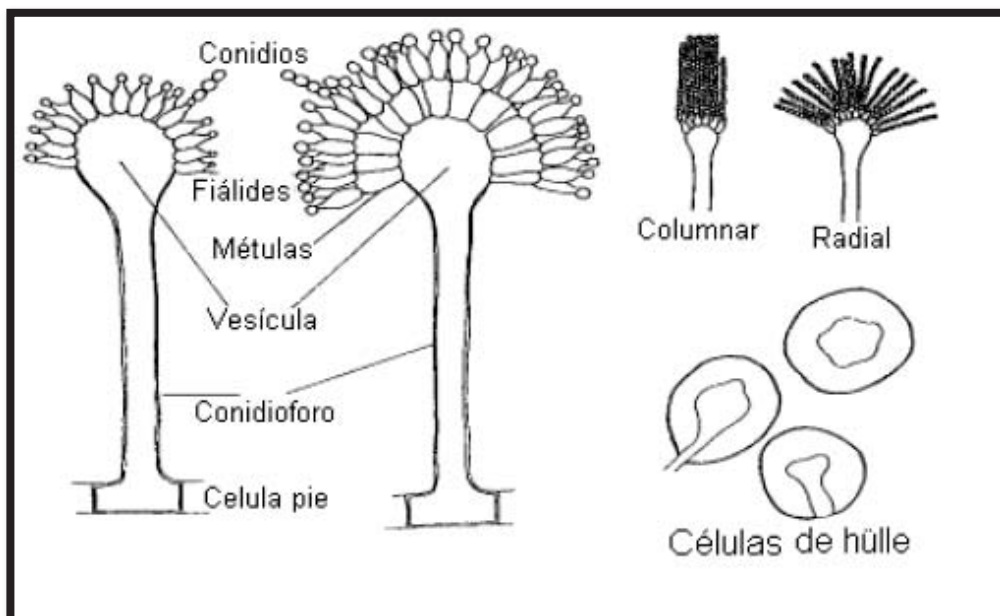


Figura 14: Características microscópicas de *Aspergillus niger* (Gómez, 2012).

1.8. Normatividad

La legislación de la comunidad Europea considera un grupo de 6 HAPs, (Fluoranteno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-c.d]pireno y Benzo[g,h,i]perileno), como aquellos que de ser identificados y cuantificados de forma conjunta en muestras acuosas. La concentración máxima admisible para este conjunto de sustancias es de 0.0001 mg/L según la directiva europea, relativa a la cantidad de las aguas destinadas al consumo humano. La Organización Mundial de la Salud también recomienda el análisis conjunto, para aguas domésticas, de los mismos HAPs que están legislados en la Comunidad Europea. La máxima concentración admitida en aguas de bebida según esta organización es de 0,0007 mg/L de Benzo[a]pireno, uno de los HAPs más peligrosos para la salud (EC, 2001).

La Directiva 96/62/CE de la EU sobre la evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, establece una lista de los contaminantes atmosféricos que incluye los PAH's. Más adelante, la Directiva 2004/107/CE estableció un límite máximo de 1 ng.m⁻³ para el benzo[a]pireno, como indicador del riesgo cancerígeno en aire ambiente (UE, 1996, 2004).

En relación a los suelos la Comunidad Europea contempla los siguientes valores, suelos para uso industrial 2 mg/Kg, urbano 0.2 mg/Kg y agrícola 0.02 mg/Kg, también establecieron los estándares en organismos del suelo 0.15 mg/Kg y organismos acuáticos 0.01 mg/Kg ; ya que el Benzo[a]pireno es un compuesto bioacumulable (EC, 2001).

En el Perú, el artículo 31° de la Ley N° 28611 establece los estándares de calidad ambiental para el suelo en relación al Benzo[a]pireno los cuales son 0,1 mg/kg para suelos agrícolas, 0,7 mg/kg para suelos empleados para residencial o parques y 0,7 mg/kg para suelos de uso comercial o industrial. La misma ley establece estándares de calidad para el agua en relación al mismo compuesto; 0,0007 mg/L para aguas que se pueden potabilizar con desinfección y 0,0007 mg/L para aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional (Ley n°. 28611, Ley General del Ambiente).

En relación a los cuerpos de agua, la ley peruana indica que los hidrocarburos no deben estar presentes a concentraciones que sean detectables por el olor, que

afecten a los organismos acuáticos comestibles, que pueden formar depósitos de sedimentos en las orillas o en el fondo, que puedan ser detectados como películas visibles en la superficie o que sean nocivos a los organismos acuáticos presentes.

En cuanto a los efluentes líquidos para las actividades del subsector hidrocarburos el valor para los hidrocarburos totales de petróleo es de 20 mg/L (Ley n°. 28611, Ley General del Ambiente).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Lugar de ejecución

El montaje del experimento se llevó a cabo en los laboratorios de Microscopia (C-241) y Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología y el análisis químico y cromatográfico en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

2.2. Materiales

2.2.1. Material biológico

- ✓ Cepa de *Aspergillus niger* ATCC 6275 – GENLAB DEL PERÚ.

2.2.2. Equipos

- ✓ Incubadora con agitación (IR-300).
- ✓ HPLC Aegilent 1200.
- ✓ Horno Pasteur - P Selecta.
- ✓ Autoclave.
- ✓ pHchmetro – SCHOTT instrument.
- ✓ Balanza analítica – Explorer QHAUS.
- ✓ Baño de ultrasonido Branson 8510.
- ✓ Cámara extractora de gases – Air clean 600.
- ✓ Centrifuga – GreetMed GT 119-100T.
- ✓ Microscopio – Leica.
- ✓ Vortex - VWR.
- ✓ Rotavapor – IKA RV-10.

2.2.3. Reactivos

- ✓ Benzo [a] pyrene – SIGMA ALDRICH Estandar $\geq 96\%$ HPLC.
- ✓ Fosfato di básico de potasio.
- ✓ Fosfato mono potásico.
- ✓ Sulfato de amonio.
- ✓ Azul de metileno.
- ✓ Tween 80.
- ✓ Hexano.

- ✓ Acetonitrilo.
- ✓ Cloruro de sodio.
- ✓ Cloruro de hierro.
- ✓ Cloruro de calcio.
- ✓ Sulfato de magnesio.
- ✓ Glucosa.
- ✓ Sulfato ferroso heptahidratado.
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Agar agar.
- ✓ Papa sin pelar.

2.2.4. Material de vidrio

- ✓ Matraces de 50 ml.
- ✓ Matraz de 500 ml.
- ✓ Matraz de 1000 ml.
- ✓ Pipetas graduadas.
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Placas Petri.
- ✓ Cámara de Neubauer.

2.2.5. Otros

- ✓ Guantes de látex.
- ✓ Mascarilla N95.
- ✓ Gorro quirúrgico.
- ✓ Guardapolvo descartable.
- ✓ Propipeta.
- ✓ Papel aluminio.
- ✓ Asa de siembra.
- ✓ Tubos Eppendorf.
- ✓ Hisopos
- ✓ Gradillas de metal.
- ✓ Papel craft.
- ✓ Pabilo
- ✓ Algodón.
- ✓ Gaza.
- ✓ Mechero Bunsen.

- ✓ Puntas.
- ✓ Micropipeta.

2.3. Métodos

2.3.1. Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental descriptiva. Las unidades experimentales se instalaron en matraces Erlenmeyer conteniendo 20 ml del medio de sales minerales líquido, con dos concentraciones de benzo[a]pireno como variable dependiente y como variables independientes al hongo lignolítico *Aspergillus niger*, glucosa como co-sustrato y tiempo de proceso, se tomó como parámetro de evaluación de la biodegradación la disminución de la concentración del benzo[a]pireno.

2.3.2. Identificación de variables

✓ Variables independientes

- Crecimiento de *Aspergillus niger*.
- Concentración inicial de benzo[a]pireno.
- Glucosa al 10 % como co-sustrato.
- Tiempo de evaluación de biodegradación.

✓ Variable dependiente

- Biodegradación de benzo[a]pireno.

2.3.3. Diseño experimental

El diseño experimental empleado en este trabajo de investigación fue factorial por que se manipulan dos a mas variables independientes este tipo de diseño permite al investigador evaluar los efectos de cada variable independiente sobre la dependiente por separado y los efectos de las variables independientes conjuntamente, a través de estos diseños se observan los efectos de interacción entre las variables independientes (Sampieri *et al.*, 2010)

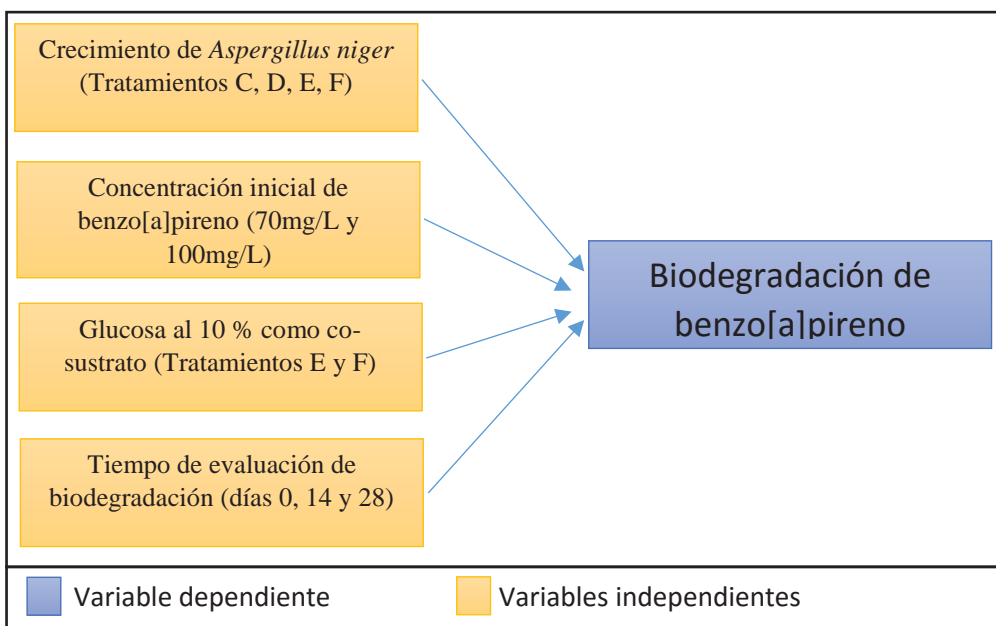


Figura 15: Diseño de investigación experimental factorial (elavoracion propia)

El diseño de investigación de este trabajo fue planteado para tomar como parámetro de evaluación la disminución de la concentración del benzo[a]pireno medido por HPLC y empleando como agente biodegradador al hongo lignolítico *Aspergillus niger*.

Inicialmente se propagó la cepa *Aspergillus niger* ATCC 6275 en medio papa dextrosa agar (PDA) a 28 °C por 7 días, luego de propagar el hongo se realizó la preparación del inóculo bajo el método de conteo de esporas en la cámara de Neubauer, posteriormente se preparó el medio de sales minerales el cual se distribuyó en los 18 matraces (6 matraces del día 0, 6 matraces del día 14 y 6 matraces del día 28) con dos concentraciones de benzo[a]pireno según el tratamiento (70 mg/L y 100 mg/L), de acuerdo a los tratamientos empleados se agregó glucosa como co-sustrato al 10% p/v y finalmente se inoculó el hongo al 10 % v/v. A partir de allí se mantuvo a los tratamientos a temperatura y agitación

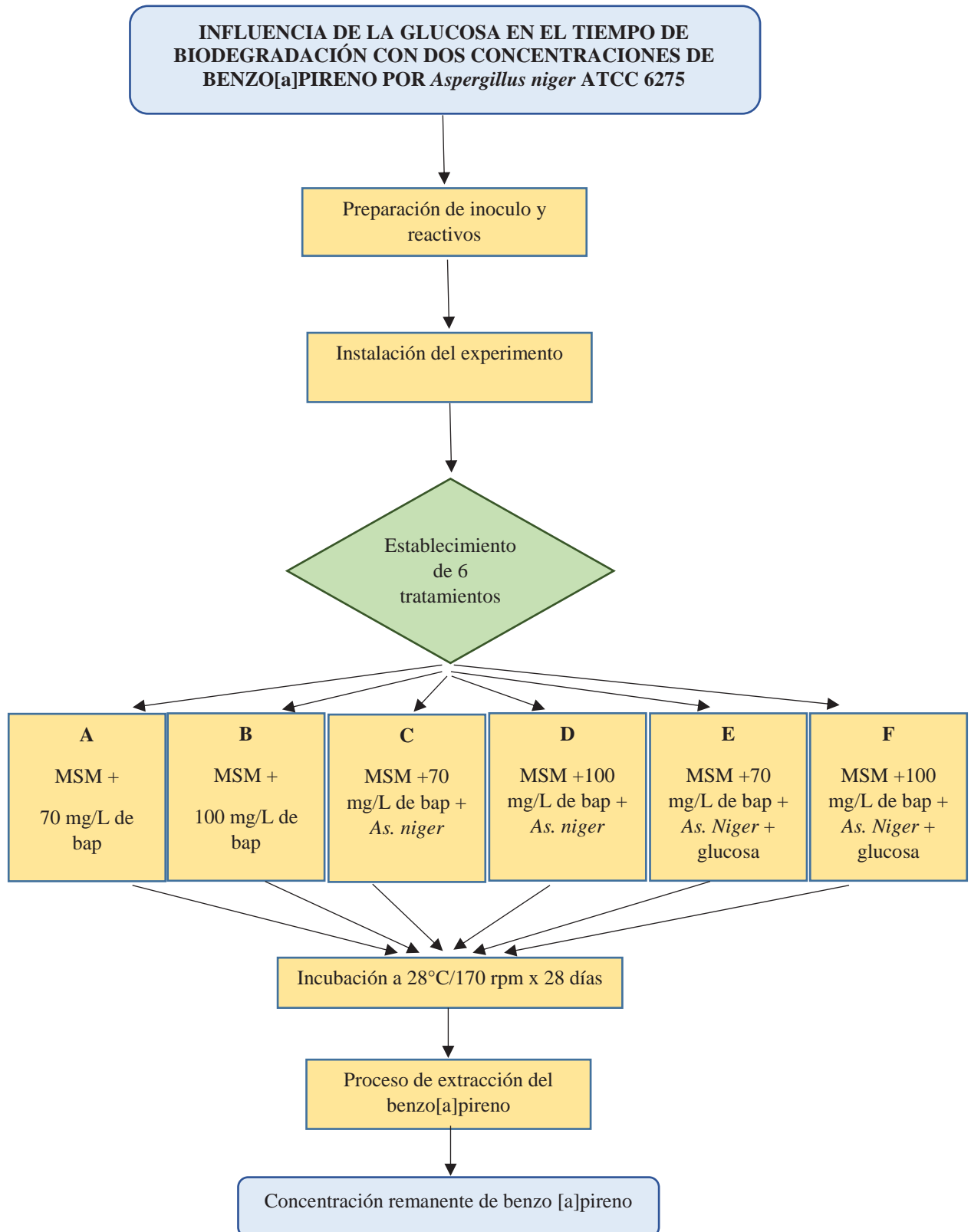
constante, simultáneamente se inició con la evaluación de la concentración de benzo[a]pireno por HPLC del día 0 el cual se repitió el día 14 y día 28 (**Flujograma N° 01**).

Tabla 4: Interacción de variables independientes y dependiente del diseño experimental.

	TRATAMIENTOS		CONCENTRACION EN mg/L	TIEMPO EN DIAS	MUESTRAS	N° LECTURAS
T R A T A M I E N T O S	TESTIGO	A	70	0	A0	3
				14	A1	3
				28	A2	3
		B	100	0	B0	3
				14	B1	3
				28	B2	3
	MSM+ bap + <i>Aspergillus niger</i>	C	70	0	C0	3
				14	C1	3
				28	C2	3
		D	100	0	D0	3
				14	D1	3
				28	D2	3
	MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i> + GLUCOSA	E	70	0	E0	3
				14	E1	3
				28	E2	3
		F	100	0	F0	3
				14	F1	3
				28	F2	3
MSM=medio de sales minerales		bap= benzo[a]pireno	Glucosa al 10% (p/v)			

Elaboración propia.

Flujograma 1: Metodología de la investigación de biodegradación de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* (elaboración propia).



*bap: benzo[a]pireno.

*MSM: medio de sales minerales.

Fuente: elaboración propia.

a) Preparación de inóculo y reactivos

- **Preparación del inóculo**

La cepa de *Aspergillus niger* ATCC 6375 se propagó en medio papa dextrosa agar (PDA) (**Anexo 1**) y se incubó a una temperatura de 28°C por 7 días, Una vez crecidas las colonias, fueron cubiertas con 2 ml de solución tween 80 al 0.1% (**Anexo 2**) para luego frotar con un hisopo estéril la superficie del hongo, de manera firme y suave. Luego se extrajo esta suspensión con una pipeta estéril. La suspensión, compuesta por conidios y fragmentos de hifas se transfirió a tubos Eppendorf estériles y se dejó que las partículas sedimentaran por gravedad durante 20-30 minutos. El sobrenadante de la suspensión fue homogenizado y empleado en la realización de las diferentes pruebas. Se realizó diluciones seriadas y se procedió con el recuento en la cámara de Neubauer (**Anexo 3**) hasta obtener una suspensión de esporas entre $1-5 \times 10^{-6}$ esporas /ml la que se inoculó al medio de sales minerales.

- **Preparación Medio de Sales Minerales (MSM)**

En un matraz de 1000 ml se prepararon 500 ml de medio de sales minerales a base de fosfato di básico de potasio, fosfato mono potásico, sulfato de amonio, cloruro de hierro, cloruro de calcio, sulfato de magnesio y sulfato ferroso heptahidratado (**Anexo 5**); se homogeniza y se somete al fuego hasta la ebullición para después medir el pH que resultó ligeramente ácido de 5.89. Se distribuyó 20 ml del medio a matraces de 50 ml conteniendo benzo[a]pireno en concentraciones de 70mg/L y 100mg/L y glucosa al 10% según el tratamiento correspondiente, finalmente se esterilizó el medio a 121°C por 15 min.

b) Instalación del experimento

Para la instalación del experimento se agregó el inóculo de *Aspergillus niger* correspondiente a cada tratamiento, se trasladaron los reactores biológicos al laboratorio de Microscopia (C-241), donde se incubaron en la incubadora con agitación (IR-300) graduada a 28°C/170 rpm durante 28 días. Para evitar la

evaporación del medio se colocó tapones de algodón, gaza, papel aluminio y papel craft para cubrir la boquilla del matraz y se aseguró con pabilo (**Figura 16**).



Figura 16: Tapones de algodón, gaza, papel aluminio y papel craft (elaboración propia).

c) Proceso de extracción del benzo[a]pireno

Se tomaron 6 matraces A₀,B₀,C₀,D₀,E₀ y F₀ para la primera evaluación que consistió en la extracción, concentración y resuspensión de la muestra el día 0, después de 14 días se volvieron a tomar 6 matraces A₁,B₁,C₁,D₁,E₁ y F₁, finalmente a los 28 días se tomaron los últimos matraces A₂,B₂,C₂,D₂,E₂ y F₂ para la evaluación final, todos las lecturas de los análisis se realizaron por triplicado.

T₀ = día 0

T₁ = día 14

T₂ = día 28

- **Extracción líquido- líquido** (Adaptado de Yebra *et al.*, 2012, Laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría UNSAAC):

- ✓ Se colocaron los matraces en la cámara de ultrasonido por 10 min, luego se le agrego 5 ml de hexano para proceder con la extracción del Benzo[a]pireno, una vez más se pusieron los matraces en el baño de ultrasonido por 10 min y se trasvaso el contenido a tubos con tapa rosca; este procedimiento se realizó dos veces por cada matraz para asegurar la total extracción del HPAs.

- ✓ Se colocó cada tubo en un vortex por 5 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min.
- ✓ Se separó el sobrenadante en frascos rotulados.
- **Concentración de benzo[a]pireno** (Adaptado de Yebra, I *et al.*, 2012, Laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría UNSAAC):
 - ✓ Se colocaron los frascos al rotabapor a una temperatura de 45 °C y una rotación de 20 rpm.
 - ✓ Las muestras se mantuvieron en el rotavapor hasta evaporar completamente el hexano y obtener el benzo[a]pireno concentrado en la base del frasco.
- **Resuspensión de la muestra** (Adaptado de Adaptado de Yebra, I *et al.*, 2012, Laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría UNSAAC):
 - ✓ Para la lectura del HPLC se agregó Acetonitrilo (MeCN) a los frascos para resuspender el benzo[a]pireno, la resuspensión también es conocida como la fase móvil.
 - ✓ Se colocaron todos los frascos en la cámara de ultrasonido por 10 min para que se homogenice la muestra y se trasvasó la fase móvil a un vial para su lectura en HPLC. En base al área que nos mostrarán los picos del HPLC-MS se calculará la capacidad de biodegradación de *Aspergillus niger* expresado en porcentaje (**Anexo 4**).

d) Medición por HPLC de la concentración remanente de benzo[a]pireno

- **Condiciones cromatográficas**
 - Equipo: HPLC Agilent 1200
 - Columna Cromatográfica : Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5um
 - Fase Móvil : ACN (100)
 - Flujo de FM :0.9 mL/ minuto
 - Longitud de Onda : 290 nm
 - Detector : DAD
 - Volumen de Inyección: 30

- **Interpretación de cromatogramas**

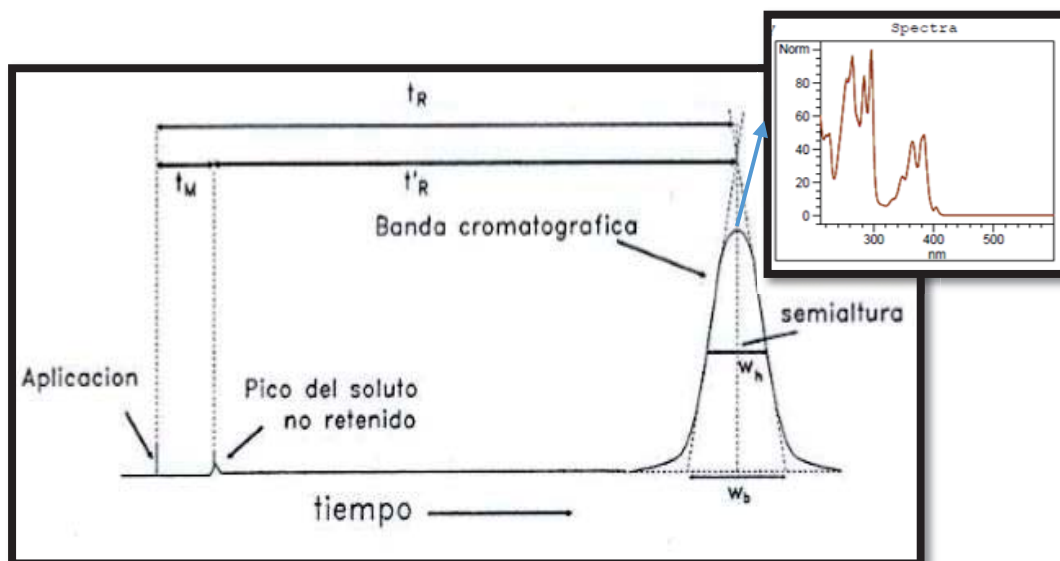


Figura 17: Componentes de un cromatograma y parámetros más característicos para la interpretación de un cromatograma (Adaptado de Albella *et al.*, 1993).

T_R : Tiempo de retención, es el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la detección del máximo número de moléculas de benzo[a]pireno.

T_M : Tiempo muerto, es el tiempo para que la especie no retenida alcance el detector.

Banda cromatográfica: Es el área del pico originado por el espectro de benzo[a]pireno, la lectura esta en unidades de absorbancia por sección de la columna empleada (mAU*sec).

Spectra: Representación espectral de benzo[a]pireno.

- **Conversión del área de benzo[a]pireno en unidades mg/L**

Para determinar la biodegradación del benzo[a]pireno se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por este método se obtuvieron resultados en unidades de absorbancia por sección de la columna empleada (mAU*sec) las cuales se transformaron en mg/L relacionando las cantidades iniciales conocidas para los tratamientos de 70 y 100 mg/L.

Para la conversión de las unidades de absorbancia por sección de la columna empleada para 70 mg/L se hizo la siguiente relación:

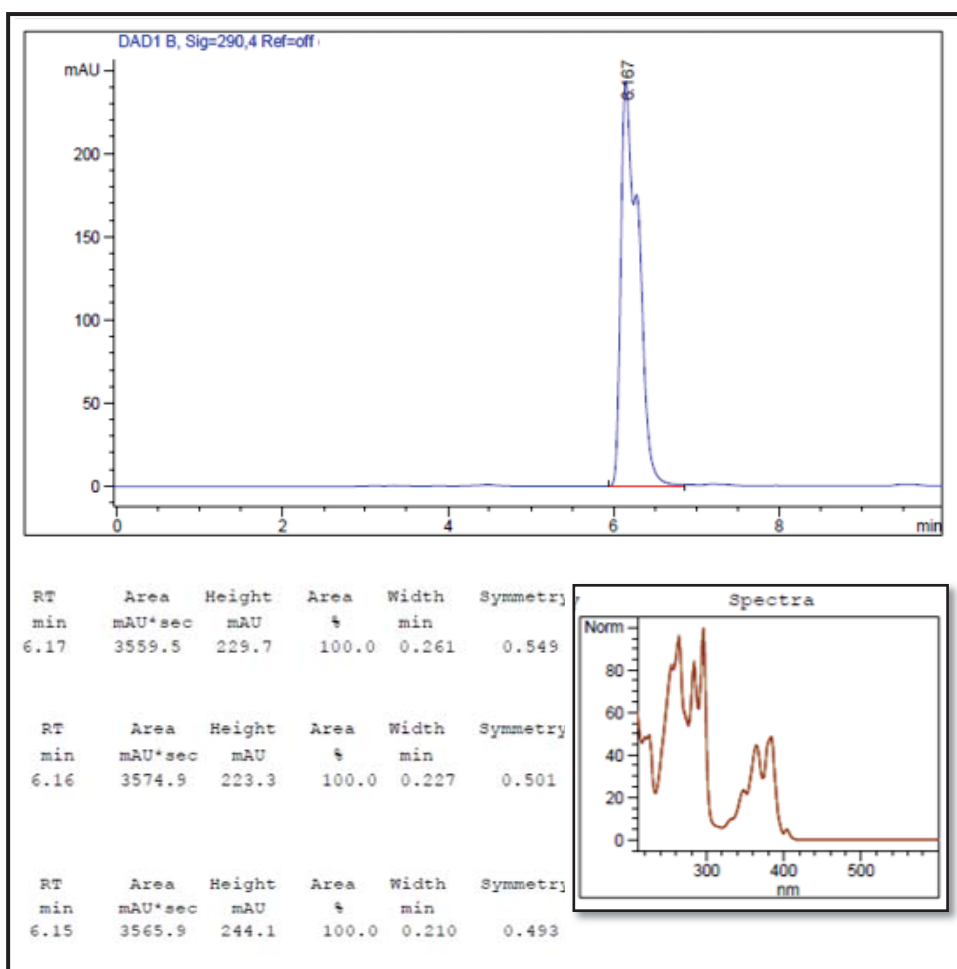


Figura 18: Cromatograma de 70 mg/L en el día 0 (elaboración propia).

*Para 70 mg/L en el día 0 se realizaron 3 lecturas:

Área de lectura en mAU*sec	\bar{x}
3559.5	3566.8
3574.9	
3565.9	

Se hace una relación entre el promedio de las lecturas y la concentración en mg/L:

$$70\text{mg/L} = 3566.8\text{mAU*sec}$$

Para la conversión de las unidades de absorbancia por sección de la columna empleada para 100 mg/L se hizo la siguiente relación:

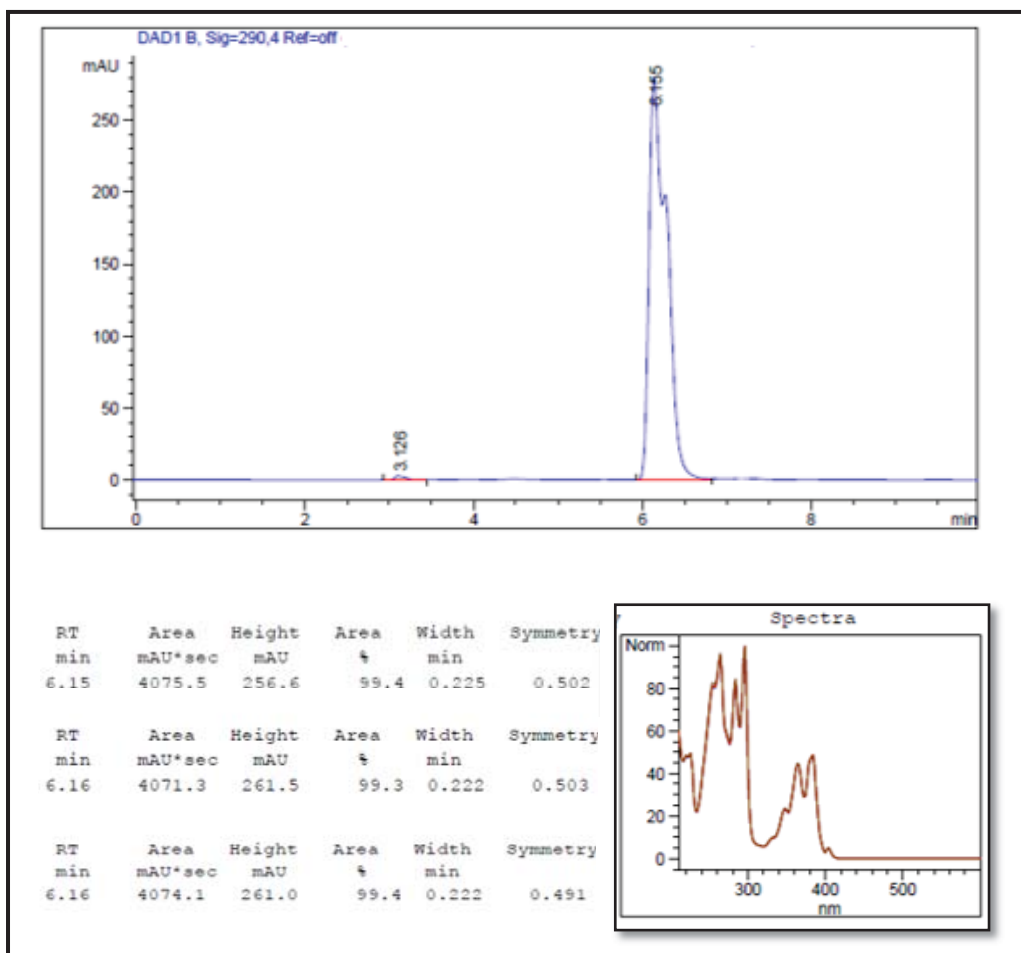


Figura 19: Cromatograma de 100 mg/L en el día 0 (elaboración propia).

*Para 100 mg/L en el día 0 se realizaron 3 lecturas:

Área de lectura en mAU*sec	\bar{x}
4075.5	4073.6
4071.3	
4074.1	

Se hace una relación entre el promedio de las lecturas y la concentración en mg/L:

$$100\text{mg/L} = 4073.6\text{mAU*sec}$$

Fórmula para convertir a mg/L para 70 mg/L:

$$\text{mg/L} = \frac{A \times 70 \text{mg/L}}{\dot{X}}$$

Donde:

A: promedio de las áreas obtenidas de cada tratamiento cuyo valor inicial fuera 70mg/L.

\dot{X} : promedio del área obtenido de 70 mg/L el día 0.

Fórmula para convertir a mg/L para 100 mg/L:

$$\text{mg/L} = \frac{A \times 100 \text{mg/L}}{\dot{X}}$$

Donde:

A: promedio de las áreas obtenidas de cada tratamiento cuyo valor inicial fuera 100mg/L.

\dot{X} : promedio del área obtenido de 100 mg/L el día 0.

Los resultados de los días 14 y 28 se obtuvieron en relación a los del día 0 para ambas concentraciones (70 mg/L y 100 mg/L).

e) **Análisis estadístico**

Para el procesamiento estadístico descriptivo se empleó el promedio y desviación estándar, para el análisis inferencial sobre los objetivos específicos que son la determinar la influencia de la glucosa como co-sustrato, identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación y determinar la biodegradación a dos concentraciones; se utilizó ANOVA y Tukey en los casos que corresponda, para el objetivo general se realizó la prueba de comparaciones múltiples; el análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 22.

La **Tabla 5** además de mostrar los resultados obtenidos por HPLC de los cromatogramas que están en unidades de absorbancia por sección de la columna empleada (mAU*sec), también muestra las conversiones de todos los datos a mg/L y los promedios de las 3 lecturas de cada muestra a los 0, 14 y 28 días de evaluación. A continuación los cromatogramas resultado del análisis por HPLC de la concentración de Benzo[a]pireno de los diferentes tratamientos a los 0, 14 y 28 días de experimentación.

En el día 0 los tratamientos A, C y E tuvieron una misma concentración inicial de benzo[a]pireno que fue de 70 mg/L, la cual se midió por HPLC obteniendo el siguiente resultado cromatográfico **Figura 20**.

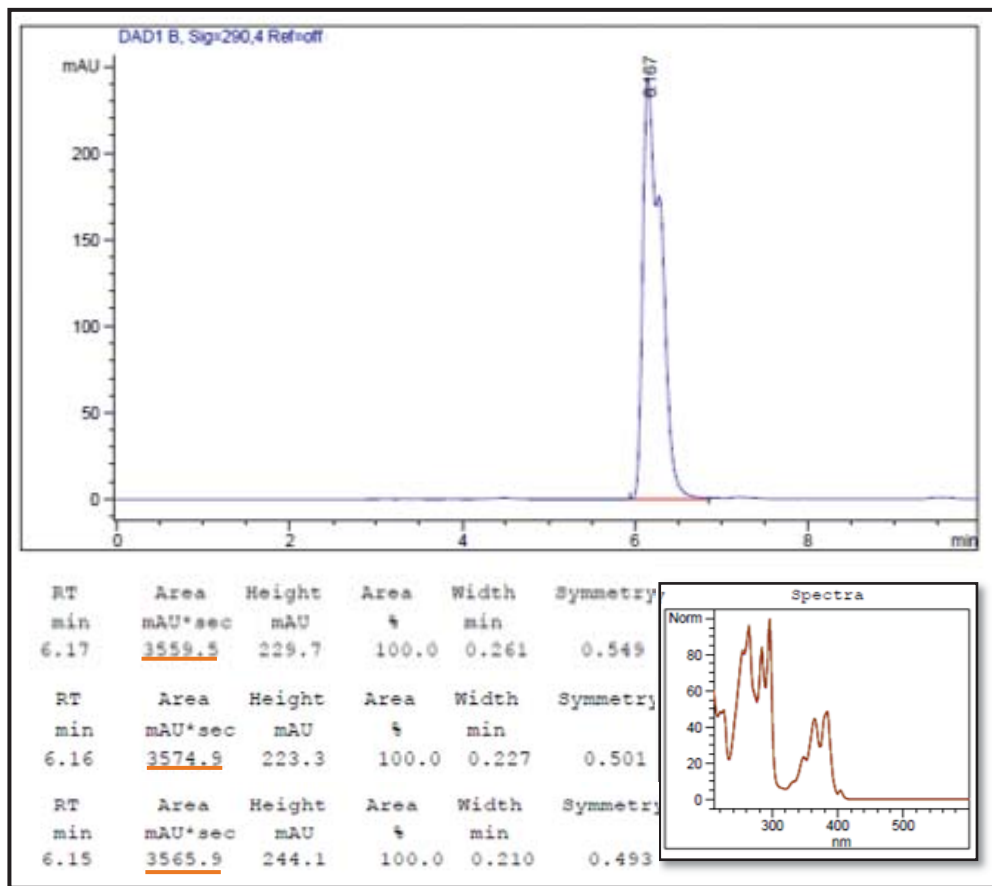


Figura 20: Cromatograma de 70 mg/L como concentración inicial de benzo[a]pireno (día 0 de los tratamientos A, C y E).

En las **Figuras 21, 22 y 23** se presentan cromatogramas del día 14 y día 28 de tres tratamientos A, C y E; los que tuvieron una concentración inicial de 70 mg/L de benzo[a]pireno.

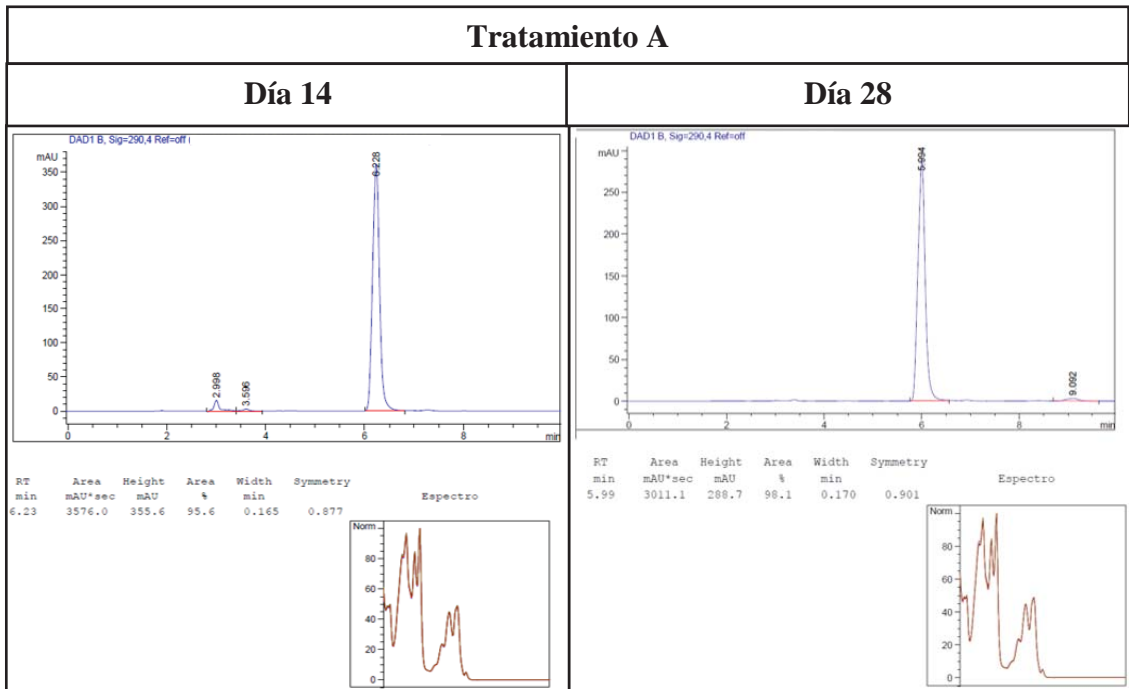


Figura 21: Cromatogramas del tratamiento A del día 14 y día 28.

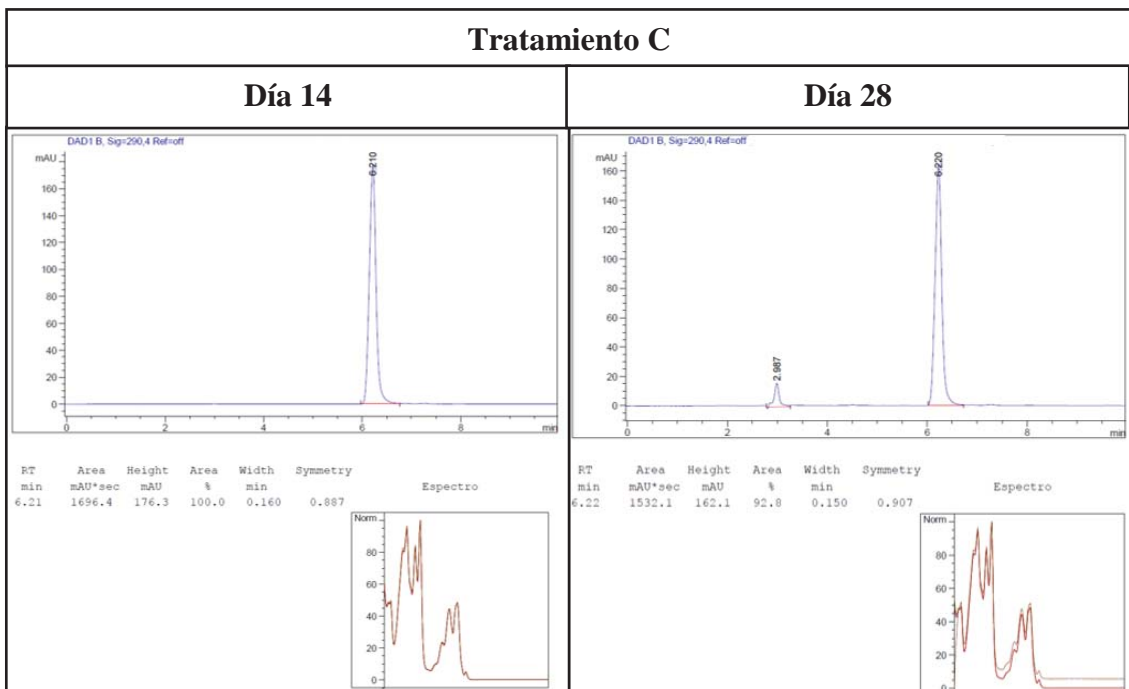


Figura 22: Cromatogramas del tratamiento C del día 14 y día 28.

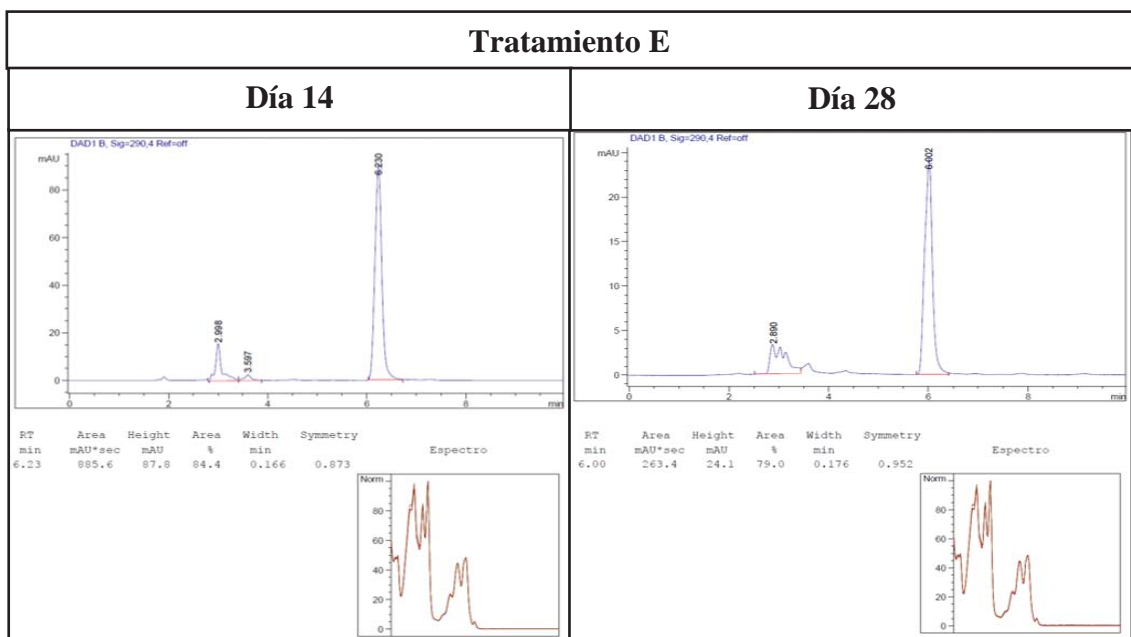


Figura 23: Cromatogramas del tratamiento E del día 14 y día 28.

Los resultados presentes en los cromatogramas están en unidades de absorbancia por sección de la columna empleada (mAU*sec), en la **Tabla 6** se observa el promedio de las 3 lecturas de los tratamientos A, C y E transformados a mg/L, los que iniciaron con una concentración inicial de 70mg/L de benzo[a]pireno.

Tabla 6: Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamientos A, C y E de los 0, 14 y 28 días.

Tratamientos	Tiempo en Días	Concentración de benzo[a]pireno en mg/L		
		0	14	28
A		70	70.1	58.9
C		70	31.9	30.0
E		70	17.4	5.2

La **Figura 24** ilustra de mejor manera los resultados de las concentraciones de benzo[a]pireno en mg/L de los tratamientos A, C y E de los días 0, 14 y 28.

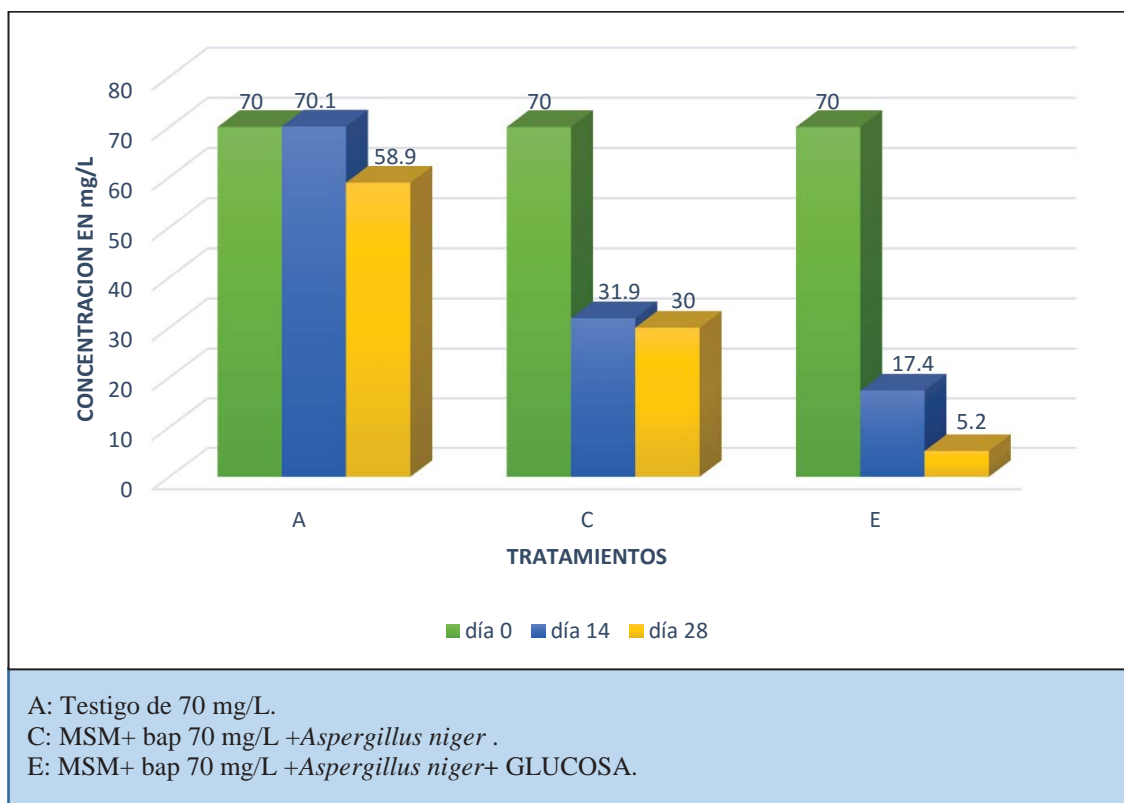


Figura 24: Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamientos A, C y E de los 0, 14 y 28 días.

En la **Figura 24** se observa claramente la biodegradación de benzo[a]pireno desde el día 0 que inicio la experimentación hasta en día 28 que culminó. El tratamiento A (Testigo bap 70 mg/L) presentó una disminución de la concentración inicial de 11.1 mg/L, esto pudo deberse a muchas causas no relacionadas con la biodegradación del benzo[a]pireno como es la volatilización o la adhesión del hidrocarburo a las paredes del matraz donde se llevó acabo la experimentación. En el tratamiento C (MSM+ bap 70 mg/L +*Aspergillus niger*) se observó que a los 14 días *Aspergillus niger* biodegradó 38.1 mg/L de benzo[a]pireno, poco más de mitad de la concentración inicial; pero 14 días después (28 días) la biodegradación menguó a solo 1.9 mg/L. En el tratamiento E (MSM+ bap 70 mg/L +*Aspergillus niger* + GLUCOSA) a los 14 días *Aspergillus niger* biodegradó 52.6 mg/L y a los 28 días 12.2 mg/L lo que muestra que la biodegradación continuó a diferencia del tratamiento C, esto debido a la adición de glucosa en el tratamiento E que al ser una fuente de carbono más fácil de biodegradar y emplear para el crecimiento fue la primera en ser asimilada por *Aspergillus niger*, el experimentar un crecimiento

microbiano generó una mayor demanda de fuentes de carbono biodegradándose así en mayor cantidad el benzo[a]pireno en este tratamiento.

De la misma forma en el día 0 los tratamientos B, D y F tuvieron una misma concentración inicial de benzo[a]pireno que fue de 100 mg/L, la cual se midió por HPLC obteniendo el siguiente resultado cromatográfico **Figura 25**.

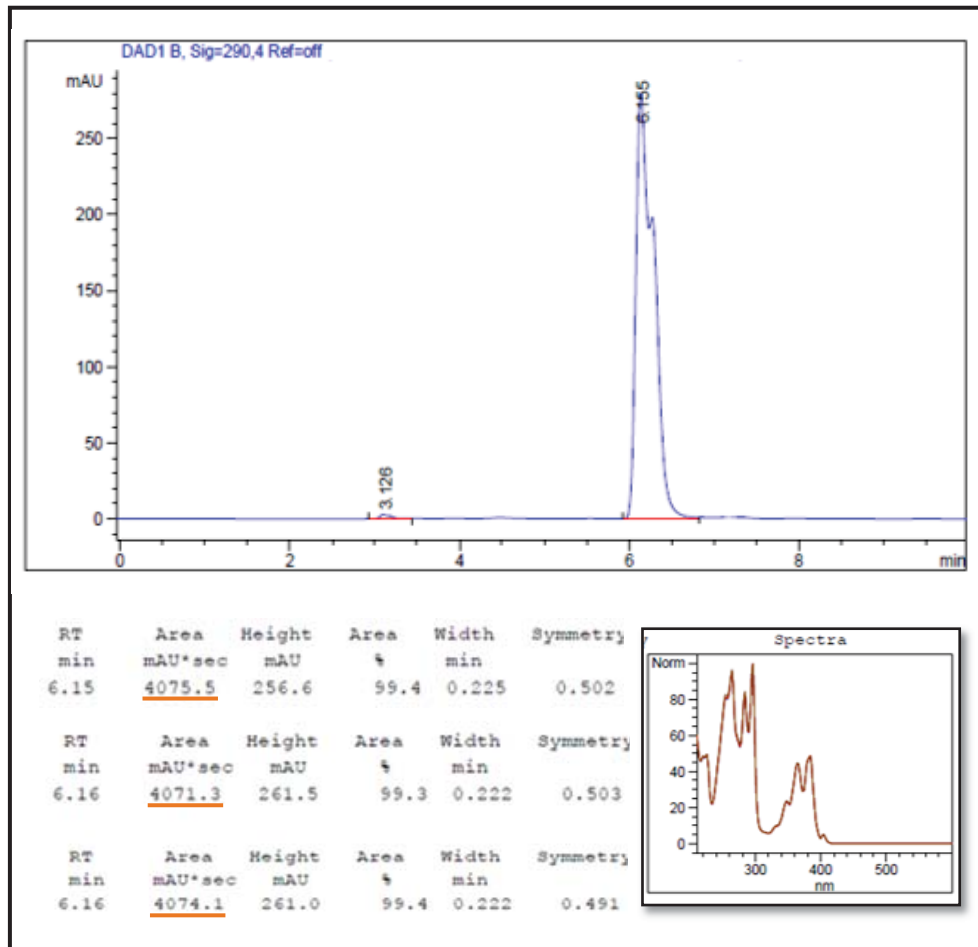


Figura 25: Cromatograma de 100 mg/L como concentración inicial de benzo[a]pireno (día 0 de los tratamientos B, D y F).

En las **Figuras 26, 27 y 28** se presentan cromatogramas del día 14 y día 28 de tres tratamientos B, D y F; los que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L de benzo[a]pireno.

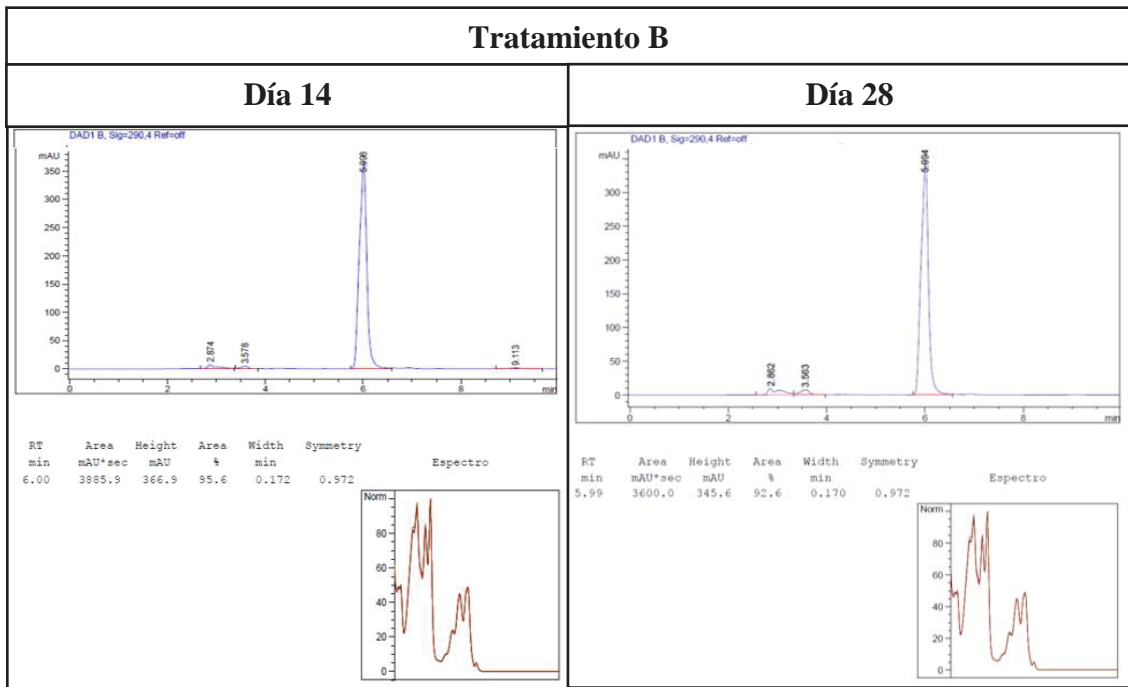


Figura 26: Cromatogramas del tratamiento B del día 14 y día 28.

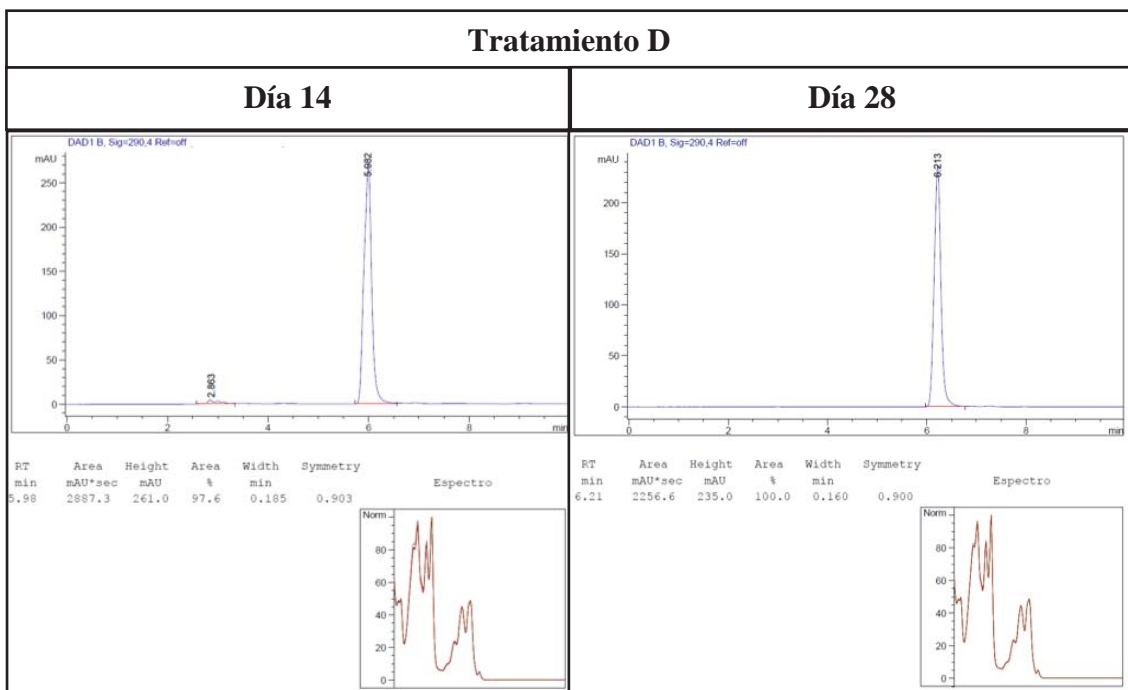


Figura 27: Cromatogramas del tratamiento D del día 14 y día 28.

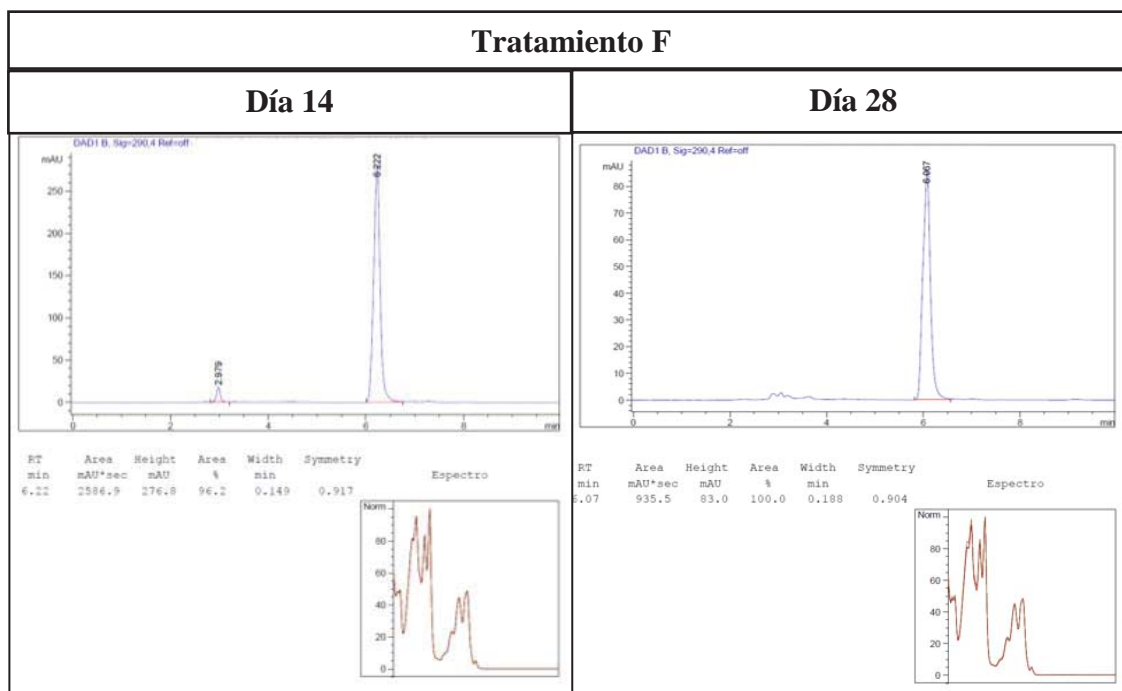


Figura 28: Cromatogramas del tratamiento F del día 14 y día 28.

Los resultados presentes en los cromatogramas están en unidades de absorbancia por sección de la columna empleada (mAU*sec), en la **Tabla 7** se observa el promedio de las 3 lecturas de los tratamientos B, D y F transformados a mg/L, los que iniciaron con una concentración inicial de 100mg/L de benzo[a]pireno.

Tabla 7: Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamientos B, D y F de los 0, 14 y 28 días.

Tratamientos	Tiempo en días	Concentración de benzo[a]pireno en mg/L		
		0	14	28
B		100	95.2	88.3
D		100	70.8	55.4
F		100	63.6	22.8

La **Figura 29** ilustra de mejor manera los resultados de las concentraciones de benzo[a]pireno en mg/L de los tratamientos B, D y F de los días 0, 14 y 28.

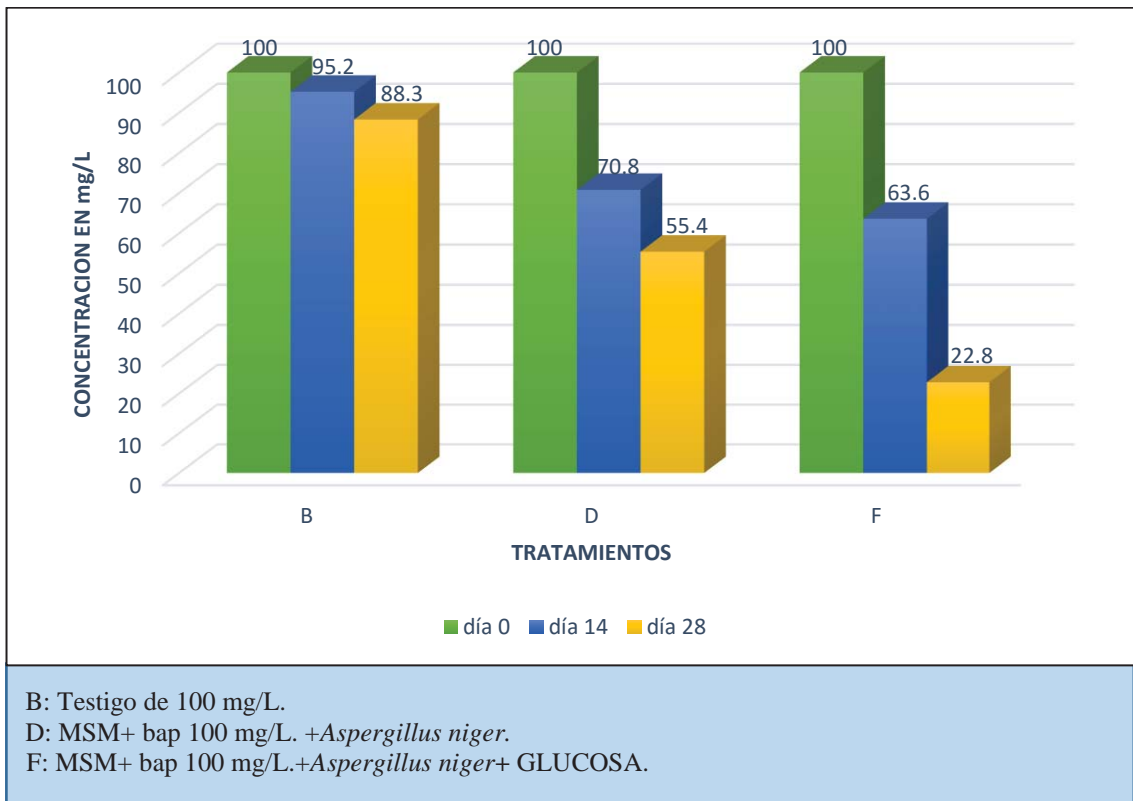


Figura 29: Promedios de los resultados cromatograficos transformados en unidades de mg/L de los tratamienioa B, D y F de los 0, 14 y 28 días.

En la **Figura 29** se observa claramente la biodegradación de benzo[a]pireno desde el día 0 que inicio la experimentación hasta en día 28 que culminó. El tratamiento B (Testigo bap 100 mg/L) a los 14 días presentó una disminución de la concentración inicial de 4,8 mg/L y a los 28 días de 11.7mg/L, esto pudo deberse a muchas causas no relacionadas con la biodegradación del benzo[a]pireno como es la volatilización o la adhesión del hidrocarburo a las paredes del matraz donde se llevó acabo la experimentación. En el tratamiento D (MSM+ bap 100 mg/L +*Aspergillus niger*) se observó que a los 14 días *Aspergillus niger* biodegradó 29.2 mg/L de benzo[a]pireno y 14 días después (28 días) la biodegradación menguó a 15.4 mg/L. En el tratamiento F (MSM+ bap 100 mg/L +*Aspergillus niger* + GLUCOSA) a los 14 días *Aspergillus niger* biodegradó 36.4 mg/L y a los 28 días 40.8 mg/L lo que muestra que la biodegradación continuó en mayor grado que la del tratamiento D, esto debido a la adición de glucosa en el tratamiento F que al ser una fuente de carbono más fácil de biodegradar y emplear para el crecimiento fue la primera en ser asimilada por *Aspergillus niger*, el experimentar un crecimiento microbiano generó una mayor

demanda de fuentes de carbono biodegradándose así en mayor cantidad el benzo[a]pireno en este tratamiento.

En la actualidad se han sumado esfuerzos en encontrar microorganismos que sean capaces de tolerar y degradar a los HAPs con fines de saneamiento ambiental. Según Cerniglia (1992), la tasa de degradación microbiana de HAPs es inversamente proporcional al número de anillos aromáticos en la molécula, por lo que los HAPs de bajo peso molecular son degradados más rápidamente que los de mayor peso molecular. En el caso de los hongos, se ha reportado ampliamente la degradación de acenafteno, antraceno, benzo[a]antraceno, DBT, fenantreno, fluoranteno, naftaleno, pireno y benzopireno. Es por eso que en la presente tesis se trabaja con *Aspergillus niger* como agente biodegradador de benzo[a]pireno.

3.2. Determinación de la influencia de la glucosa como co-sustrato en la biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275

Para determinar la influencia de la glucosa al 10% como co-sustrato (variable independiente - causa) en la biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 se calculó y comparó la media de las concentraciones remanentes de benzo[a]pireno de los tratamientos a los 14 y 28 días por separado debido a que en el día 0 todos los tratamientos empezaron con la misma concentración inicial por lo que no existió diferencia entre las medias, en la **Tabla 8** y **Tabla 9** se muestran las medias de los tratamientos a los 14 y 28 días respectivamente.

Tabla 8: Valores de las Medias de las concentraciones remanentes de benzo[a]pireno de los tratamientos a los 14 días.

TRATAMIENTOS	TIEMPO EN DIAS	Nº LECTURAS	CONCENTRACION EN mg/L	MEDIA	
A	14	3	70.2	82.7	
			70.2		
			70.1		
B	14	3	95.4		
			95.2		
			95.1		
C	14	3	33.3		51.4
			29.1		
			33.3		
D	14	3	70.9		
			70.8		
			70.8		
E	14	3	17.4	40.5	
			17.4		
			17.4		
F	14	3	63.5		
			63.6		
			63.6		

Tabla 9: Valores de las Medias de las concentraciones remanentes de benzo[a]pireno de los tratamientos a los 28 días.

TRATAMIENTOS	TIEMPO EN DIAS	Nº LECTURAS	CONCENTRACION EN mg/L	MEDIA	
A	28	3	58.4	73.6	
			59.1		
			59.2		
B	28	3	88.4		
			88.3		
			88.3		
C	28	3	30.1		42.7
			30.0		
			30.0		
D	28	3	55.4		
			55.4		
			55.4		
E	28	3	5.2	14.0	
			5.2		
			5.2		
F	28	3	23.0		
			22.8		
			22.7		

La **Tabla 10** muestra las comparaciones entre las medias de los tratamientos Testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 14.

Tabla 10: Comparación entre tratamientos testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 14.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Testigo	6	82,7	13,7	70,10	95,40
MSM+ bap +<i>Aspergillus niger</i>	6	51,4	21,4	29,10	70,90
MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i>+ GLUCOSA	6	40,5	25,3	17,40	63,60
Total	18	58,2	26,8	17,40	95,40

N: número de muestras.

En la **Tabla 10** se puede apreciar que *Aspergillus niger* biodegradó en mayor cantidad benzo[a]pireno en los tratamientos que tienen glucosa como co-sustrato, esto se refleja de mejor manera en la **Figura 30**.

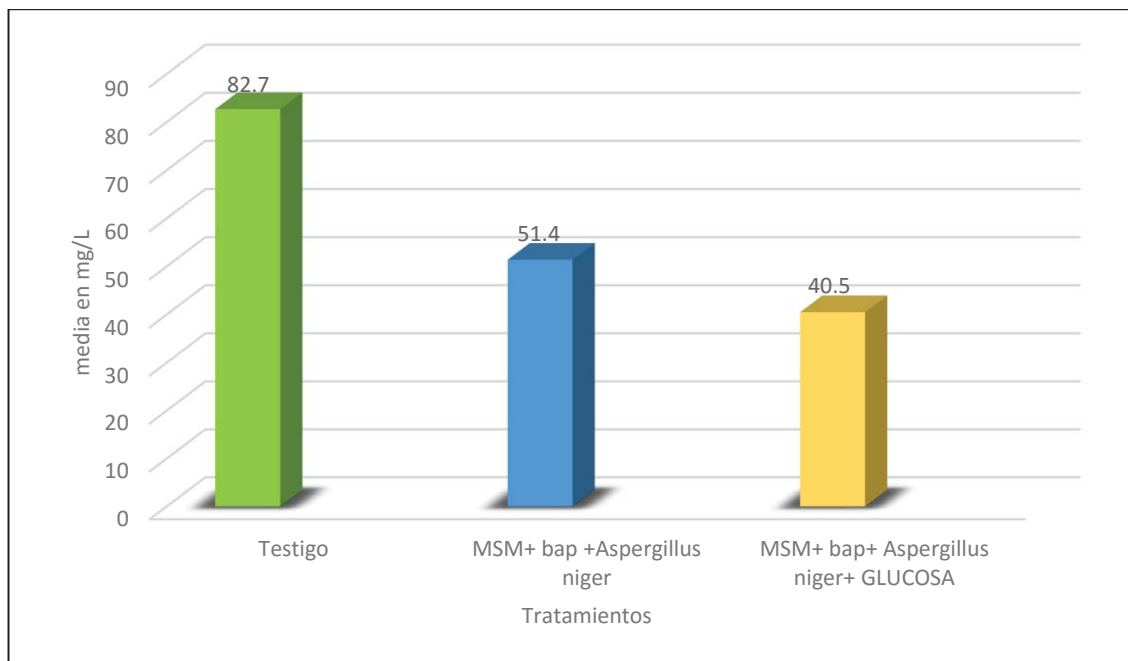


Figura 30: Comparación entre tratamientos Testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 14.

Para reconfirmar el resultado obtenido hecha por comparación, se emplea la prueba ANOVA de un factor **Tabla 11**.

Tabla 11: Prueba ANOVA de un factor entre tratamientos Testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 14.

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5764,943	2	2882,472	6,729	,008
Intra-grupos	6425,082	15	428,339		
Total	12190,025	17			

Con un valor de $F = 6,729$ y una diferencia de $Sig = 0,008 \leq 0,05$ se puede interpretar que existe una diferencia significativa entre la biodegradación del benzo[a]pireno de los tratamientos que tienen glucosa frente a los tratamientos que no tienen glucosa.

Al existir una diferencia significativa se prosiguió con la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tratamientos existe esa diferencia **Tabla 12**.

Tabla 12: Prueba Tukey para los tratamientos testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 14.

TRATAMIENTOS I	TRATAMIENTOS J	DIFERENCIA (I-J)	Sig
Testigo	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i>	31,33333*	,048
	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i> +GLUCOSA	42,21667*	,008
MSM+bap+<i>Aspergillus niger</i>	Testigo	-31,33333*	,048
	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i> +GLUCOSA	10,88333	,642
MSM+bap+<i>Aspergillus niger</i>+GLUCOSA	Testigo	-42,21667*	,008
	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i>	-10,88333	,642

*La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Según las comparaciones múltiples realizadas del día 14 por la prueba de Tukey se observa una diferencia significativa en la biodegradación del benzo[a]pireno entre los tratamientos Testigo frente a MSM+bap+*Aspergillus niger* y MSM+bap+*Aspergillus niger*+GLUCOSA, sin embargo, no se presenta diferencia significativa en la biodegradación entre los tratamientos MSM+bap+*Aspergillus niger* y MSM+bap+*Aspergillus niger*+GLUCOSA.

Tabla 13: Comparación entre tratamientos Testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 28.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Testigo	6	73,6	16,1	58,40	88,40
MSM+ bap +<i>Aspergillus niger</i>	6	42,7	13,9	30,00	55,40
MSM+ bap+ <i>Aspergillus niger</i>+ GLUCOSA	6	14,0	9,7	5,20	23,00
Total	18	43,5	28,1	5,20	88,40

N: número de muestras.

En la **Tabla 13** se puede apreciar que los tratamientos que tienen glucosa como co-sustrato presentan una mayor biodegradación del benzo[a]pireno que los otros tratamientos, esto se refleja de mejor manera en la **Figura 31**.

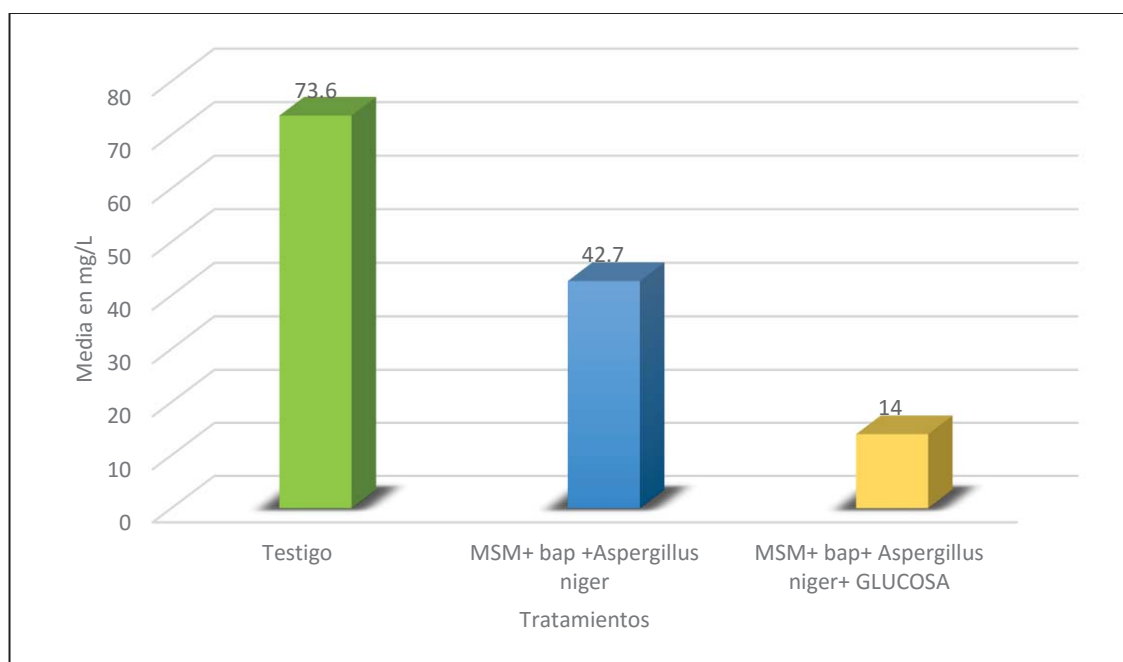


Figura 31: Comparación entre tratamientos Testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 28.

Para reconfirmar el resultado obtenido hecha por comparación se emplea la prueba ANOVA de un factor **Tabla 14**.

Tabla 14: Prueba ANOVA de un factor entre tratamientos testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 28.

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10661,320	2	5330,660	29,273	,000
Intra-grupos	2731,525	15	182,102		
Total	13392,845	17			

Con un valor de $F = 29,273$ y una diferencia de $Sig = 0,000 \leq 0,05$ se puede interpretar que existe una diferencia significativa entre la biodegradación del benzo[a]pireno de los tratamientos que tienen glucosa frente a los tratamientos que no tienen glucosa.

Al existir una diferencia significativa se prosiguió con la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tratamientos existe esa diferencia **Tabla 15**.

Tabla 15: Prueba Tukey para los tratamientos testigo, MSM+ bap +*Aspergillus niger* y MSM+ bap+ *Aspergillus niger*+ GLUCOSA en el día 28.

TRATAMIENTOS I	TRATAMIENTOS J	DIFERENCIA (I-J)	Sig
Testigo	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i>	30,90000*	,003
	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i> +GLUCOSA	59,60000*	,000
MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i>	Testigo	-30,90000*	,003
	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i> +GLUCOSA	28,70000*	,006
MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i> +GLUCOSA	Testigo	-59,60000*	,000
	MSM+bap+ <i>Aspergillus niger</i>	-28,70000*	,006

*La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Según las comparaciones múltiples realizadas del día 28 por la prueba de Tukey se observan diferencias significativas entre todos los tratamientos (Testigo, MSM+bap+*Aspergillus niger* y MSM+bap+*Aspergillus niger*+GLUCOSA).

Observando los resultados obtenidos con los análisis estadísticos apreciamos una clara influencia de la glucosa como so-sustrato en la biodegradación en el día 28 y no así en el día 14, interpretándose así que los tratamientos que presentan co-sustrato biodegradaron de mejor manera a benzo[a]pireno.

3.3. Identificación del tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275

Para poder identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 en los diferentes tratamientos se hizo una comparación de datos de las medias de las concentraciones remanentes de benzo[a]pireno de cada tratamiento por separado en relación al tiempo de experimentación, también se empleó la prueba ANOVA de un factor seguida por la prueba de Tukey.

En la **Tabla 16** se presentan los valores de las medias de los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 70 mg/L en relación al tiempo de experimentación.

Tabla 16: Valores de las medias de las concentraciones de benzo[a]pireno de los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 70 mg/L a los 0, 14 y 28 días.

TRATAMIENTOS	TIEMPO EN DIAS	Nº LECTURAS	CONCENTRACION EN mg/L	MEDIA
A	0	3	69.9	70.0
			70.2	
			70.0	
	14	3	70.2	70.1
			70.2	
			70.1	
	28	3	58.4	58.9
			59.1	
			59.2	
C	0	3	69.9	70.0
			70.2	
			70.0	
	14	3	33.3	31.9
			29.1	
			33.3	
	28	3	30.1	30.0
			30.0	
			30.0	
E	0	3	69.9	70.0
			70.2	
			70.0	
	14	3	17.4	17.4
			17.4	
			17.4	
	28	3	5.2	5.2
			5.2	
			5.2	

Con los valores de las medias de los tratamientos se hizo una comparación frente al tiempo de evaluación, tenemos así la **Tabla 17** en la cual se observa la comparación del tratamiento A (Testigo) a los 0, 14 y 28 días.

Tabla 17: Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento A (Testigo).

Tiempo en días	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
0	3	70,0	,15275	69,90	70,20
14	3	70,1	,05774	70,10	70,20
28	3	58,9	,43589	58,40	59,20
Total	9	66,4	5,60513	58,40	70,20

N: número de muestras.

Según la **Tabla 17** se puede apreciar que el tratamiento A Testigo de 70mg/L se mantuvo con esa concentración hasta el día 14, sin embargo, en el día 28 se observó una disminución aproximada de 12mg/L como se puede apreciar en el **Figura 32**.

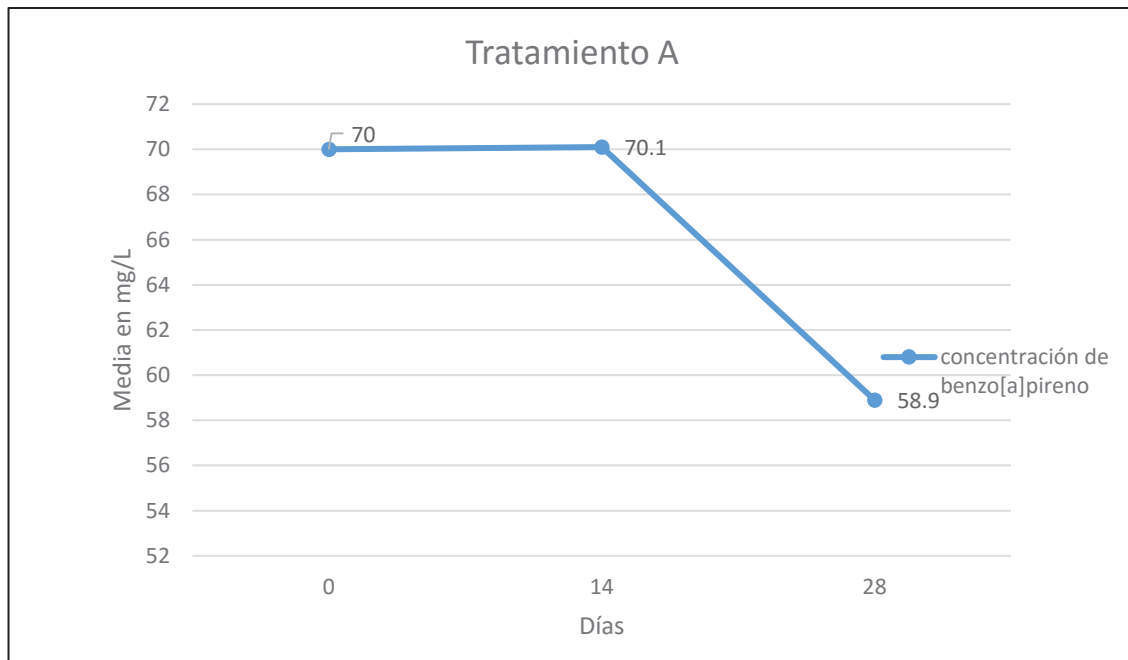


Figura 32: Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento A (Testigo).

En el tratamiento A (Testigo) no se puede hablar de una biodegradación puesto que este no presenta el agente biodegradador que es *Aspergillus niger*, pero aun así existe una diferencia entre los valores de la concentración de benzo[a]pireno en los tiempos de evaluación (0, 14 y 28 días). Para saber si esta diferencia es estadísticamente significativa se empleó la prueba de ANOVA de un factor **Tabla 18**.

Tabla 18: Prueba de ANOVA de un factor para identificar la existencia de una diferencia significativa de la concentración de benzo[a]pireno del tratamiento A (Testigo) frente al tiempo de evaluación.

ANOVA	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	250,907	2	125,453	1737,046	,000
Intra-grupos	,433	6	,072		
Total	251,340	8			

Con un valor de $F = 1737,046$ y una diferencia de $Sig = 0,000 \leq 0,05$ se puede interpretar que existe una diferencia entre las concentraciones según los tiempos de evaluación de la biodegradación de benzo[a]pireno.

Al existir una diferencia significativa se empleó la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe esa diferencia **Tabla 19**.

Tabla 19: Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento A (Testigo).

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
0	14	-,13333	,821
	28	11,13333*	,000
14	0	,13333	,821
	28	11,26667*	,000
28	0	-11,13333*	,000
	14	-11,26667*	,000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Por la prueba de Tukey se demuestra la diferencia significativa entre los tiempos de evaluación, señalados con los asteriscos, existente entre los resultados de los días 0 y 14

frente al día 28 en el cual se observa una ligera disminución de la concentración inicial de 70mg/L, esto podría deberse a una volatilización o adhesión del hidrocarburo a las paredes a las zonas próximas de la boquilla del matraz causada por la agitación sometida a estos reactores biológicos, imposibilitando así su total extracción por el hexano ya que este se fue al fondo del matraz.

Continuando con los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 70 mg/L de benzo[a]pireno tenemos la **Tabla 20** donde se identificó el tiempo óptimo de biodegradación del tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*).

Tabla 20: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*).

Tiempo en días	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
0	3	70,0	0,2	69,9	70,2
14	3	31,9	2,4	29,1	33,3
28	3	30,0	0,1	30,0	30,1
Total	9	43,9	19,6	29,1	70,2

N: número de muestras.

En la **Tabla 20** se puede apreciar que en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L+*Aspergillus niger*) existió una disminución de más de mitad de la concentración inicial en el día 14, sin embargo, en el día 28 se observó una disminución casi imperceptible de 1,9 mg/L como se puede apreciar en el **Figura 33**.

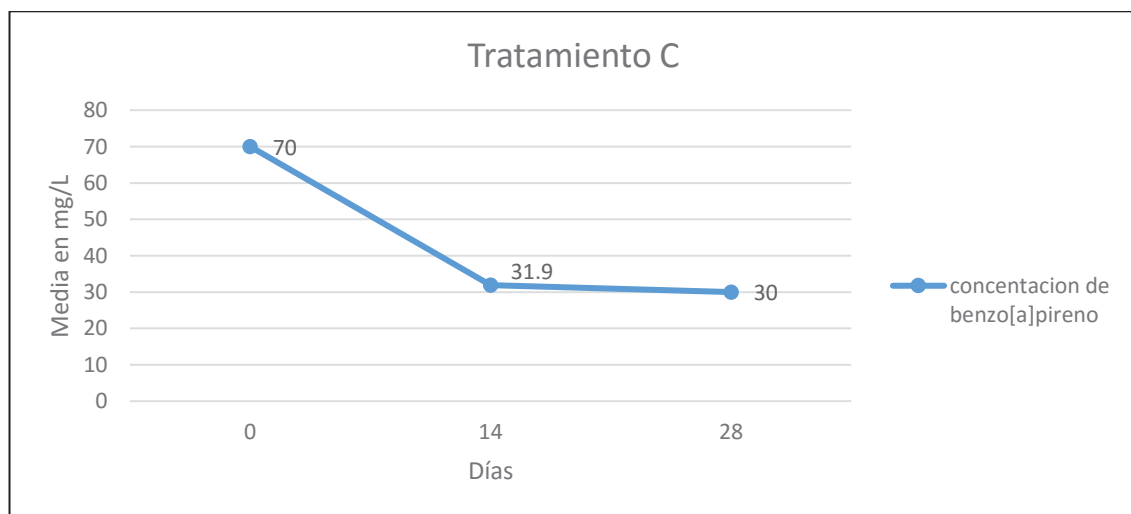


Figura 33: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*).

Para comprobar lo obtenido en la comparación se empleó la prueba de ANOVA de un factor **Tabla 21**.

Tabla 21: Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*).

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3057,636	2	1528,818	776,488	,000
Intra-grupos	11,813	6	1,969		
Total	3069,449	8			

Con un valor de $F = 776,488$ y una diferencia de $Sig = 0,000 \leq 0,05$ se puede interpretar que existe una diferencia entre las concentraciones según los tiempos de evaluación de la biodegradación de benzo[a]pireno.

Al existir una diferencia significativa se empleó la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe esa diferencia **Tabla 22**.

Tabla 22: Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L+*Aspergillus niger*).

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
0	14	38,13333*	,000
	28	40,00000*	,000
14	0	-38,13333*	,000
	28	1,86667	,305
28	0	-40,00000*	,000
	14	-1,86667	,305

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Por la prueba de Tukey se demuestra la diferencia significativa entre los tiempos de evaluación, señalados con los asteriscos, existentes entre los resultados del día 0 frente a los días 14 y 28 en los cuales se observa una gran disminución frente a la concentración inicial del benzo[a]pireno, sin embargo, no se observa una diferencia significativa de la

concentración entre las evaluaciones de los días 14 y 28 ya que la disminución fue casi imperceptible.

Según las pruebas estadísticas empleadas para la identificación del tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 en el tratamiento C, podemos señalar que el tiempo óptimo fue el día 14 de experimentación donde se observó 54,4 % de biodegradación de la concentración inicial de benzo[a]pireno y 14 días después este porcentaje subió a solo 57,1% indicando los datos que hubo una biodegradación más lenta o menos eficaz.

Continuando con los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 70 mg/L de benzo[a]pireno tenemos la **Tabla 23** donde se identificó el tiempo óptimo de biodegradación del tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA).

Tabla 23: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA).

Tiempo en días	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
0	3	70,0	,15275	69,90	70,20
14	3	17,4	0,00000	17,40	17,40
28	3	5,2	0,00000	5,20	5,20
Total	9	30,9	29,83814	5,20	70,20

N: número de muestras.

Según la **Tabla 23** se puede apreciar que el tratamiento MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA disminuyó drásticamente en el día 14, en el día 28 se observó una disminución menor que los primeros 14 días, sin embargo, la biodegradación de benzo[a]pireno se dio casi en su totalidad en este tratamiento como se puede apreciar en el **Figura 34**.

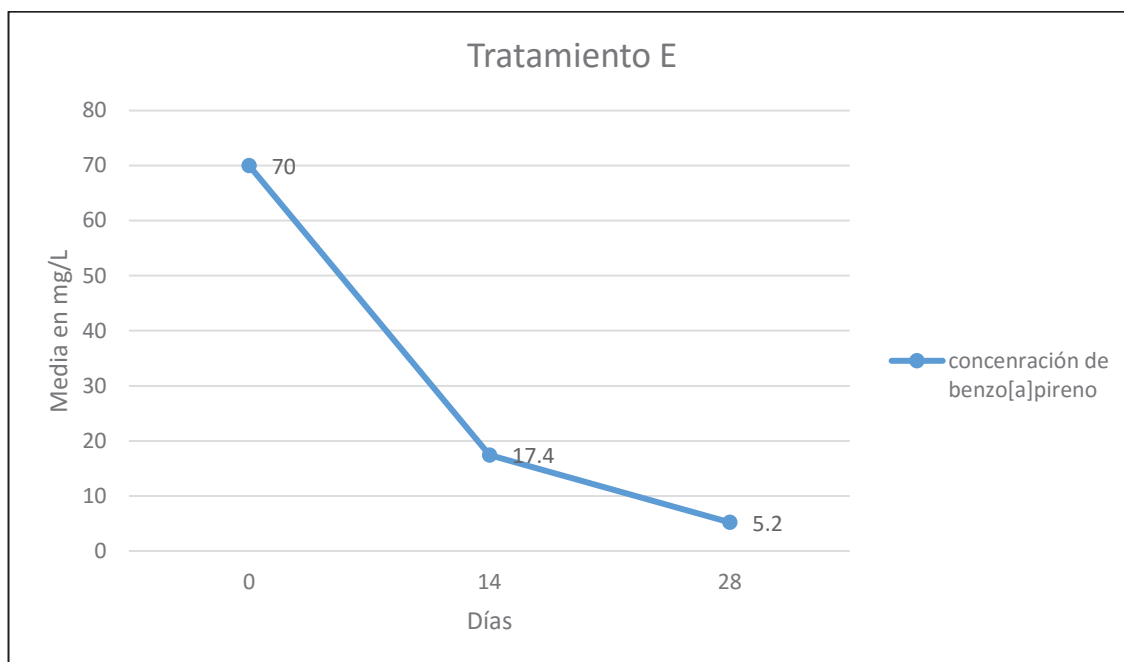


Figura 34: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA).

Para comprobar lo obtenido en la comparación se empleó la prueba de ANOVA de un factor **Tabla 24**.

Tabla 24: Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L +*Aspergillus niger* + GLUCOSA).

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7122,469	2	3561,234	457873,000	,000
Intra-grupos	,047	6	,008		
Total	7122,516	8			

Con un valor de $F = 457873,000$ y una diferencia de $Sig = 0,000 \leq 0,05$ se puede interpretar que existe una diferencia significativa entre las concentraciones según los tiempos de evaluación de la biodegradación de benzo[a]pireno.

Al existir una diferencia significativa se empleó la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe esa diferencia **Tabla 25**.

Tabla 25: Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento E (MSM+ bap 70mg/L + *Aspergillus niger* + GLUCOSA).

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
0	14	52,63333*	,07201	,000
	28	64,83333*	,07201	,000
14	0	-52,63333*	,07201	,000
	28	12,20000*	,07201	,000
28	0	-64,83333*	,07201	,000
	14	-12,20000*	,07201	,000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Por la prueba de Tukey se demuestra la diferencia significativa entre los tiempos de evaluación, señalados con los asteriscos, existentes entre todos los resultados de la concentración de benzo[a]pireno, lo que indica que existió una biodegradación significativa del día 0 hasta el día 28 de experimentación.

Según las pruebas estadísticas empleadas para la identificación del tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 en el tratamiento E, podemos señalar que el tiempo óptimo fue el día 28 de experimentación donde se observó que la biodegradación fue del 92,6% de la concentración inicial de benzo[a]pireno, lo que indica que la biodegradación continuó después de los 14 días donde fue solo de 75,1%.

En la **Tabla 26** se presentan los valores de las medias de los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L en relación al tiempo de experimentación.

Tabla 26: Valores de las medias de las concentraciones de benzo[a]pireno de los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L a los 0, 14 y 28 días.

TRATAMIENTOS	TIEMPO EN DIAS	Nº LECTURAS	CONCENTRACION EN mg/L	MEDIA
B	0	3	100.0	100.0
			99.9	
			100.0	
	14	3	95.4	95.2
			95.2	
			95.1	
	28	3	88.4	88.3
			88.3	
			88.3	
D	0	3	100.0	100.0
			99.9	
			100.0	
	14	3	70.9	70.8
			70.8	
			70.8	
	28	3	55.4	55.4
			55.4	
			55.4	
F	0	3	100.0	100.0
			99.9	
			100.0	
	14	3	63.5	63.6
			63.6	
			63.6	
	28	3	23.0	22.8
			22.8	
			22.7	

Con los valores de las medias de los tratamientos se hizo una comparación frente al tiempo de evaluación, tenemos así la **Tabla 27** en la cual se observa la comparación del tratamiento A (Testigo) a los 0, 14 y 28 días.

Tabla 27: Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento B (Testigo).

Tiempo en días	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
0	3	100	,05774	99,90	100,00
14	3	95,2	,15275	95,10	95,40
28	3	88,3	,05774	88,30	88,40
Total	9	94,5111	5,06716	88,30	100,00

N: número de muestras.

Según la **Tabla 27** se puede apreciar que el tratamiento B Testigo de 100mg/L disminuyó levemente hasta el día 14, al igual que en el día 28 que en total se observó una disminución aproximada de 11.7 mg/L como se puede apreciar en el **Figura 35**.

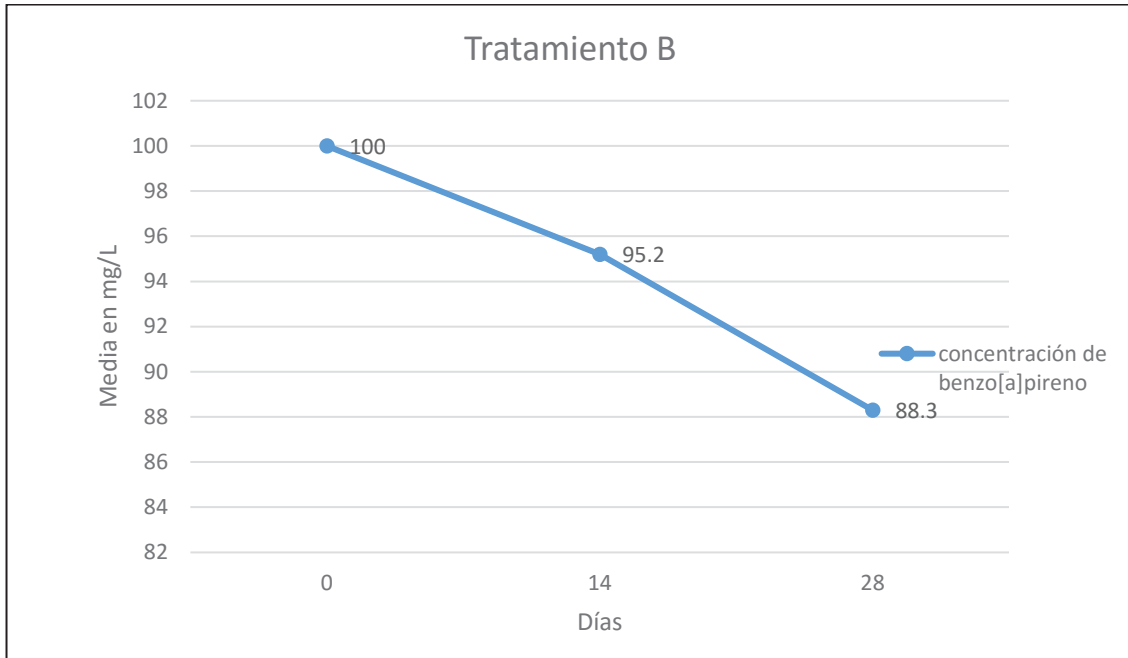


Figura 35: Tiempo de evaluación frente a la concentración de benzo[a]pireno en el tratamiento B (Testigo).

Para comprobar lo obtenido en la comparación se empleó la prueba de ANOVA de un factor **Tabla 28**.

Tabla 28: Prueba de ANOVA de un factor para identificar la existencia de una diferencia significativa de la concentración de benzo[a]pireno del tratamiento B (Testigo) frente al tiempo de evaluación.

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	205,349	2	102,674	10267,444	,000
Intra-grupos	,060	6	,010		
Total	205,409	8			

A pesar de que numéricamente los valores no están muy alejados el uno del otro con un valor de $F = 10267,444$ y una diferencia de $\text{Sig} = 0,000 \leq 0,05$ se puede interpretar que

existe una diferencia entre las concentraciones según los tiempos de evaluación de la biodegradación de benzo[a]pireno.

Al existir una diferencia significativa se empleó la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe esa diferencia **Tabla 29**.

Tabla 29: Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento B (Testigo).

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
0	14	4,73333*	,000
	28	11,63333*	,000
14	0	-4,73333*	,000
	28	6,90000*	,000
28	0	-11,63333*	,000
	14	-6,90000*	,000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Por la prueba de Tukey se demuestra la diferencia significativa entre los tiempos de evaluación, señalados con los asteriscos, existente entre todos los resultados de los días 0, 14 y 28 días en los cuales se observa una ligera disminución de la concentración inicial de 100mg/L, esto podría deberse a una volatilización o adhesión del hidrocarburo a las paredes a las zonas próximas de la boquilla del matraz causada por la agitación sometida a estos reactores biológicos, imposibilitando así su total extracción por el hexano ya que este se fue al fondo del matraz.

Continuando con los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L de benzo[a]pireno tenemos la **Tabla 30** donde se identificó el tiempo óptimo de biodegradación del tratamiento D (MSM+ bap 100 mg/L +*Aspergillus niger*).

Tabla 30: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L +*Aspergillus niger*).

Tiempo en días	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
0	3	100	,05774	99,90	100,00
14	3	70,8	,05774	70,80	70,90
28	3	55,4	0,00000	55,40	55,40
Total	9	75,4000	19,59955	55,40	100,00

N: número de muestras.

En la **Tabla 30** se puede apreciar que en el tratamiento C (MSM+ bap 70mg/L+*Aspergillus niger*) existió una disminución de más de mitad de la concentración inicial en el día 14, sin embargo, en el día 28 se observó una disminución casi imperceptible de 1,9 mg/L como se puede apreciar en el **Figura 36**.

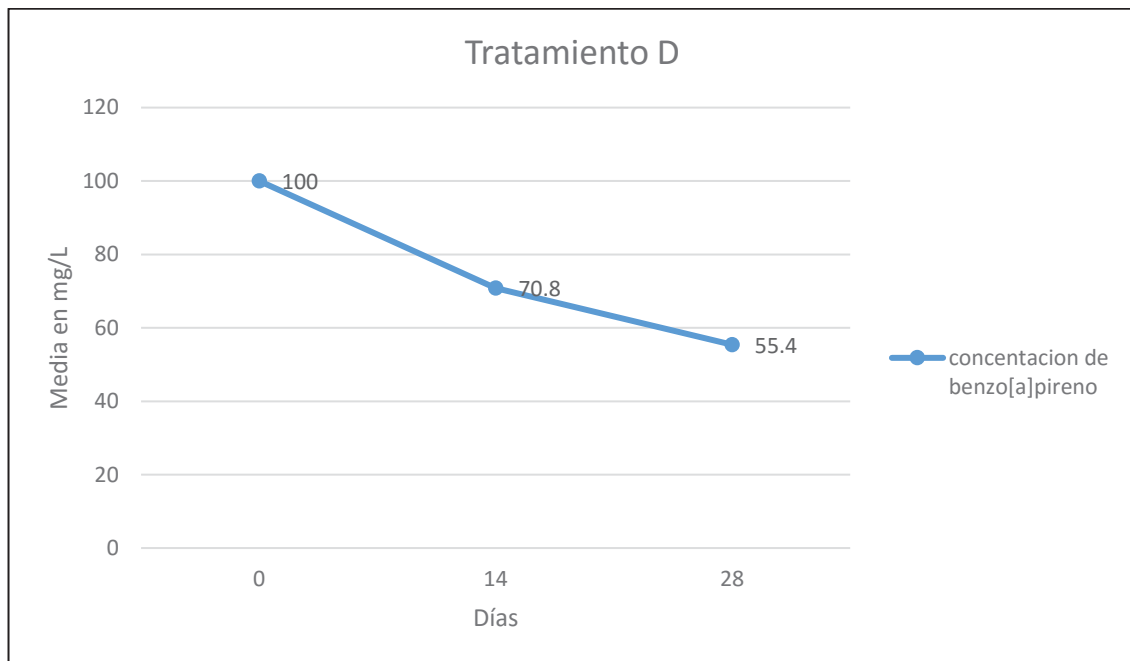


Figura 36: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L +*Aspergillus niger*).

Para comprobar lo obtenido en la comparación se empleó la prueba de ANOVA de un factor **Tabla 31**.

Tabla 31: Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L +*Aspergillus niger*).

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3073,127	2	1536,563	691453,500	,000
Intra-grupos	,013	6	,002		
Total	3073,140	8			

Con un valor de $F = 691453,500$ y una diferencia de $Sig = 0,000 \leq 0,05$ se puede interpretar que existe una diferencia entre las concentraciones según los tiempos de evaluación de la biodegradación de benzo[a]pireno.

Al existir una diferencia significativa se empleó la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe esa diferencia **Tabla 32**.

Tabla 32: Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento D (MSM+ bap 100mg/L+*Aspergillus niger*).

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
0	14	29,13333*	,000
	28	44,56667*	,000
14	0	-29,13333*	,000
	28	15,43333*	,000
28	0	-44,56667*	,000
	14	-15,43333*	,000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Por la prueba de Tukey se demuestra la diferencia significativa entre los tiempos de evaluación, señalados con los asteriscos, existentes entre todos los resultados del día 0, 14 y 28 en los cuales se observa una gran disminución considerable del benzo[a]pireno.

Según las pruebas estadísticas empleadas para la identificación del tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 en el tratamiento E, podemos señalar que el tiempo óptimo fue el día 28 de experimentación donde se observó que la biodegradación fue del 44,6% de la concentración inicial de benzo[a]pireno mientras que el día 14 solo llegó a un 29,2%.

Continuando con los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L de benzo[a]pireno tenemos la **Tabla 33** donde se identificó el tiempo óptimo de biodegradación del tratamiento D (MSM+ bap 100 mg/L +*Aspergillus niger*).

Tabla 33: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA).

Tiempo en días	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
0	3	100	,05774	99,90	100,00
14	3	63,6	,05774	63,50	63,60
28	3	22,8	,15275	22,70	23,00
Total	9	62,1	33,41739	22,70	100,00

N: número de muestras.

Según la **Tabla 33** se puede apreciar que el tratamiento MSM+ bap 100 mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA en la concentración inicial de 100mg/L disminuyó concentraciones similares en el día 14 y en el día 28 como se puede apreciar en el **Figura 37**.

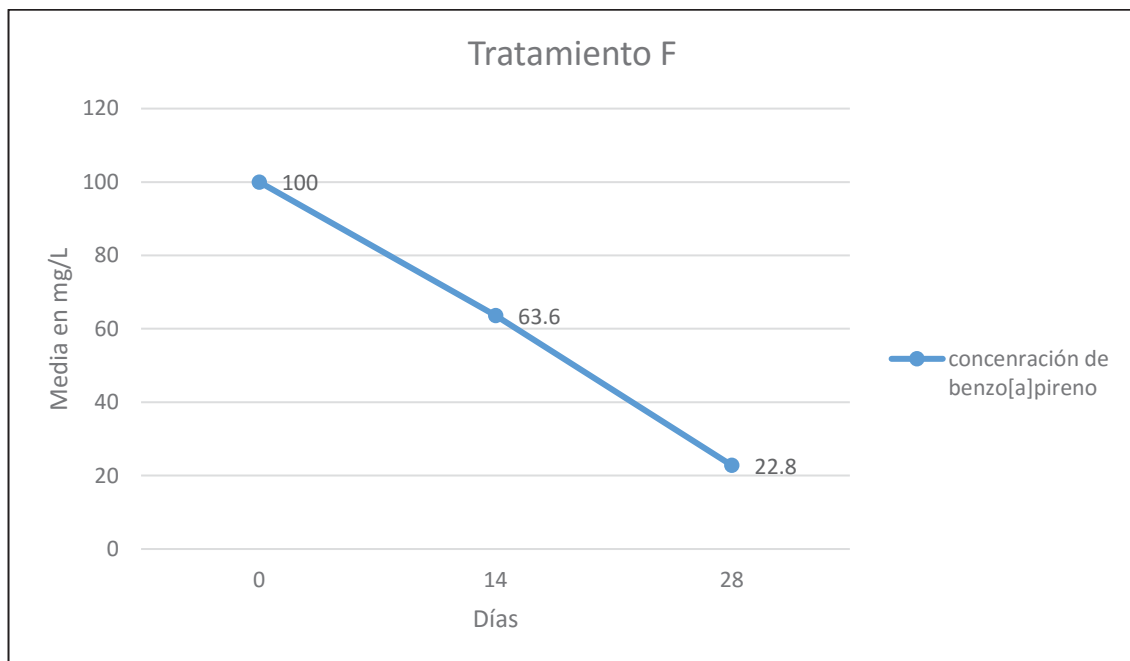


Figura 37: Tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA).

Para comprobar lo obtenido en la comparación se empleó la prueba de ANOVA de un factor **Tabla 34**.

Tabla 34: Prueba de ANOVA de un factor para identificar el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L + *Aspergillus niger* + GLUCOSA).

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8933,716	2	4466,858	446685,778	,000
Intra-grupos	,060	6	,010		
Total	8933,776	8			

Con un valor de $F = 446685,778$ y una diferencia de $Sig = 0,000 \leq 0,05$ se puede interpretar que existe una diferencia significativa entre las concentraciones según los tiempos de evaluación de la biodegradación de benzo[a]pireno.

Al existir una diferencia significativa se empleó la prueba de Tukey al 95% de confianza para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe esa diferencia **Tabla 35**.

Tabla 35: Prueba Tukey para identificar entre cuál de los tiempos de evaluación existe una diferencia significativa en el tratamiento F (MSM+ bap 100mg/L + *Aspergillus niger* + GLUCOSA).

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
0	14	36,40000*	,000
	28	77,13333*	,000
14	0	-36,40000*	,000
	28	40,73333*	,000
28	0	-77,13333*	,000
	14	-40,73333*	,000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Por la prueba de Tukey se demuestra la diferencia significativa entre los tiempos de evaluación, señalados con los asteriscos, existentes entre todos los resultados de la concentración de benzo[a]pireno, lo que indica que existió una biodegradación significativa del día 0 hasta el día 28 de experimentación.

Según las pruebas estadísticas empleadas para la identificación del tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 en el tratamiento C, podemos señalar que el tiempo óptimo fue el día 28 de experimentación donde se observó un 77,2 % de biodegradación de la concentración inicial de benzo[a]pireno mientras que en el día 14 solo se biodegradó el 36,4%.

3.4. Determinación de la biodegradación del benzo[a]pireno con dos concentraciones iniciales

Para determinar la biodegradación del benzo[a]pireno con dos concentraciones y a cuál de esas concentraciones *Aspergillus niger* biodegrada más eficientemente al benzo[a]pireno. Se hicieron comparaciones entre las medias de los resultados de los tratamientos de 70 mg/L y los de 100 mg/L, medias que se pueden apreciar en la **Tabla 16** y **Tabla 26**.

Tabla 36: Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 0 días.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
A	3	70,0	,15275	69,90	70,20
C	3	70,0	,15275	69,90	70,20
E	3	70,0	,15275	69,90	70,20
B	3	100	,05774	99,90	100,00
D	3	100	,05774	99,90	100,00
F	3	100	,05774	99,90	100,00

N: número de muestras.

En el día 0 todos los tratamientos empezaron con la misma concentración; A: Testigo de 70 mg/L, B: Testigo de 100 mg/L, C: MSM+ bap +*Aspergillus niger* 70 mg/L, D: MSM+ bap +*Aspergillus niger* 100 mg/L, E: MSM+ bap +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA 70 mg/L, F: MSM+ bap +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA 100 mg/L.

Figura 38: Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 0 días.

Con los resultados obtenidos el día 14 en los diferentes tratamientos se hizo la misma comparación que en los del día 0 para poder ver las diferencias en las concentraciones ocasionadas por la biodegradación de benzo[a]pireno **Tabla 37**.

Tabla 37: Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 14 días.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
A	3	70,2	,05774	70,10	70,20
C	3	31,9	2,42487	29,10	33,30
E	3	17,4	0,00000	17,40	17,40
B	3	95,2	,15275	95,10	95,40
D	3	70,8	,05774	70,80	70,90
F	3	63,6	,05774	63,50	63,60

N: número de muestras.

Para ilustrar la comparación hecha en la anterior tabla tenemos la **Figura 38**.

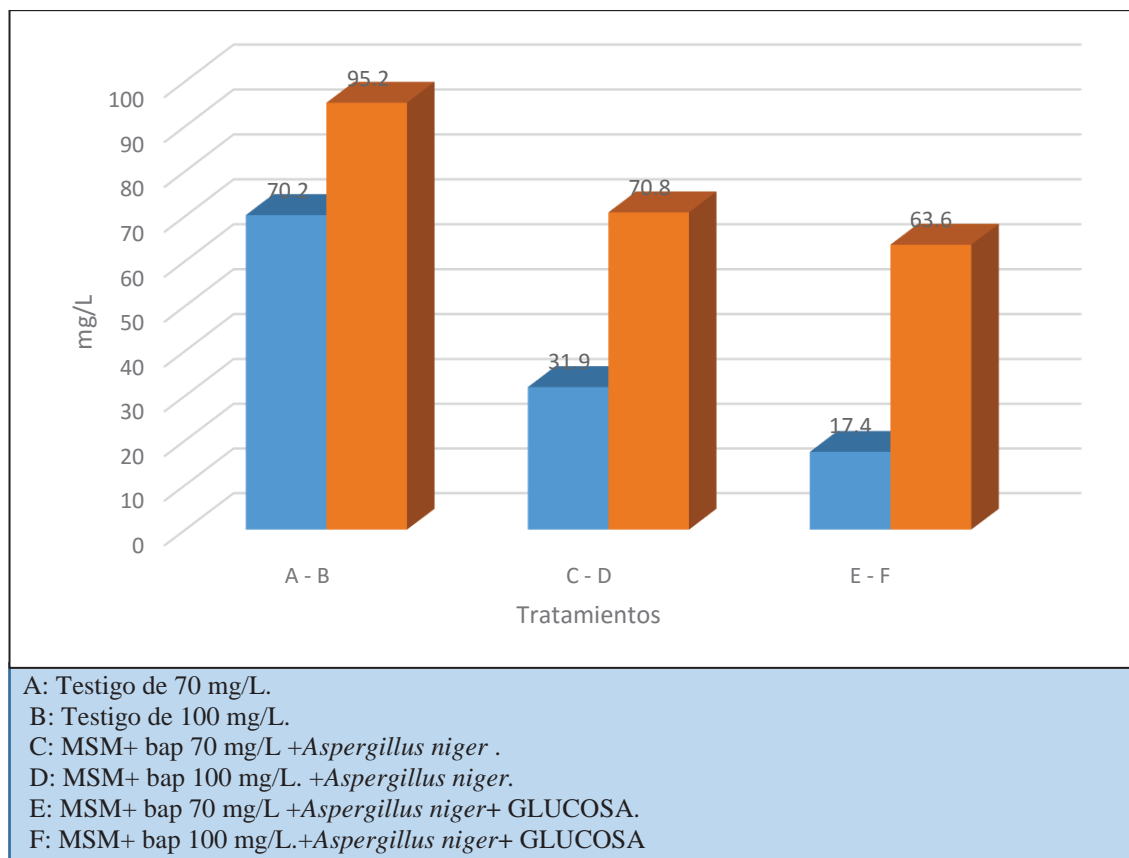


Figura 38: Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 14 días.

Finalmente se hizo una comparación con los resultados obtenidos el día 28 en los diferentes tratamientos para poder ver las diferencias en las concentraciones ocasionadas por la biodegradación de benzo[a]pireno **Tabla 38**.

Tabla 38: Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 28 días.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
A	3	58,9	,43589	58,40	59,20
C	3	30,0	,05774	30,00	30,10
E	3	5,2	0,00000	5,20	5,20
B	3	88,3	,05774	88,30	88,40
D	3	55,4	0,00000	55,40	55,40
F	3	22,8	,15275	22,70	23,00

N: número de muestras.

Para ilustrar la comparación hecha en la anterior tabla tenemos la **Figura 39**.

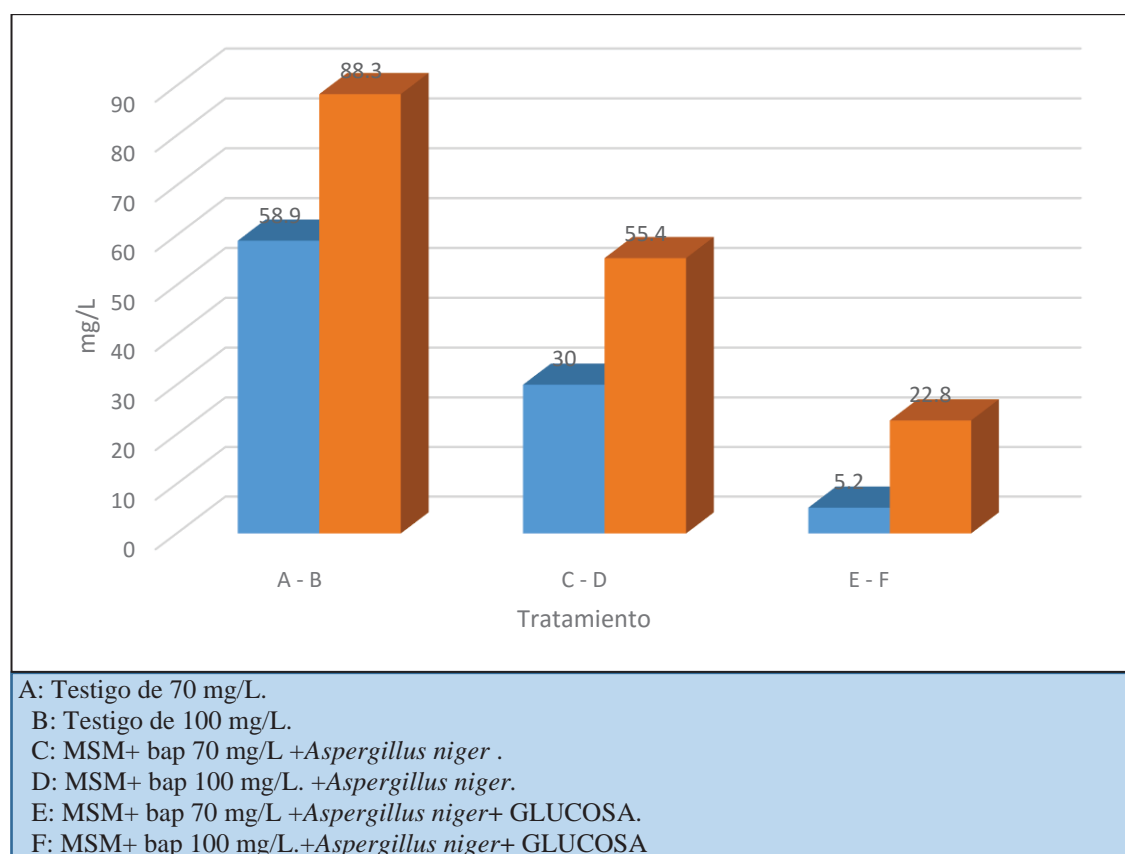


Figura 39: Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 28 días.

Para tener una mejor apreciación de la comparación de las medias de los resultados a los 0, 14 y 28 días de todos los tratamientos se presenta la **Figura 40**.

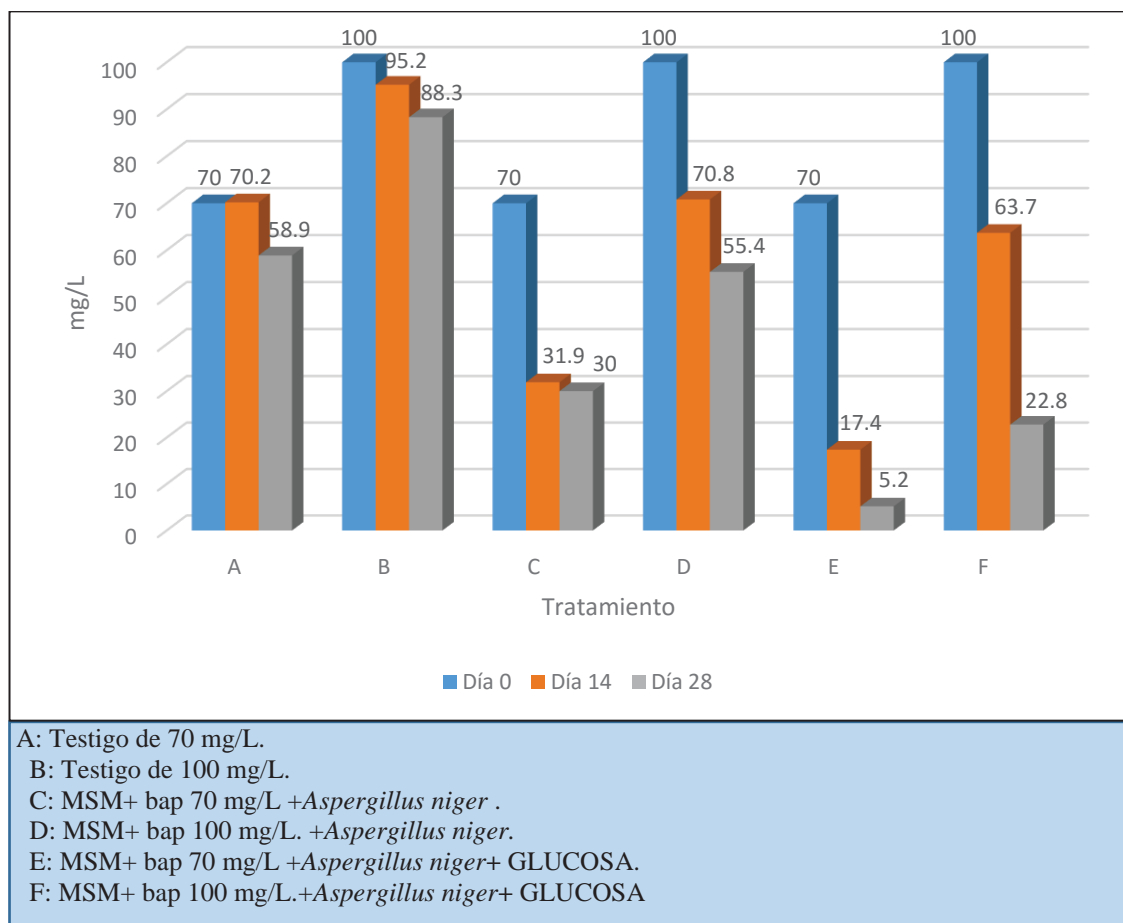


Figura 40: Comparación de los tratamientos de concentración inicial 70mg/L (A, C y E) y 100mg/L (B, D y F) a los 0, 14 y 28 días.

Al analizar los resultados en conjunto como se presenta en la anterior figura se observa claramente que los tratamientos con concentraciones iniciales de 70 mg/L presentaron una mayor biodegradación de benzo[a]pireno teniendo al día 28, cuando terminó el experimento, más de mitad de la concentración inicial biodegradada en los tratamientos C y E; a diferencia de los tratamientos que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L donde solo el tratamiento F pudo llegar a pasar la brecha de más de mitad de la biodegradación de concentración inicial y no así el tratamiento D. En cuanto a biodegradación no se consideran a los Tratamientos A y B por ser tratamientos Testigo.

3.5. Determinación del porcentaje de biodegradación final en cada tratamiento

Para saber el porcentaje de biodegradación de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* a los 14 y 28 días de todos los tratamientos del trabajo de investigación se presenta la **Tabla 39**, donde no se consideran los porcentajes del día 0 por no existir una biodegradación en este.

Tabla 39: Porcentaje de biodegradación de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 considerando el tipo de tratamiento y el tiempo de evaluación.

	Tratamientos	concentraciones	día 14	día 28
Tratamientos	A	70 mg/L	0%	15,9%
	B	100 mg/L	4,8%	11,7%
	C	70 mg/L	54,4%	57,1%
	D	100 mg/L	29,2%	44,6%
	E	70 mg/L	75,1%	92,6%
	F	100 mg/L	36,4%	77,2%

A: Testigo de 70 mg/L.

B: Testigo de 100 mg/L.

C: MSM+ bap 70 mg/L +*Aspergillus niger* .

D: MSM+ bap 100 mg/L. +*Aspergillus niger*.

E: MSM+ bap 70 mg/L +*Aspergillus niger*+ GLUCOSA.

F: MSM+ bap 100 mg/L.+*Aspergillus niger*+ GLUCOSA.

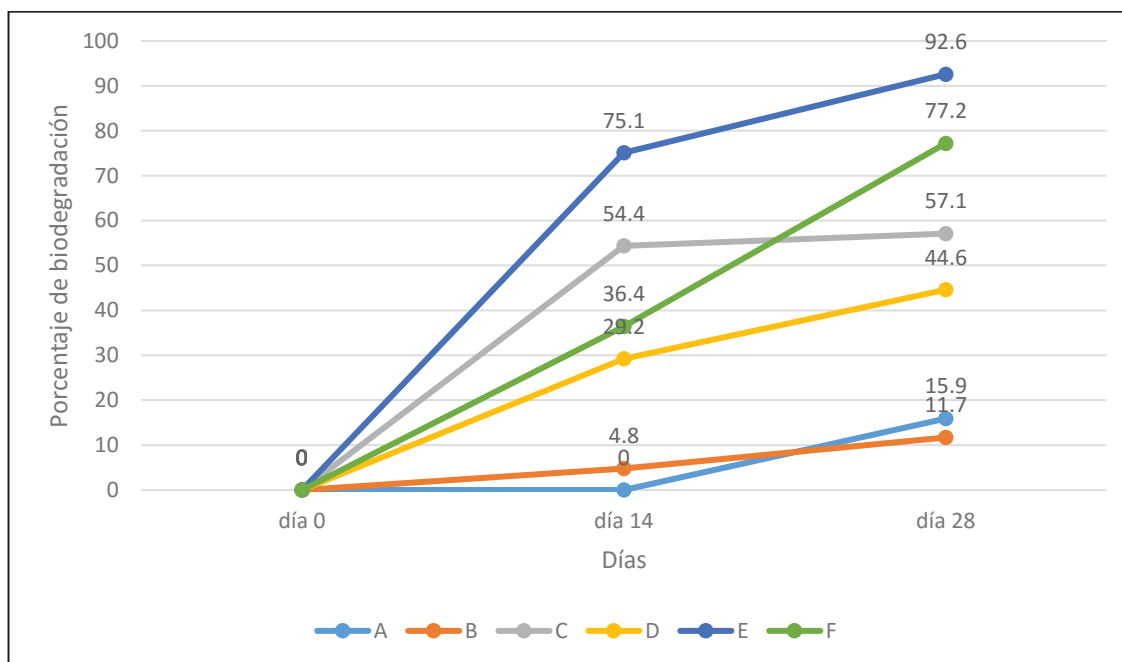


Figura 41: Porcentaje de biodegradación de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 considerando el tipo de tratamiento y el tiempo de evaluación.

Según la **Tabla 32** y la **Figura 41** en los tratamientos A y B no se presentó una biodegradación considerable ya que estos son el tratamiento blanco o testigo de la experimentación y no presentan el agente biodegradador que es *Aspergillus niger*, en el resto de los tratamientos se observó que los que iniciaron con una concentración de 70 mg/L fueron degradados de mejor manera que los que tuvieron una concentración inicial de 100 mg/L. El tratamiento que presentó un mayor porcentaje de biodegradación de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* al culminar la experimentación fue el E con un 92,6 % de biodegradación casi la totalidad de la concentración inicial del hidrocarburo.

3.6.Evaluación de la influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275

En la **Tabla 40** empleando Anova multifactorial entre grupos se evaluará la influencia de todas las variables independientes que son la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275.

Tabla 40: Influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275.

Origen	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	P
Modelo corregido	98375607,473 ^a	17	5,786,800,440	135,571,647	,000
Intersección	414,343,248,027	1	414,343,248,027	9,707,125,240	,000
Tiempo	32,233,273,674	2	16,116,636,837	377,576,352	,000
Concentraciones	20,418,246,427	1	20,418,246,427	478,353,337	,000
Tratamiento	23,783,446,223	2	11,891,723,112	278,596,179	,000
Tiempo * Concentraciones	3,963,765,714	2	1,981,882,857	46,431,033	,000
Tiempo * Tratamiento	11,012,697,222	4	2,753,174,306	64,500,648	,000
Concentraciones * Tratamiento	3,968,553,934	2	1,984,276,967	46,487,122	,000
Tiempo * Concentraciones * Tratamiento	2,995,624,278	4	748,906,069	17,545,176	,000

De la tabla se concluye que todas las variables independientes; la glucosa como co-sustrato, el tiempo de experimentación, la presencia de *Aspergillus niger* y las concentraciones iniciales; consideradas en el experimento influyen en la biodegradación de benzo[a]pireno.

Muchos autores hacen referencia a la gran capacidad biodegradativa que tienen los hongos lignolíticos frente a los hidrocarburos policíclicos aromáticos por haber sido aislados de ambientes contaminados con crudo de petróleo, Uzoamaka *et al.* (2009), describen la alta capacidad de *Aspergillus niger* y *Aspergillus versicolor* de degradar en

7 días un 99% de los siguientes HAPs: acenaftaleno, Benzo[a]antraceno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[g,h,i]perileno, Benzo[a]pireno, criseno, Di-benzo[a,h]antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno.

La gran capacidad de biodegradación de los hongos se debe a la producción de enzimas ligninolíticas, lo que corrobora la importancia de estas enzimas oxidativas en la capacidad degradativa de los hongos (Naranjo *et al.*, 2007).

Se argumenta de esta manera la elección como agente biodegradador de *Aspergillus niger* para la presente tesis.

Se hicieron diversos estudios para evaluar la capacidad que tienen los microorganismos de biodegradar hidrocarburos policíclicos aromáticos, muchos de estos estudios tomaron en cuenta otros parámetros de investigación como Vanishree, M., Thatheyus, A.J. & Ramya, D. (2014) quienes emplearon un medio solido (PDA) mezclado con petróleo sobre el cual sembraron el hongo *Penicillium* sp. Y determinaron una biodegradación de acuerdo al crecimiento del hongo y a la producción de CO₂ en cada unidad experimental.

Machin, *et al.*, 2010 estudiaron la biodegradación de Benzo[a]pireno teniendo como agente biodegradador a *Aspergillus niger* con concentraciones menores a las que se consideró en la presente tesis (25 mg/L y 50 mg/L) obteniendo como resultado en 5 días un porcentaje de biodegradación de 56% y 38% respectivamente. Ellos no emplearon ningún tipo de co-sustrato teniendo como única fuente de carbono al benzo[a]pireno. En el presente trabajo se pudo observar que *Aspergillus niger* biodegrada con mayor eficiencia a concentraciones menores del benzo[a]pireno y con la presencia de co-sustrato la biodegradación es aún mayor, esto debido a que tienen como fuente de carbono primario a la glucosa, está como toda fuente de carbono fácil de degradar ayuda al crecimiento del hongo que al consumir toda la glucosa empieza a biodegradar al benzo[a]pireno teniendo una población mayor.

CONCLUSION

1. Se determinó que la presencia de glucosa al 10% como co-sustrato influye en la biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275, esto se demostró empleando comparaciones de los promedios, la prueba ANOVA de un factor teniendo como resultado una diferencia significativa ($\text{sig} \leq 0.05$) frente a los tratamientos que no presentaban un co-sustrato.
2. Se identificó que el tiempo óptimo del proceso de biodegradación del benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275 el cual fue el día 28 en todos los tratamientos, lo que demuestra que a mayor tiempo de exposición del agente biodegradador al benzo[a]pinero mayor será la biodegradación de este.
3. Se determinó una mayor capacidad de biodegradación a una concentración inicial de 70 mg/L donde los tratamientos C y E presentaron una biodegradación del 57,1% y 92,6% respectivamente % frente a los tratamientos con concentración inicial de 100 mg/L donde solo uno de los tratamientos paso le brecha de más del 50% de biodegradación, esto se determinó haciendo una comparación entre las medias de los resultados obtenidos en el tiempo de duración del experimento.
4. Se determinaron los porcentajes a los 28 días de biodegradación de cada tratamiento; A (Testigo 70mg/L) = 15,9%, B (Testigo 100mg/L) = 11,7%, C (MSM+ bap 70 mg/L +*Aspergillus niger*) = 57,1%, D (MSM+ bap 100 mg/L +*Aspergillus niger*) = 44,6%, E (MSM+ bap 70 mg/L +*Aspergillus niger* + GLUCOSA) = 92,6%, F (MSM+ bap 100 mg/L +*Aspergillus niger* + GLUCOSA) = 77,2%; concluyendo que el mayor porcentaje de biodegradación se presentó en el tratamiento E.
5. Se evaluó la influencia de la glucosa como co-sustrato en el tiempo de biodegradación con dos concentraciones de benzo[a]pireno por *Aspergillus niger* ATCC 6275, concluyendo que todas estas variables independientes influyen de manera significativa ($\text{sig} \leq 0.05$) en conjunto en la biodegradación de benzo[a]pireno, se tuvo una mayor biodegradación a una concentración inicial de 70 mg/L el día 28 de evaluación y con presencia de glucosa al 10% como co-sustrato.

SUGERENCIAS

- Realizar más estudios relacionados a la biodegradación de los diferentes hidrocarburos presentes en el medio ambiente en condiciones de laboratorio, para que sirvan como precedentes y para estudios posteriores de biorremediación en áreas contaminadas.
- Mejorar la implementación del laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría en cuanto a equipos, materiales y reactivos; para el estudio de compuestos orgánicos.
- Incentivar y participar en la elaboración de proyectos relacionados a la biodegradación y biorremediación de compuestos persistentes en el medio ambiente.
- Se sugiere llevar a cabo el proceso de biorremediación de un área contaminada con Benzo[a]pireno teniendo como precedente el presente trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ABADULLA, E., TZANOV, T., COSTA, S., ROBRA, K. H., CAVACO-PAULO, A. AND GÜBITZ, G. M. (2000). Decoloration and detoxification of textile dyes whit a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied ans Environmental Microbiology*. 66:3357-3362.

ABARCA, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana Micología*, 17: S79-S84.

ADEKUNLE, A., UABONI-EGBENNI, P., AJAYI, T. (2004). Biodegradation of petroleum products by *Saccharomyces cerevisiae* isolated from the Lagos lagoon. 17: 83-94.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY POLYCYCLIC AROMATIC. (2009). *Hydrocarbons Toxic Substances Portal* (PAHs), Atlanta. Recuperado de <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=25>.

AGILENT TECHNOLOGIES INTRODUCTIONS TO HPLC .(2014). <http://www.chem.agilent.com/> 10-11-2014, 10:37h.

AGUDO, A. (2009). *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos son Tóxicos (HAP) Acercamiento a su Problemática como Riesgo Laboral*. Madrid, España: Process Print, S.L.

AINSWORTH, G. (1973). The fungi, Vol. IV A. *Taxonomic Review with keys, Ascomycetes and Fungi imperfecti*. New York. Academic Press.

ANTEQUERA, A. (2010). *Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos policíclico aromáticos totales en aguas de la Bahía de Amuay, utilizando el hongo*

lignolítico Aspergillus flavus como agente de biorremediación (Tesis de Maestría).
Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Venezuela.

ALBELLA, JM., CINTA, A.M., MIRANDA, T. & SERRATOSA, J.M. (1993).
Introducción a la ciencia de materiales. C.S.I.C.

ALEXANDER, M. (1999). *Biodegradation y Biorremediation*. Segunda edición.
Academic Press, Inc., San Diego.

ATLAS, R. (1981). *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An
Environmental Perspective*. *Microbial Rev.* 45 (1): 180-209.

AVRAMOVA, T., SOTIROVA, A., GALABOVA, D., KARPENKO, E. (2008).
Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene
by *Pseudomonas* sp. cells. *Int. Biodet. Biodegr.*, **62**(4), 415-420.

BARR DP, AUST SD. (1994). Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants.
Environ Sci Technol; 28(2):78A-87A.

BAYNE S., Y CARLIN M.F. (2010). *Applications of High Performance
Liquid Chromatography* CRC Press USA 2010 pag 5.

BEZALEL, L., Y. HADAR, AND C. E. CERNIGLIA. (1996). Mineralization of
polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*.
Appl. Environ. Microbiol. 62:292-295.

BLUMER, M. (1976). Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am.* **234**(3), 35
45.

BONNARME, P. AND JEFFRIES, W. (1990). Mn (II) regulation of lignin
peroxidase and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot
fungi. *Applied and Environmental Microbiology.* 56:210-217.

BRAVO, A., VOLKE, T., GUTIERREZ, M. (2002). *Degradación de altas concentraciones de Benzo [a] pireno por hongos filamentosos en cultivo sólido*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

BUMPUS, J.A., KAKAR S.N., COLEMAN R.D. (1993). Fungal degradation of organophosphorus insecticides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39/40: 715-726.

BUSWELL, S. A. AND ODIER, E. (1987). Lignin degradation. *Crit. Rev. Biotechnol.* 6:1-60.

CASTILLO, M.P. (1997). Degradation of pesticides by *Phanerochaete chrysosporium* in solid substrate fermentation. in: *Department of Microbiology*, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.

CERNIGLIA, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:324-333.

CHANG, B.V., CHANG, I.T., YUAN, S.Y. (2008). Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 80(2), 145-9.

CORRADINI, D. (2012). *Handbook of HPLC 2Ed* CRC Press USA 2012 Pag. 109.

DAGLEY, S. (1981). New perspectives in aromatic catabolism. in: *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*, A.M.C. T. Leisinger, R. Hütter and J. Nüesch editors (Ed.). Academic Press. New York, pp. 181-186.

DAN, S., PEI, L., STAGNITTI, F., XIAN, X. (2006). Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. *Journal of Environmental Sciences*, 06, 1204-1209.

DE LORENZO, V. (1994). Designing microbial systems for gene expression in the field. *Trends in Biotechnol.* 12:365-371.

DOJLIDO, J. y BEST, G. (1993). *Chemistry of Water and Water Pollution*. Ellis Horwood Limited (Ed.), Inglaterra.

EC, (2001). European commission, Ambient Air Pollution by PAHs. Position paper, Office for official Publications of the europe communities, Luxemburg.

EDWARDS, D.A., LUTHY, R.G., LIU, Z. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Env. Sci. Technol.*, **25**(1), 127-133.

EISLER, R. (1987). Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report*, 81-85.

EPA, (2007). Water Quality Standards; Establishment of Numeric Criteria for Priority Toxic Pollutants; States' Compliances. *Federal Register*. 2007 (Rev.). Vol. 57, Issue 246, p. 60848 (57 FR 60848).

ERCOLI, G.; GÁLVEZ, J.; DI PAOLA, P. ; CANTERO, J.; VIDELA, S.; MEDAURA, M.; BAUZÁ, J. (2002). Análisis y evaluación de parámetros críticos en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Apuntes. Estudio realizado en laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. pp 10.

FERNANDO, T., BUMPUS J.A., AUST S.D. (1990). Biodegradation of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1666-1671.

FIELD, J.A., JONG E.D., FEIJOO-COSTA G., DE BONT J.A.M. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIRTECH 11*: 44-49.

GOLDMAN, R. (2001). Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Research*, **61**, 6367-6371.

GÓMEZ, A.L. (2012). Efecto de la variación de los niveles de P & K en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de *Aspergillus niger*. Monografía. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

HADIBARATA, T., AYU, R. (Enero, 2012). Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by White-rot fungus *Armillaria* sp. F022. *ScienceDirect*, 107, 314-318.

HANAI, T.T. (1999). HPLC A Practical Guide The Royal Society of Chemistry UK 1999 pag 57.

HAVE, R., TEUNISSEN, P. J. M. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by whiterot fungi. *Chem. Rev.* 101:3397-3413.

HEFRMANN, E. (2004). *Chromatography, 6Ed, Part A: Fundamentals And Applications Of Chromatography And Related Differential Migration Methods* Elsevier Science Netherlands 2004 Pag 222.

HOFRICHTER, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **30**, 454-466.

HUU, N. B., E. B. M. DENNER, T. C. HA-DANG, G. WANNER, AND H. STAN-LOTTER. (1999). *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a vietamese oil-producing well. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 49:367-375.

IARC Monographs - 100F. Evaluation of Benzo[a]pyrene [Internet]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-14.pdf>.

JOHANNES C, MAJCHERCZYK A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000 66:524-8.

JOHRI, A. K., M. DUA, A. SINGH, N. SETHUNATHAN, AND R. L. LEGGE. (1999). Characterization and regulation of catabolic genes. *Crit.Rev.Microbiol.* 25:245- 273.

JUHASZ, A.L., NAIDU, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *Int. Biodet. Biodeg.*, **45**, 57-88.

KEITH, L.H., TELLIARD, W.A. (1979). Priority pollutants: a perspective view. *Env. Sci. Technol.*, **13**, 416-423.

KENNEDY, D., S. AUST & A. BUMPUS. (1990). Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767. *Applied Environmental Microbiology* 56(8): 2347-2353.

KIRK, T. K., CHANG, H. M. (1975). Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforschung* 29:56-64.

KISHI, K., WARIISHI, H., MARQUEZ, L., DUNFORD, H. B. AND GOLD, M. H. (1994). Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic chelators and pH. *Biochemistry.* **33**:8694-8701.

KLICH, M., PITT, J. (1988). A laboratory guide to the common aspergillus species and their teleomorphs. Australia. P.5-30.

KOTTERMAN, M.J., RIETBERG, H.J., HAGE, A., FIELD, J.A. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. *Biotechnol. Bioeng.*, **57**(2), 220-7.

KUAN, I.C., JOHNSON, K.A. AND TIEN, M. (1993). Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. *J Biol Chem.* 268(27):20064-20070.

LANDAZÁBAL, P. (2004). Obtención de etanol a partir de almidón de yuca variedad chile en un proceso de 2 etapas: Hidrolisis (*Aspergillus niger*) – Fermentación (*Zymomonas mobilis*). Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia.

LEAHY, J.G. Y COLWELL, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews* 54(3): 427 –450.

LEY N°. 28611, Ley General del Ambiente.

LI, J., CHEN, B. (2009). Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Materials*, **2**, 76-94.

LIANG, Y., BRITT, D.W., MCLEAN, J.E., SORENSEN, D.L., SIMS, R.C. (2007). Humic acid effect on pyrene degradation: finding an optimal range for pyrene solubility and mineralization enhancement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**(6), 1368-75.

LLADO, S. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas* (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, España.

LU, X.Y., ZHANG, T., FANG, H.H. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**(5), 1357-71.

MACHIN, C., MORALES, D., MARTINEZ, F., OKOH, A., TREJO, M. (2010). Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. *ScienceDirect*, 64, 538-544.

MACCAS, A.P. & MENDEZ, G.I. (2013). Evaluacion de la capacidad biotransformadora de taninos del guarango (*Caesalpinia spinosa*) a través de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*. Tesis de grado. Universidad Politécnica Salesiana. Quito.

MAHRO, B. (2000). Bioavailability of Contaminants. En *Biotechnology. Environmental Processes II. Soil Descontamination*. Wiley-VCH. Volume 11b. pp 63-87.

MANAHAN, S. (2007). *Introducción a la química ambiental*. 2006. Edit. Reverte. ISBN 8429177070.

MARIÑO, B. (2009). Biodegradación estimulada de aguas contaminadas con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por aislados nativos *Pseudomana* spp (Tesis de Pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

MARQUEZ, F.J., HERNANDEZ, V.Z., VAZQUEZ, R. (2000). Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the White rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 469-472.

MASTANDRE, C., CHICHIZOLA, C., LUDEÑA, B., SANCHEZ, H., ALVAREZ, H., GUTIERREZ, A. (2005). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 39(1): 27-36.

MICHAEL, W. (2006). *Dong Modern HPLC for Practicing Scientists*
Wiley USA 2006 Pag 91

MINOWA, T., S. YOKOYAMA, AND T. OKAKURA. (1995). Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel* 74:1735- 1738.

MIYAMOTO, K. (1997). Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. FAO Agricultural Services Bulletin 128. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

NARANJO, L., URBINA, H., DE SISTO, A., LEON, V. (2007). Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatal Biotransfor* 25: 1-9.

NELSON-SMITH, A. (1973). *La contaminación por hidrocarburos y la Ecología Marina*, Nueva York, Plenum Press.

OMURA, T. (1999). Forty years of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 690-698.

PENG, R., XIONG, A., XUE, Y., FU, X., GAO, W., TIAN, Y., YAO, Q. (2008). *Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol.* 2008, Rev.Jul.24.

PEREZ, S. (2010). *Detección y degradación de hidrocarburos polinucleoaromaticos en agua por cultivo aerobio mixto (Tesis de Maestría)*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

POINTING, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:20-33. *Microbiol.* 56: 2347-2353.

PRINCE, R. C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19, 217-242.

QUANTIN, C., JONER, E.J., PORTAL, J.M., BERTHELIN, J. (2005). PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. *Environ. Pollut.*, **134**(2), 315-22.

SAMPIERI, R.H., FERNANDEZ, C., BAPTISTA, P. (2010). Metodología de la investigación. Editorial Interamericana Editores. Quinta edición México D.F.p.244-250.

SAMSON, R., HOPKSTRA, E. (1995). Introduction to food-borne fungi. Editorial Ponsen & Loogen. Cuarta edición Netherlands. p. 64.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., C.A.N. VAN OORSCHOT. (1984). Introduction to food-borne fungi. Segunda edición. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.

SUDIP, K., OM, V., RAKESH.K. (2002). *Polycyclic aromatic hydrocarbons:environmental pollution and bioremediation. TRENDS in Biotechnology.* Vol.20. N°.6.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., DOLAN. J.W. (2010). Introduction to Modern Liquid Chromatography Wiley USA 2010 pag 113.

SUATERNA, A. (2009). La fritura de los alimentos: el aceite de fritura. Perspectivas en nutrición humana *Rev. Universidad de Antioquia.* Medellín. Colombia 2009; Vol. 11 No. 1.

TINOCO, R., ROMAN, R., VAZQUEZ-DUHALT, R. (1997). *Alteración de las Propiedades Catalíticas del Citocromo C por modificaciones químicas para la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos. VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos. 1997, B016, p. 229.*

TORRES, L., MIJAILOVA, P., MÖELLER, G. (1997). Uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos., *Ingeniería Hidráulica en México. Vol. XII. N° 3. sept-dic., p. 15-25.*

TWISS, M.R., GRANIER, L., LAFRANCE, P., CAMPBELL, P.G.C. (1999). Bioaccumulation of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and pyrene by picoplankton (*Synechococcus leopoliensis*, Cyanophyceae): influence of variable humic acid concentrations and pH. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 2063-2069.

UE, (1996). Union Europea. Directiva 96/62/CE del Consejo, de 27 de septiembre de 1996, sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente. Union Europea. Directiva 96/62/CE del Consejo.

UE, (2004). Union europea. Directiva 2004/107/CE del parlamento europeo y del consejo de 15 de diciembre de 2004 relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente. Union europea. Directiva 2004/107/CE.

UZOAMAKA, G.O., FLORETTA, T., FLORENCE, M.O. (2009). Hydrocarbon Degradation Potentials of Indigenous Fungal Isolates from Petroleum Contaminated Soils. *J Nat & Phys Sc* 31: 1-6.

VANISHREE, M., THATHEYUS, A., RAMYA, D. (2014). Biodegradation of petrol using *Aspergillus* sp. Annual research & review in Biology, ISSN ; 2347-565X, vol.:4. India.

VELEZ, A. (1989). Urso avanzado de hongos oportunistas. Universidad de Antioquia. Medellin. P. 4-8.

VENKATESH S., REDDY Y.S., RAMENSH M., SWAMY M.M., MAHADEVAN N. & SURESH B. (2008). Pharmacognostical studies on *Dodonaea viscosa* leaves, *African J Pharmacol*, 2 (4): 2008, 83-88.

VIÑAS, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica Facultat de Biologia Departament de Microbiologia Barcelona.

VIÑAS, M., M. GRIFOLL, J. SABATE Y A. M. SOLANAS. (2002). Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J. Ind. Microbol. Biotechnol.* 28:252-260.

WADE, L. (2009). Organic Chemistry. 7th edition. ISBN13:9780321610065.

WARIISHI, H., DUNFORD, H. B., MACDONALD, I. D. AND GOLD, M. H. (1989). Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*: transient-state kinetics and reactions mechanism. *J. Biol. Chem.* 264:23688-23695.

WARIISHI, H. & GOLD, M. H. (1990). Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265 (4): 2070- 2077.

WARIISHI, H., HUANG, J., DUNFORD, H., GOLD, M. (1991) *Biol. Chem.* 266, 20694. WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S.N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.*, 22(1-2), 161-87.

WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, *Biotechnology. Advances*, 22, pp 161–187.

WHO, (1998). World Health Organization. Environmental health criteria for selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. International Programme on Chemical Safety, Geneva.

YEBRA, I., FERNANDEZ, R., MARTINEZ, E., SIMAL, J. (2012). Searching ingredients polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds due to atmospheric or pyrolytic sources. *Food Chemistry*, **135**, 2043-1051.

ZHENG, Z., OBBARD, J.P. (2001). Effect of non-ionic surfactants on elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil-slurry by *Phanaerochaete chrysosporium*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **76**(4), 423-429.

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación de papa dextrosa agar (PDA)

- Papa sin pelar 200g
- D- glucosa 10g
- Agar agar 18g
- Agua destilada 1 Litro

- **Procedimiento:** Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la D- glucosa y el agar agar, esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión.

Fuente: Cañedo & Ames, 2004.

ANEXO 2

Preparación de solución Tween 80 al 0.1%:

- De la formula comercial hacer una dilución al 10%. Tomar 10 ml de Tween 80 y agregar 90 ml de agua destilada. Esta solución se puede mantener en stock en refrigeración a 10°C.
- Para la preparación de Tween al 0.1%, tomar un mililitro de la solución al 10% y agregarle 99 ml de agua destilada.
- Agregar NaCl a la solución (9.0 g/L)
- Esterilizar la solución en autoclave a 121°C por 20 min a 15 libras de presión.

Fuente: Rojas, 2011.

ANEXO 3

Procedimiento para el conteo de conidios en la Cámara de Neubauer

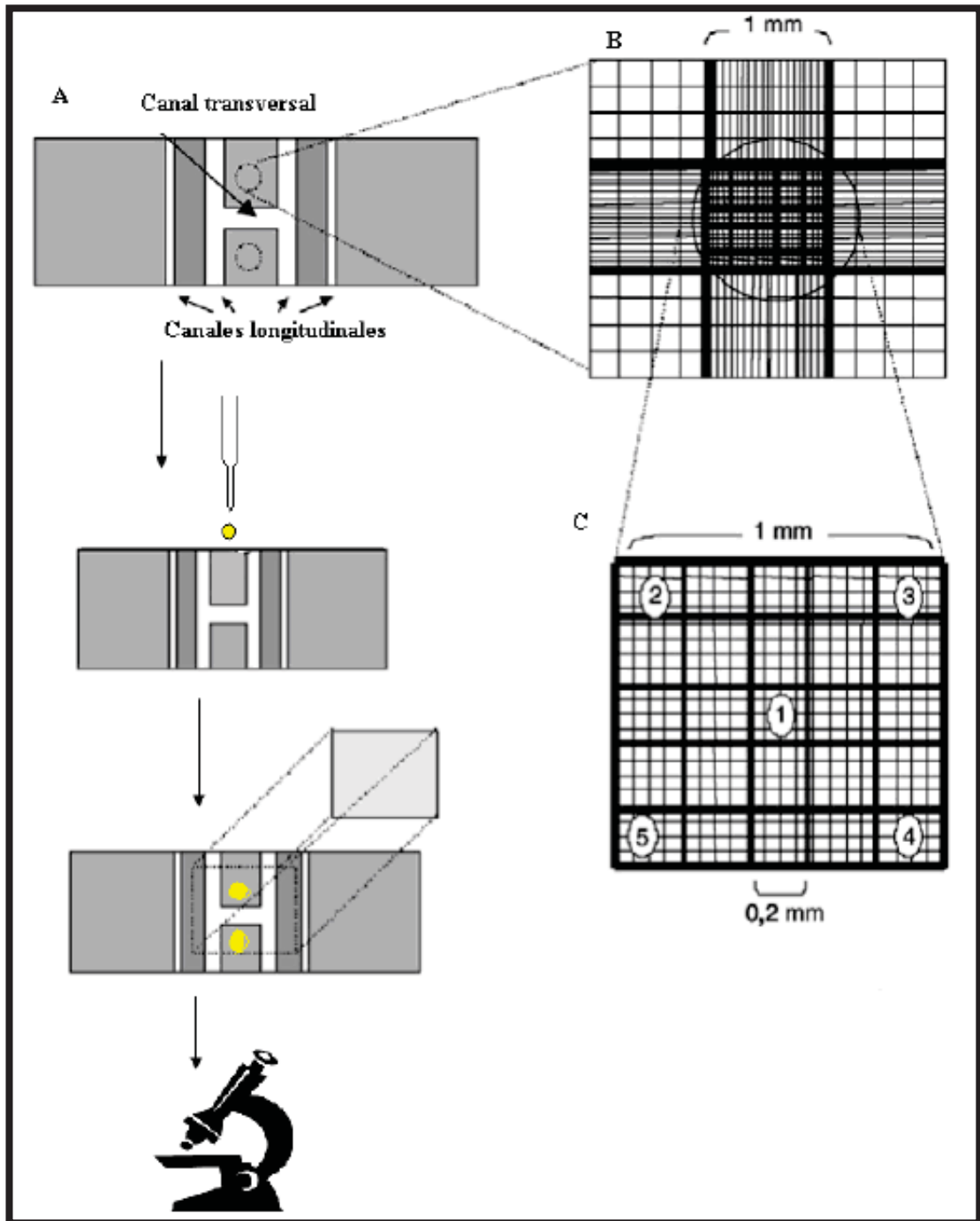
1. Limpiar la cámara
2. Con la ayuda de una pipeta suspender una gota de la solución a analizar sobre el portaobjeto y dejar que se disperse.
3. Colocar el cubreobjeto cuidando de no formar burbujas de aire. Caso contrario se deberá repetir la operación lavando y secando el portaobjetos. Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0,1 mm. De forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será $0,1 \text{ mm}^3$ ($1,0 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$).
4. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10x. Se enfoca de manera que en el campo se cubra un cuadrado cuya área corresponda a 1 mm^2 , generalmente se trabaja con el cuadro central. El área del cuadro central es de 1 mm^2 y se encuentra subdividida en 25 cuadrados. Cada uno de estos cuadrados mide 0,2 mm de lado, por lo que el área de cada uno será de $0,04 \text{ mm}^2$ (ver figura 8.1 C).
5. Una vez ubicada la cuadrícula de 25 cuadros de $0,04 \text{ mm}^2$, hacer un cambio de lente al objetivo 40x y contar las células que se encuentran en el mismo.
6. Para alcanzar resultados más exactos se recomienda tener un conteo entre 200 y 300 células por muestra. Cuando en el cuadro central existen menos de 200 células, es necesario revisar más cuadros para el conteo. Se sugiere continuar el conteo en los cuatro cuadros que forman las esquinas de la cuadrícula. Si aun así no se alcanza las 200 células, se debe contar el total de los 25 cuadrados.
7. En caso de que el número de células sea muy elevado y se dificulte su conteo será necesario diluir la suspensión muestra en una proporción conocida, la que deberá ser tenida en cuenta en la estimación final.

Determinación de la densidad celular:

$N^\circ \text{ de cél. en } 0,1 \text{ mm}^3 = N^\circ \text{ total de cél. contadas} / N^\circ \text{ de cuadrados de } 0,04 \text{ mm}^2$

El N° de células por ml se obtendrá al multiplicar el valor obtenido por 10000.

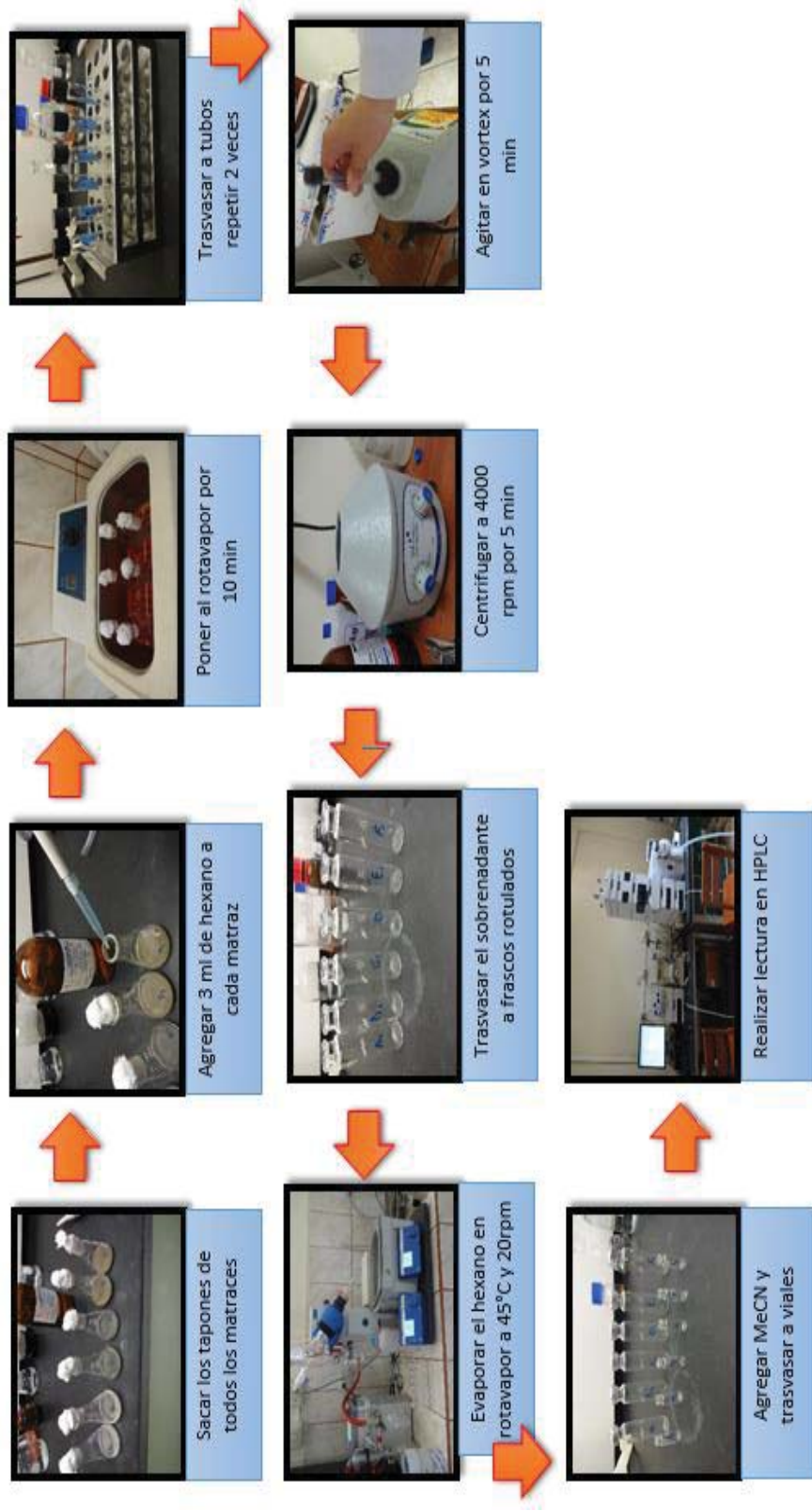
$$\text{N}^\circ \text{ de células / ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadros de } 0,04 \text{ mm}^2} \times 10.000$$



Fuente: Manacorda *et al.*, 2007.

ANEXO 4

Procedimiento de extracción, concentración y resuspensión de Benzo[a]pireno



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 5

Medio de Sales Minerales (MSM) mg/L:

- **Reactivos:**

1.	KH_2PO_4	2000
2.	K_2HPO_4	600
3.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1400
4.	MgSO_4	300
5.	CaCl_2	300
6.	FeSO_4	10

Fuente: Escalante, 2002.

ANEXO 6



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA - Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERU Contacto 973868855

CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, responsable del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad De Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que la Bach. Betsy Indira Galindo Flores, de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad De Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco ha presentado al Laboratorio de Cromatografía 18 muestras para su caracterización e identificación de benzopireno, como parte de su proyecto de investigación titulado "INFLUENCIA DE LA GLUCOSA EN EL TIEMPO DE BIODEGRADACIÓN CON DOS CONCENTRACIONES DE BENZO[a]PIRENO POR *Aspergillus niger* ATCC 6275". Dicho material ha sido cuantificado utilizando el Cromatógrafo líquido HPLC-DAD Agilent serie 1200. La identificación se basó en las señales de la muestra comparadas con el estándar de Benzopireno.

Se expide la siguiente constancia a solicitud de la interesada para los fines que viera por conveniente.

Cusco 15 de Octubre del 2015

Quim. Jorge Chiquensira Peri
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
OQP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA - Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

Día 0

	Tratamiento	Área	Promedio	mg/l	valor real
día 0	A	3559.5	3566.8	70	69.9
	A	3574.9		70	70.2
	A	3565.9		70	70
	B	4075.5	4073.6	100	100
	B	4071.3		100	99.9
	B	4074.1		100	100
	C	3559.5	3566.8	70	69.9
	C	3574.9		70	70.2
	C	3565.9		70	70
	D	4075.5	4073.6	100	100
	D	4071.3		100	99.9
	D	4074.1		100	100
	E	3559.5	3566.8	70	69.9
	E	3574.9		70	70.2
	E	3565.9		70	70
	F	4075.5	4073.6	100	100
	F	4071.3		100	99.9
	F	4074.1		100	100

Día 14

	Tratamiento	Área	Promedio	mg/l	valor real
día 14	A	3576.0	3574.0	70	70.2
	A	3576.6		70	70.2
	A	3369.3		70	70.1
	B	3885.9	3878.9	100	95.4
	B	3877.8		100	95.2
	B	3873.1		100	95.1
	C	1696.4	1695.6	70	33.3
	C	1696.1		70	29.1
	C	1694.3		70	33.3
	D	2887.3	2885.8	100	70.9
	D	2894.5		100	70.8
	D	2885.7		100	70.8
	E	885.6	885.4	70	17.4
	E	885.4		70	17.4
	E	885.1		70	17.4
	F	2586.9	2589.5	100	63.5
	F	2590.8		100	63.6
	F	2590.8		100	63.6


Jorge Chuguenatha Pari
C.G.A. N° 814



Día 28

	Tratamiento	Área	Promedio de Áreas	mg/l	valor real
día 28	A	2975.4	3001.5	70	58.4
	A	3011.1		70	59.1
	A	3018.1		70	59.2
	B	3600.0	3597.8	100	88.4
	B	3598.0		100	88.3
	B	3595.3		100	88.3
	C	1532.0	1530.9	70	30.1
	C	1530.3		70	30.0
	C	1530.3		70	30.0
	D	2256.6	2256.4	100	55.4
	D	2255.6		100	55.4
	D	2257.0		100	55.4
	E	263.4	263.0	70	5.2
	E	262.9		70	5.2
	E	262.7		70	5.2
	F	935.5	930.7	100	23.0
F	930.1	100		22.8	
F	926.4	100		22.7	

Guim. Jorge Choquenaira Parí
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CCP - 914