

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Degradación de hidrocarburos con hongos micorrízicos
arbusculares *Rhizophagus irregularis* y una cepa nativa
proveniente de la Amazonía Ecuatoriana asociados a pasto
RyeGrass (*Lolium multiflorum*).**

Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

MÓNICA PATRICIA MOGROVEJO ARIAS

Quito, 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación en Microbiología de la señorita Mónica Patricia Mogrovejo Arias ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

MSc. Verónica Luna
Directora de la Disertación
Quito, 12 abril del 2019

DEDICATORIA

La microbiología representa mi mayor pasión, estoy perdidamente enamorada de este mundo minúsculo en el que los seres humanos, somos todos, unos visitantes (hospederos) efímeros, por lo que dedico este trabajo a sus diminutos habitantes.

Esta disertación es tan solo el comienzo de la aventura de descubrimiento, por lo que quiero dedicarla a todos quienes la han alimentado hasta ahora.

Al “Flakito”, por caminar a mi lado con su luz, reflejada en su interesante sentido del humor.

Mi madre (Monkey) y mi padre (Papaito), por amar y escuchar mis historias, aunque no las encuentren tan fascinantes como yo.

A mi hermana Diana Carolina, por ser mi mayor ejemplo de amor, inspiración y modelo a seguir.

A mis compañeros del camino, camino que llamamos vida, Pajarito (Stephanie), Melissa, Belén, Marcelo, Brandon, Panchito, Josu, Tefa, Lucho y mis amigos de carrera.

A Dani Zurita, por llegar a mi vida en el momento justo y decidir sonreír a mi lado.

A todos mis maestros, por enseñarme a “Ser más para servir mejor”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi Dios, mi “Flakito”, por llevarme a donde debo ir y acompañarme siempre con su luz.

A mi familia, Monkey, Papaito y Nenito, por recordarme su amor incondicional y por ser quienes creen en mis más locas ambiciones.

A mi directora de la disertación, Máster Verónica Luna y a todas mis profesoras y profesores de la carrera de Microbiología, por contagiarme el amor por nuestro mundo microscópico. Porque gracias a ellos descubrí que, en los seres más microscópicos de nuestro universo conocido, residen las soluciones a los mayores problemas de la humanidad.

A todos mis compañeros y amigos de la carrera por hacer del viaje una aventura divertida, llena de locuras y complicidad.

También mi mayor agradecimiento a aquellos integrantes del proyecto “Reinforcement of the fungal expertise in Ecuador via case studies of fungal plants interactions in selected ecosystems and the development of biotechnology-oriented fungal resources centres” financiado por la Cooperación Universitaria para el Desarrollo (CUD, por sus siglas en francés) de Bélgica, Actualmente ARES (“Académie de Recherche et d’enseignement Supérieur) llevado a cabo entre la Universidad Católica de Lovaina, Universidad Técnica Particular de Loja y la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Proyecto que proporcionó los fondos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE ANEXOS	X
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1 SUSTRATO.....	9
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	9
4.3 PREPARACIÓN DEL ENSAYO.....	10
4.4 COSECHA Y ANÁLISIS DE LAS PLÁNTULAS DE PASTO	10
4.4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN MICORRÍZICA POR TINCIÓN DE RAÍCES.....	10
4.4.2 ANÁLISIS DE ALTURA Y PORCENTAJE DE PESO SECO DEL MATERIAL VEGETAL	11
4.4.3 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUSTRATO.....	12
4.4.4 DETERMINACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS EN EL SUSTRATO 13	13
4.4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
4.4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	15
5. RESULTADOS.....	17
5.1 ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN MICORRÍZICA ENTRE LAS CEPAS DE HMA Y LAS PLANTAS DE PASTO RYEGRASS (<i>Lolium multiflorum</i>).....	17

5.1.1	OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ÓPTICO DE RAÍCES TEÑIDAS CON TINTA AZUL.	17
5.1.2	RECuento DE ESPORAS	19
5.1.3	PARÁMETROS DE CRECIMIENTO VEGETAL	21
5.2	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUSTRATO POR CG-FID.....	26
5.2.1	CONCENTRACIÓN DE C17, C18, PRISTANO Y FITANO	26
5.2.2	ÍNDICES C17/ PRISTANO Y C18/ FITANO hacer 8,8,9	28
5.2.3	PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE PRISTANO Y FITANO.....	30
5.3	ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ACOMPAÑANTE.....	32
6	DISCUSIÓN.....	33
6.1	ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN MICORRÍZICA ENTRE LAS CEPAS DE HMA Y LAS PLANTAS DE PASTO RYEGRASS (<i>Lolium multiflorum</i>).	33
6.1.1	CRECIMIENTO VEGETAL	38
6.2	DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUSTRATO.....	39
6.3	MICROBIOTA ACOMPAÑANTE	40
7.	CONCLUSIONES	42
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	ANEXOS	59
	ANEXO 1.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Tinción de raíces con tinta azul para evidenciar micorrización.....	18
Figura 2.	Esporas con hifas germinativas provenientes de los tratamientos.....	20
Figura 3.	Plantas RyeGrass tratamiento T.....	21
Figura 4.	Plantas RyeGrass, tratamiento R.....	22
Figura 5.	Plantas RyeGrass del tratamiento CN.....	23
Figura 6.	Gráficos de degradación de diferentes hidrocarburos en el sustrato.....	27
Figura 7.	Índices de degradación de hidrocarburos.....	29
Figura 8.	Porcentajes de degradación de pristano y fitano para cada tratamiento en el sustrato.....	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Promedio del recuento de esporas en el sustrato de cada tratamiento, al final del ensayo.....	19
Tabla 2.	Altura (cm), porcentaje de peso seco aéreo y radicular de los diferentes tratamientos del ensayo.	24
Tabla 3.	Resumen de varios ANOVA realizados para concentración de los hidrocarburos.....	26
Tabla 4.	Resumen de varios ANOVA realizados de índices de biodegradación en el sustrato.	28
Tabla 5.	Porcentajes de degradación de pristano y fitano en el sustrato.....	30
Tabla 6.	Recuento de bacterias, hongos y actinomicetos por gramo de sustrato...	32

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Formulaciones de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias, hongos y actinomicetos.....58
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

1. RESUMEN

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) son simbioses obligados del 72% de las plantas vasculares y tienen un importante rol para mejorar la biodegradación de hidrocarburos. Los objetivos de este trabajo fueron, en primer lugar, demostrar el establecimiento de la relación micorrízica entre los HMA inoculados y la planta de pasto RyeGrass (*Lolium multiflorum*) en presencia de hidrocarburos; en segundo lugar, determinar el nivel de degradación de los hidrocarburos en un sustrato contaminado artificialmente usando plantas de pasto inoculadas con un HMA nativo de la Amazonía Ecuatoriana o con un HMA modelo *Rhizophagus irregularis*, y, finalmente, cuantificar la presencia de microflora acompañante en el sustrato al final del ensayo. El sustrato utilizado fue roca volcánica con compost esterilizado al que se añadió 5% de crudo. El ensayo duró 34 semanas y consistió en tres tratamientos, el primero “T” con un inóculo nativo de HMA aislado de piscinas petroleras de la Amazonía ecuatoriana; el segundo “R” con *Rhizophagus irregularis* y el tercero “CN” con plantas en sustrato contaminado y sin HMA. Los datos se analizaron con T student, ANOVA y prueba de Tukey.

La colonización de las raíces de los tratamientos T y R fue escasa, sin embargo, el recuento de esporas en 10 gramos de sustrato aumentó de 4 a 115 esporas (en T) y de 4 a 64 esporas (en R) al final del estudio, lo que demostró la viabilidad de los HMA. El resultado de la escasa colonización pudo deberse a diversas razones como efectos adversos del crudo sobre la planta y los HMA, su correspondiente afinidad, la falta de una pre-micorrización de las raíces, y el crecimiento lento de los inóculos de HMA utilizados. El tratamiento R mostró mayor grado de biorremediación en los índices “C17/pristano” y “C18/fitano” ($p < 0.01$, en ambos casos) y en porcentajes de degradación de pristano y fitano R y CN fueron igual de efectivos ($p < 0.01$, en ambos casos). Esto coincide con estudios previos que mostraron que *R. irregularis* es muy efectivo para mejorar el grado de biorremediación. La alta efectividad de CN pudo deberse a que establecer la simbiosis micorrízica representa un costo energético elevado para la planta, por lo tanto, las plantas sin inóculo canalizaron su energía en la degradación de hidrocarburos en lugar de en el establecimiento de la simbiosis. Se determinó la presencia de microflora acompañante en el sustrato al final del ensayo sin diferencias significativas entre ellos.

Palabras clave: Hongos Micorrízicos Arbusculares, Biorremediación, biodegradación de hidrocarburos, *Rhizophagus irregularis*, pozos de petróleo.

2. ABSTRACT

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) are obligate symbionts of 72% of the vascular plants and scientists had demonstrated their important role improving hydrocarbon biodegradation. The objectives of this research were first, to demonstrate the establishment of the mycorrhizal symbiosis between the AMF inoculum and RyeGrass (*Lolium multiflorum*) in presence of hydrocarbons; second, to determine the hydrocarbon bioremediation level of an artificially-polluted substrate by using RyeGrass inoculated with either a native AMF inoculum from the Ecuadorian Amazon or a inoculum of the model AMF *Rhizophagus irregularis*; and finally, to report the presence of another microflora in the substrate at the end of the study. The substrate was volcanic rock plus compost previously sterilized and added 5% of crude oil. The research lasted 34 weeks with three treatments, first treatment “T” with a native strain isolated from oil pools in the Ecuadorian Amazon, “R” with the model AMF *Rhizophagus irregularis*, and finally treatment “CN” with plants in the contaminated substrate and none AMF inoculum. Data were analyzed through T student, ANOVA and Tukey tests.

Even though root colonization of T and R were very low, spore recount in 10 grams of substrate proved the increase of spores from 4 to 115 (treatment T) and from 4 to 64 (treatment R) at the end of the study, showing viability of the AMF. The low colonization results may be due to adverse effects of oil in both plants and AMF cells, their correspondent affinity to stablish the symbiosis, the no-premycorrhization state of the roots or the slow growth rate of the AMF inocula used. Treatment R presented the highest rate of bioremediation in the ratios “C17/pristane” and “C18/phytane” ($p < 0.01$, both). For pristane and phytane degradation percentage, treatments R and CN were both effective ($p < 0.01$, both). These results are in accordance with previous research that demonstrate *R. irregularis* effectiveness for enhancing bioremediation processes. Likewise, the high effectiveness of CN could be due to the highly cost-effective of the establishment of the mycorrhizal symbiosis, therefore, plants without mycorrhizal inoculum focused their energy in hydrocarbon degradation rather than in the symbiosis establishment. Microbial analysis determined presence of bacteria, fungi and actinomyces in the substrate at the end of the research with no statistically significant difference between the treatments.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Bioremediation, hydrocarbons, *Rhizophagus irregularis*, oil ponds.

3. INTRODUCCIÓN

El proceso de explotación, recolección, refinamiento, almacenamiento y venta de petróleo y sus subproductos puede generar derrames de hidrocarburos (Varjani, 2017). El petróleo está compuesto por hidrocarburos insaturados, aromáticos y compuestos no hidrocarbonados, estos últimos, insolubles en agua y con puntos de fusión y ebullición altos, lo cual dificulta su remoción y resulta tóxico para el suelo (Wang et al., 2017).

La acumulación de los diferentes compuestos de petróleo en el suelo genera varios problemas medioambientales, por ejemplo, su viscosidad, baja emulsificación y poca densidad permiten la absorción del contaminante, lo que afecta la porosidad del suelo y disminuye su calidad (Varjani, 2017). Además, la presencia de petróleo en el suelo altera su composición química, en especial, la relación carbono- nitrógeno, la estructura y composición de la materia orgánica, el pH y su conductividad, es decir, se altera el ecosistema del suelo (Wang et al., 2017).

La microflora del suelo también se ve afectada por la contaminación con hidrocarburos, modificando el crecimiento de los microorganismos sensibles a su toxicidad e incrementando las poblaciones de microorganismos capaces de sintetizar enzimas adaptativas (lacasas, tirosinasas, catecol oxidasas, hidroxilasas, oxidasas fenólicas no específicas, peroxidasas lignínicas) que degradan, entre otros, los contaminantes derivados de los hidrocarburos (Alisi et al., 2009; Meharg, 2018).

Adicionalmente, la presencia de petróleo en el suelo dificulta el crecimiento de plantas al reducir la capacidad de germinación de las semillas y su resistencia a plagas y enfermedades (Shan, Zhang, Cao, Kang y Li, 2014; Xu y Lu, 2010; Zhu, Liu, Yang y Liu, 2013). Así también, los compuestos del petróleo reaccionan con el nitrógeno y fósforo inorgánicos disminuyendo su bio-disponibilidad (Pinchin, Williams, May, Mant, y Hodkinson, 2013; Liao, Wang, y Huang, 2015).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) tienen efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos en animales y humanos (Khanna y Gharpure, 2017). Además, se evaporan e infiltran en el suelo, contaminando así las aguas subterráneas (Wang et al., 2017).

A pesar del alto impacto social, ambiental y en la salud humana, la actividad petrolera representa la principal fuente de ingresos en el Ecuador. Por ejemplo, los ingresos generados por la exportación de petróleo y sus derivados representaron el 57% del total del presupuesto general del estado en el año 2016 (Agencia de Regulación y Control Hidrocarburiífero, 2017). En Latino América, Ecuador es reconocido como el quinto país con mayor actividad petrolera (Agencia de Regulación y Control Hidrocarburiífero, 2017). De igual manera, las exportaciones de petróleo superaron los 7 billones de dólares de ingresos nacionales durante el mes de octubre del 2018 (Agencia de Regulación y Control Hidrocarburiífero, 2017; Banco Central del Ecuador, 2018), por lo tanto, es improbable que la extracción de hidrocarburos termine en el corto o mediano plazo.

La actividad petrolera en el Ecuador ha provocado un gran impacto ambiental. Según el Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana (2015), en el período de 1964 a 1992, durante la operación de diferentes empresas petroleras en el país, se habrían derramado aproximadamente 59,9 mil millones de litros de residuos de petróleo y 108 millones de litros de petróleo bruto en la Región Amazónica Ecuatoriana. Dichos residuos fueron depositados en piscinas y pozos sin ningún tratamiento para su degradación y sin un recubrimiento que evitara la lixiviación de los contaminantes en el suelo y aguas subterráneas.

Durante 28 años de actividad, una sola empresa perforó 356 pozos petroleros, creó al menos 1000 piscinas en la selva amazónica donde desechó residuos de crudo, agua y lodos tóxicos, dejando más de 2 millones de hectáreas de la Amazonía afectadas (Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana, 2015). Al término de sus operaciones en el país, la explotación de petróleo quedó en manos de empresas estatales y privadas, donde el costo ambiental de su actividad es palpable a diario. Se calcula que, en promedio, existe un derrame de petróleo a la semana y sus principales causas son la corrosión de las tuberías, atentados, fallas mecánicas, fallas humanas y, en muchos casos, las causas son desconocidas (Gil, 2013).

Petroamazonas EP ha mostrado su preocupación por este impacto ambiental. A través del Proyecto Amazonía Viva (2013) busca biorremediar las zonas afectadas, mediante el uso de microorganismos capaces de degradar petróleo (Petroamazonas EP, 2018). Petroamazonas, a través de su sitio web, menciona que se remediaron 1.000.000 metros cúbicos de suelo, 709 fuentes de contaminación en las provincias de Orellana y Sucumbbíos fueron eliminadas y se

recuperaron 35. 914 barriles de crudo (Petroamazonas EP, 2018). Además, Petroamazonas anunció que invertirá 112 millones de dólares en bienes y servicios en la Amazonía, fondos que serán destinados también a la remediación ambiental (Pacheco, 2018).

A pesar del trabajo que está realizando la empresa estatal de petróleos es necesario realizar mejoras en las políticas de explotación ya existentes para que sean más justas, social y ambientalmente responsables y de alguna forma mermar considerablemente sus inevitables impactos. Esta investigación pretende extender el conocimiento sobre las alternativas microbiológicas que pueden implementarse con el fin de biorremediar zonas afectadas por derrames de petróleo, concretamente utilizando hongos micorrízicos arbusculares, lo que puede contribuir a los esfuerzos realizados por empresas de explotación de hidrocarburos en las zonas afectadas por la actividad petrolera de las en nuestro país (Pacheco, 2018).

Para atenuar la contaminación por el derrame de petróleo y sus consecuencias a nivel de ambientes edáficos, existen principalmente tres tipos de métodos de remediación: químico, físico y biológico, este último también conocido como biorremediación (Atlas, 1997; Wang et al., 2017). Las metodologías físicas y químicas se utilizan para remediar suelos contaminados de manera rápida y eficiente. Sin embargo, poseen desventajas como costo elevado, destrucción de la estructura del suelo y contaminación secundaria (Wang et al., 2017). Por estos motivos, varios autores concuerdan en que la biorremediación o biodegradación es la mejor metodología para remediar suelos contaminados con hidrocarburos (Chen et al., 2015; Wang et al., 2017) al no generar contaminación secundaria y ser costo-efectiva (Azubuiké, Chikere, y Okpokwasili, 2016; Kumari y Singh, 2016). Como ventajas de la biorremediación se pueden citar, además, la implementación *in situ*, la disminución de la aplicación de químicos que generan contaminación secundaria, el bajo costo y la eficiencia en la remoción de contaminantes (Srivastava, Naraian, Kalra, y Chandra, 2014; Huesemann, 2017; Joye, Kleindienst, y Peña, 2018; Kumar, Devi, y Singh, 2018; Sharma, Dangi, y Shukla, 2018; Panigrahi, Velraj, y Subba Rao, 2019).

Según Wang et al. (2017), la biorremediación se divide en tres categorías: remediación microbiana, remediación vegetal o fitorremediación y remediación con consorcio vegetal-microbiano. Esta última, utiliza las comunidades microbianas del suelo y de la raíz de la planta, donde los compuestos contaminantes son removidos de manera más eficiente, debido a que la remediación se consigue por una interacción entre las raíces de las plantas, las bacterias y los

hongos que habitan en la zona del suelo influenciada por la raíz (rizósfera) o los microorganismos benéficos que colonizan las raíces (microorganismos endofíticos) (Akhundova y Atakishiyeva, 2015; Iffis, St-Arnaud, y Hijri, 2017; Wang et al., 2017).

Un grupo de microorganismos de especial importancia en la interacción con las raíces de las plantas son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), endo-simbiontes obligados de las raíces que pertenecen al Phylum *Glomeromycota* (Pagano et al., 2016). Los HMA forman relaciones simbióticas con el 72% de plantas vasculares (Brundrett y Tedersoo, 2018) y representan del 5 al 10% de la biomasa microbiana del suelo (Berruti et al., 2014; Hernández, 2014; Noori, Maivan y Alaie, 2014; Rajtor y Piotrowska, 2016). Los HMA proveen a la planta hospedera nutrientes como fósforo, nitrógeno, zinc, manganeso y cobre (Liu y Dalpé, 2009), protección contra el estrés abiótico y protección contra patógenos del suelo; a cambio la planta provee al hongo la fuente de carbono y un nicho ecológico (Smith y Read, 2008; Gao, Li, Ling, y Zhu, 2011; Ismail, McCormick, y Hijri, 2011).

Un estudio realizado por Liu y Dalpé (2009) demostró que las plantas de cebolla larga o puerro (*Allium porrum* L. cv. Musselburgh) inoculadas con HMA absorbieron mejor nitrógeno y fósforo y redujeron en mayor cantidad los HAPs, comparados con aquellas plantas no inoculadas. Otro estudio determinó que la colonización de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con HMA mejoró la degradación de fenantreno y pireno en suelo en condiciones de invernadero, ya que se observó su acumulación en las raíces de las plantas micorrizadas (Gao et al., 2011).

Xun, Xie, Liu y Guo (2015) evidenciaron que el uso de HMA y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) aceleran la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo, mejorando el crecimiento de las plantas de avena y disminuyendo el impacto negativo del contaminante en los tejidos vegetales. Además, se ha demostrado la capacidad de los HMA para crecer en condiciones de estrés por presencia de hidrocarburos (Driai, Verdin, Laruelle, Beddiar, y Lounès-Hadj Sahraoui, 2015; Plouznikoff, Declerck, y Calonne, 2016) y metales pesados como cadmio (Martins, Melloni, y Melloni, 2017). Un estudio con plantas de trigo (*Triticum aestivum*) demostró que la inoculación del HMA *Rhizophagus irregularis* permitió una mejor disipación de los HAPs y de alcanos en comparación con las plantas no inoculadas (Lenoir, Lounès-Hadj, Laruelle, Dalpé y Fontaine (2016).

Otro estudio realizado en suelos contaminados con hidrocarburos con plantas de llantén (*Medicago sativa*) inoculadas con los HMA *Glomus deserticola*, *Glomus geosporum* y *Glomus intraradices*, menciona que, a excepción de la longitud de raíz, los parámetros medidos como producción de biomasa total, peso seco y altura de la planta mejoraron en las plantas inoculadas con HMA, especialmente con *G. geosporum* (Cabello, 2009). La utilización de HMA incluso contribuye en la disipación de criseno y dibenzil-antraceno, contaminantes muy resistentes a la fitoremediación en sistemas no micorrizados (Joner et al., 2001; Miransari, 2010; Chibuike, 2013).

En Ecuador, los estudios realizados en biorremediación con HMA son limitados, como el estudio de Chamba y colaboradores (2017), quienes demostraron que la asociación micorrízica en *E. polymnioides* mejoró la resistencia de la planta contra la toxicidad del mercurio (Hg), concluyendo que esta asociación puede considerarse como una opción para la remediación de Hg en zonas de minería artesanal de oro.

Recientemente, mediante métodos moleculares se ha identificado la composición de la comunidad de HMA asociada a plantas nativas presentes en piscinas de petróleo en el campo Charapa, Sucumbíos, en la región Amazónica de Ecuador, (Garcés, Senés, Declerck y Cranenbrouck, 2017, 2018). Estos estudios evidenciaron la presencia de los géneros *Glomus*, *Rhizophagus*, *Archaeospora* y *Acaulospora*. Sin embargo, más del 70% de las secuencias atribuidas al Phylum *Glomeromycota* pertenecen a especies no descritas de HMA; sugiriendo la posible presencia de nuevas especies. Además, el alto porcentaje de colonización (>40%) de las raíces de plantas provenientes de las piscinas de petróleo, sugirió que los taxones de HMA encontrados pueden adaptarse a estos ambientes contaminados, siendo de interés para estudios de fitorremediación de suelos contaminados (Garcés et al., 2017, 2018).

El objetivo de este estudio fue determinar la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) mediante plantas de pasto RyeGrass (*Lolium multiflorum*), asociadas a un inóculo multiespórico de HMA aislados de suelos contaminados con hidrocarburos o al HMA modelo *Rhizophagus irregularis*.

Los aportes de la presente investigación son múltiples. En primer lugar, aportará conocimientos novedosos sobre el rol de los HMA aislados de suelos contaminados con hidrocarburos de la Amazonía ecuatoriana. Se comparará el rol asistencial de los HMA, nativos

y una cepa modelo, en los procesos de fitorremediación de sustratos contaminados con hidrocarburos. Los resultados generados abrirán un campo de investigación para el uso de HMA en el área de biorremediación dentro del país, lo que permitirá incrementar los conocimientos sobre métodos más amigables con el medio ambiente para la eliminación de contaminantes como los hidrocarburos, con el fin de aplicarlos en un futuro cercano.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la degradación del petróleo en un sustrato contaminado con hidrocarburos utilizando plantas RyeGrass (*Lolium multiflorum*) y un inóculo de HMA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comprobar el establecimiento de la asociación simbiótica micorrízica entre los inóculos de HMA probados (inóculo nativo y modelo) y la planta hospedera.

Comparar la degradación de hidrocarburos entre sustratos con plantas inoculadas con HMA (inóculo nativo y cepa modelo) y sustrato con planta sin inocular.

Evidenciar la existencia de flora microbiana acompañante (bacterias, hongos y actinomicetos) en las muestras de sustrato.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Micología de la carrera de Microbiología de la PUCE-Campus Nayón.

4.1 SUSTRATO

El sustrato utilizado es una mezcla de roca volcánica y compost esterilizados dos veces por separado (121°C/15 minutos, intervalo de 12 h mínimo). El sustrato fue inoculado con 5% (p/p) de crudo (Alarcón, Davies, Autenrieth, Zuberer, 2008) y homogenizado. En cada maceta se pesaron 400g del sustrato. Para los análisis de degradación de hidrocarburos se utilizó un control sustrato analizado al tiempo inicial (CS-ti) y un nuevo análisis a las 34 semanas de ensayo, o tiempo final (CS-tf). Este control sustrato se mantuvo en las mismas condiciones que las muestras.

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas de pasto RyeGrass (*Lolium multiflorum*) fueron donadas por Agrocalidad. Esta planta es reconocida por su capacidad de crecer en suelos contaminados con hidrocarburos (Kaimi, Mukaidani y Tamaki, 2007). Las semillas fueron desinfectadas previamente con hipoclorito al 5% durante 10 min y lavadas 3 veces con agua destilada durante 10 min en cada lavado. Las semillas germinadas fueron cultivadas en un sustrato de roca volcánica estéril (sin hidrocarburo) durante un mes y posteriormente fueron trasplantadas al sustrato contaminado descrito previamente.

Se usaron dos inóculos de HMA. El inóculo del tratamiento “T” pertenece a la Colección de HMA de la PUCE-Sede Nayón, que provienen de raíces de plantas nativas de piscinas de petróleo del campo Charapa, Sucumbíos, en la región Amazónica de Ecuador mantenido en cultivo trampa multiespórico (código de colección “T001 131201-S-0”). La cepa modelo *Rhizophagus irregularis* para el tratamiento “R” fue suministrada por la colección *in vitro* de Glomeromycota (GINCO por sus siglas en inglés).

4.3 PREPARACIÓN DEL ENSAYO

Se utilizaron tres tratamientos que consistieron en: el primero, de diez plántulas, que fueron inoculadas con el cultivo multiespórico nativo T001 131201-S-0 (Tratamiento T). El segundo, de otro grupo de diez plántulas, que fueron inoculadas con el HMA modelo *Rhizophagus irregularis* (Tratamiento R), y el tercero, de 10 plántulas sin inóculo, como control negativo (CN).

La inoculación de los tratamientos T y R se realizó con un promedio de 175 esporas y fragmentos de raíces colonizadas con HMA (Alarcón et al., 2008) por maceta. El inóculo se colocó directamente sobre las raíces de las plántulas de pasto dentro de 400 g de sustrato estéril previamente contaminado con crudo (5%). Además, se utilizó un control de sustrato (CS), que contenía solo la mezcla de sustrato con crudo (5%), sin planta y sin inóculo de HMA y un control negativo (CN), arriba descrito (Alarcón et al., 2008; Garcés, Senés, Declerck y Cranenbrouck, 2018).

Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero, con temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con porcentaje de humedad de $14 \pm 9\%$, por 34 semanas. Se realizó riego diario hasta que el sustrato se observe ligeramente húmedo. Al final del tiempo señalado se recolectaron las plantas y se registró su altura y peso seco.

4.4 COSECHA Y ANÁLISIS DE LAS PLÁNTULAS DE PASTO

Se analizaron las raíces de las plantas para determinar el establecimiento de la relación simbiótica micorrízica, el recuento de esporas de apariencia viable en el sustrato, el peso seco de la porción aérea y radicular de las plantas, la microflora acompañante (bacterias, hongos filamentosos y actinomicetos) en el sustrato y la degradación de hidrocarburos en el sustrato.

4.4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN MICORRÍZICA POR TINCIÓN DE RAÍCES.

Para la tinción de las raíces, se siguió la técnica descrita por Walker (2005) que determina la presencia de HMA. Las raíces más finas fueron cortadas en fragmentos de 3 cm aproximadamente y colocadas en un tubo Falcon plástico. Se añadió al tubo una solución de

KOH al 10% hasta cubrir por completo las raíces, se agitó vigorosamente y se lo colocó en baño María a 50°C por una hora.

Posteriormente, se eliminó la solución de KOH y se lavaron las raíces con una solución de HCl al 1% para neutralizar el KOH. Luego, se añadió una solución de HCl al 1% con tinta azul (Lamy) en proporción 1:50 (v/v), cubriendo las raíces en su totalidad y se colocaron los tubos en baño María a 50°C por una hora más. A continuación, se realizó un lavado con agua destilada para eliminar los residuos y, finalmente, se agregó lacto-glicerol para conservar las raíces en refrigeración (Walker, 2005).

Para determinar el porcentaje de colonización de las raíces por HMA, se siguió la técnica descrita por McGonigle y colaboradores (1990), en la que las raíces teñidas se colocaron sobre un portaobjetos en forma horizontal formando cuatro a cinco filas de raíces, se añadió una gota del reactivo Polivinilactoglicerol (PVGL) y se cubrió la placa con un cubreobjetos.

Se realizó la lectura en el microscopio óptico (OLYMPUS ® modelo BX53) con los objetivos de 10, 20 y 40X, moviendo la platina del microscopio en dirección de izquierda a derecha siempre con la misma distancia. Para cuantificar el porcentaje de colonización en las raíces de una planta se traza una línea imaginaria en el centro del campo óptico. Si esta línea “corta” o pasa por una estructura del hongo (arbúsculo, vesícula o micelio) se registra como positivo. Si en el campo óptico no existen estructuras o están presentes pero la línea imaginaria no las corta se registra como negativo. En cada muestra se observaron entre 150 a 200 campos (McGonigle et al., 1990).

Además, se realizó un recuento de esporas de HMA de aspecto viable en el sustrato, para determinar su multiplicación a partir de la inoculación inicial (Franco, Ferrera, Varela, Pérez, y Alarcón, 2007) que tenía un promedio de 175 esporas de HMA por maceta o 4 esporas en 10 g de sustrato.

4.4.2 ANÁLISIS DE ALTURA Y PORCENTAJE DE PESO SECO DEL MATERIAL VEGETAL

Se registró el peso fresco y el peso seco de la parte aérea y radicular de cada una de las plantas de cada tratamiento con el fin de comprobar la influencia de los HMA en el crecimiento vegetal. En una balanza analítica se pesó la parte aérea y la radicular del individuo (peso fresco)

y luego se secó el material a 105°C por 24 horas. Cada muestra se dejó enfriar durante 2 horas y se pesó nuevamente para obtener el peso seco. Este análisis se realizó debido a que el peso seco de una planta es considerado, entre otros, un buen estimador del carbono total de la misma, por lo que permite analizar importantes aspectos de su fisiología, como su crecimiento y el efecto de diferentes tratamientos (Nwoko, 2014; Di Benedetto y Tognetti, 2016).

4.4.3 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUSTRATO

Debido a que los hidrocarburos son compuestos muy complejos, para estudiar la efectividad de la biodegradación sobre el contaminante se analizan los índices de las concentraciones de cuatro compuestos específicos: C17, C18, pristano y fitano (Atlas, 1997; Seklemova, Pavlova y Kovacheva, 2001; Minai y Herfatmanesh, 2007; Minai, Rohanifar, y Azami, 2015). Esto se debe a que los procesos de biorremediación alteran los compuestos alifáticos de estructura lineal y los de estructura ramificada, sin embargo, los ramificados se biodegradan con mayor lentitud (Atlas, 1997). Es por esta razón que se utilizan los índices entre los alcanos de cadena lineal C17 y C18 comparados con sus correspondientes isómeros ramificados (pristano y fitano, respectivamente) (Seklemova, Pavlova y Kovacheva, 2001). La reducción en el tiempo del valor de estos denominados índices de biodegradación “C17/pristano” y “C18/fitano” evidencia que existen procesos de biodegradación de hidrocarburos en el sustrato analizado (Seklemova, Pavlova y Kovacheva, 2001; Minai y Herfatmanesh, 2007; Minai, Rohanifar, y Azami, 2015).

Los cuatro compuestos mencionados anteriormente son compuestos extraíbles con solventes orgánicos que se pueden detectar y cuantificar por Cromatografía de Gases (CG) (Fernández et al., 2006). Con el fin de analizar el nivel de degradación de hidrocarburos en el sustrato se procesaron las muestras por Cromatografía de Gases (CG) para lo que se siguieron las recomendaciones del método EPA 8015 (modificado) (Ebitson y Gallagher, 2016).

El detector utilizado en esta técnica fue de Ionización de Llama (GC-FID, por sus siglas en inglés), la técnica permite observar los diferentes componentes en una muestra (Departamento de Salud de los EEUU, Agencia de Salud Pública y Agencia de Sustancias Tóxicas, 1999). El compuesto de extracción de hidrocarburos fue Diclorometano (EPA, 1996).

En la CG la muestra es separada en sus componentes individuales al pasar a través de una columna. Para separar los hidrocarburos no volátiles y no polares por CG, los compuestos por analizar deben estar en fase de vapor, lo que se consigue al colocar las muestras en el inyector que alcanza la temperatura de ebullición de los compuestos (Fernández et al., 2006). La separación se facilita gracias a varios factores como polaridad, punto de ebullición, diferencias de afinidad entre la muestra y la columna del cromatógrafo y el uso de un gas inerte como Helio que “arrastra” la muestra a través de la columna (Montoya y Páez, 2012). El tiempo que el compuesto pasa sobre la columna se denomina tiempo de retención y si los parámetros experimentales se estandarizan el tiempo de retención es reproducible para la muestra, mientras los componentes fluyen por la columna son detectados y la señal del detector es proporcional a la cantidad del compuesto (Fernández et al., 2006).

En GC/FID el detector de ionización de llama reconoce todos los compuestos que puedan quemarse. La suma de las respuestas con un rango específico equivale a la concentración de hidrocarburos tomando como referencia a estándares de concentración conocida. El detector FID tiene una elevada sensibilidad, del orden de 10^{-13} g/s, estabilidad, bajo ruido y es sencillo de utilizar, por lo que es de los más utilizados (Gomis, 2008; Montoya y Páez, 2012); además, su límite inferior de detección está en el rango de picogramos (Venton, 2018).

Para los análisis se utilizó el estándar “31240 Fuel Oil Degradation Mix”, lote # AO11025 marca RESTEK. Los equipos utilizados pertenecen a la Escuela de Química de la PUCE y los análisis se realizaron con su colaboración.

4.4.4 DETERMINACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS EN EL SUSTRATO

El recuento de bacterias, hongos y actinomicetos se realizó por la técnica de recuento de microorganismos viables por dilución en placa. Es una técnica indirecta de cuantificación que permite medir la viabilidad de microorganismos cultivables, es adecuada para análisis microbiano en muestras con hidrocarburo, es rápida y requiere material de fácil acceso (Fernández et al., 2006). La técnica se fundamenta en que una célula viable inoculada en un medio de cultivo se multiplica y genera una colonia en la placa de agar que es fácil de identificar a simple vista, si se le proporciona los nutrientes y condiciones de incubación adecuadas (Fernández et al., 2006). Este método consiste en preparar una serie de diluciones de la muestra

de suelo a analizar, o, en este caso, de sustrato, inocular un volumen determinado de la dilución sobre la placa de agar selectivo e incubarla en las condiciones apropiadas.

Para el recuento de bacterias totales se utilizó el medio nutritivo no selectivo agar infusión de cerebro y corazón (BHI, por sus siglas en inglés), para hongos totales se utilizó el medio Rosa de Bengala (RB) y para Actinomicetos se utilizó el medio caseína almidón, cuyas formulaciones se encuentran descritas en el Anexo 1.

Se siguió el procedimiento descrito por Fernández et al. (2006) con ligeras modificaciones, como se describe a continuación: en primer lugar, en condiciones estériles se adicionaron 10 gramos del sustrato homogenizado a una botella con 90 ml de agua peptonada al 0.1 % estéril y se agitó vigorosamente para homogenizar la muestra, esta es la dilución 10^{-1} . Posteriormente, se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} y transfirió a un tubo de vidrio con 9 ml de agua peptonada al 0.1% estéril (dilución 10^{-2}), se homogenizó con vortex y se repitió el procedimiento hasta la dilución 10^{-3} .

Para el recuento de bacterias y actinomicetos se inocularon 100 microlitros (ul) de la dilución 10^{-3} en el centro de las cajas Petri con agar BHI o agar caseína almidón, respectivamente. Para el recuento de hongos se inoculó 100 ul de la dilución 10^{-2} en agar Rosa de Bengala. En los tres casos, se trabajó por triplicado. La muestra inoculada se extendió sobre el medio de cultivo con una espátula de Digralsky.

Las cajas fueron incubadas a 25°C por 48 horas para bacterias, 7 días para hongos y 21 días para actinomicetos. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias, tomándose en cuenta únicamente las cajas que contenían de 30 a 300 colonias. Se realizó un promedio del número de colonias entre repeticiones y se multiplicó por el inverso de la dilución. Los resultados de bacterias y actinomicetos se expresaron en UFC/g de sustrato. Los hongos se expresaron en propágulos/ g de sustrato.

4.4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El modelo de diseño experimental que se aplicó en esta investigación fue un Diseño Completamente al Azar de un factor (DCA) (Sánchez, 2015) debido a que:

- Los tratamientos (diferentes cepas de Hongos micorrízicos) se aplicaron completamente al azar en las unidades experimentales.
- Las unidades experimentales (las plantas) y las condiciones ambientales son homogéneas, ya que los ensayos se llevaron a cabo en un invernadero.

Los datos generados durante la experimentación fueron analizados mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía y la Prueba de significación de Tukey (Sánchez, 2015).

4.4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se utilizó el método de estadística descriptiva *Box plot* para evidenciar y eliminar los datos de las repeticiones que se encontraban fuera de rango y provocaban ruido en el análisis (Sánchez, 2015). Se realizó la prueba del ANOVA una vez comprobada la distribución normal de los datos, Para verificar esta distribución normal se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, considerada sencilla de realizar y recomendada para un conjunto de datos menor a 50 ($n < 50$) (Romero, 2016) como en el caso de este trabajo y se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

Todas las variables en estudio, excepto “peso seco radicular” y “recuento de microorganismos”, presentaron una distribución normal de los datos ($p > 0,05$) (Romero, 2016; Kalaivani, Amudhan, Upadhyay, & Kamal, 2017; Droppelmann, 2018). En el caso de la variable “peso seco radicular” se realizó transformación logarítmica de datos y para “recuento de microorganismos” (bacterias, hongos y actinomicetos) se realizó transformación de datos con raíz cuadrada para normalizarlos y poder realizar la prueba del ANOVA.

Adicionalmente, para todas las variables de estudio se calculó el Coeficiente de Variación “CV”, que es un valor que mide el porcentaje de error respecto a la media y muestra cuán confiables son las estimaciones de las variables investigadas (Sánchez, 2012). El valor del CV se expresa en porcentaje y en bioestadística se acepta que datos con un $CV \leq 20\%$ pueden considerarse aceptables para realizar el análisis estadístico cuando se trabaja unidades experimentales de alta variabilidad intrínseca como en este caso las plantas (Departamento Administrativo Nacional de Estadística en Colombia, 2008; Sánchez, 2012; Instituto Nacional de Estadística de Chile, 2016). En este trabajo la mayoría de las variables de estudio mostraron un CV dentro del límite aceptable ($\leq 20\%$). Sin embargo, algunas variables excedieron este límite superior (llegando a un valor de CV de máximo 24%). Estos valores de CV elevados son

de esperarse debido a la sensibilidad de los hongos micorrízicos arbusculares a las condiciones experimentales pero pueden utilizarse si el número de repeticiones es adecuado (Smith y Read, 1997; Kirk, Moutoglis, Klironomos, Lee, y Trevors, 2005).

Como se mencionó previamente, con el método de estadística descriptiva *Box plot* se eliminaron los datos de las réplicas que salían del rango y provocaban ruido en el análisis. El número muestral utilizado fue para el tratamiento con inóculo de HMA nativo (T) $n=6$; para el tratamiento con inóculo de HMA modelo (R) $n=8$ y para el Control Negativo sin inóculo micorrízico (CN) $n=10$. Estos valores de n se mantuvieron para todas las variables de estudio (12 variables) con excepción de las dos variables “C17/pristano” y “C18/fitano”, en cuyos casos los valores de n fueron para el tratamiento T, $n=8$; para el tratamiento R, $n=8$; y para el CN, $n=9$.

El valor promedio de n con el que varios investigadores han realizado el análisis estadístico para estudiar hongos micorrízicos arbusculares es “5” (Son y Smith, 1988; Cabello, 1995; Leyval y Binet 1998; Cabello, 1999; Kirk et al., 2005; Verdin et al., 2006; Franco 2007; Debiane et al., 2008; Hassan, 2014; Driai, 2015; Lenoir et al., 2016; Pineda, 2004; Thompson y Wildermuth, 1989). Por lo tanto, debido a que los valores de n , mencionados anteriormente, con los que se realizó el análisis estadístico en este trabajo son superiores a los valores de n promedio utilizados por otros autores se puede sugerir que el tamaño muestral manejado en este estudio es válido y razonable para estimar los resultados hallados en este trabajo.

5. RESULTADOS

5.1 ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN MICORRÍZICA ENTRE LAS CEPAS DE HMA Y LAS PLANTAS DE PASTO RYEGRASS (*Lolium multiflorum*).

5.1.1 OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ÓPTICO DE RAÍCES TEÑIDAS CON TINTA AZUL.

Como se describe en la sección anterior, durante el ensayo se manejaron tres tratamientos cada uno con diez repeticiones: el tratamiento T correspondiente a un inóculo de HMA- nativo proveniente de la Amazonía Ecuatoriana, el tratamiento R con el hongo modelo *R. irregularis* y tratamiento CN, control negativo, es decir plantas en sustrato contaminado sin inóculo de HMA. También se mantuvo un control sustrato (CS) analizado al inicio del ensayo (CS- ti) y al final del ensayo (CS-tf), correspondiente a sustrato contaminado sin inóculo de HMA, ni plantas de pasto.

En el caso de los tratamientos T, R y CN de cada repetición se realizaron de dos a cuatro placas con raíces teñidas para analizar en el microscopio óptico el grado de micorrización de las raíces. En el tratamiento T y R se observó escasa o nula colonización micorrízica, mientras que en el tratamiento CN no se observó colonización (Figura 1).

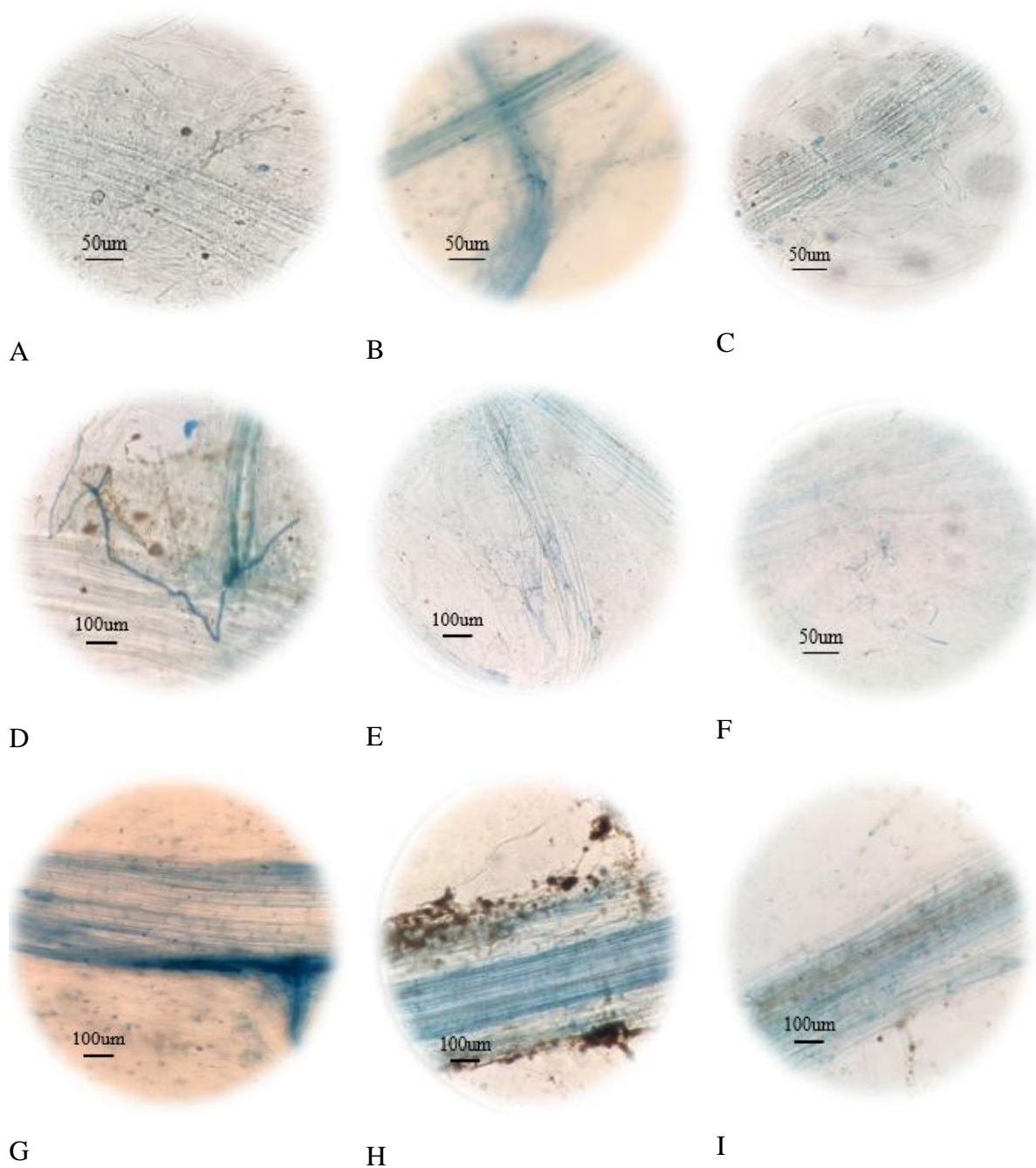


Figura 1. Tinción de raíces con tinta azul para evidenciar micorrización. A, B, C pertenecen al tratamiento con Hongo Micorrízico Arbuscular (HMA) nativo (T). D, E, F pertenecen al tratamiento con el HMA modelo (R). Finalmente, G, H, I al Control Negativo (CN). Los tratamientos T y R presentan escasa colonización por HMA mientras que en las raíces de CN no se evidencia colonización.

5.1.2 RECUENTO DE ESPORAS

El recuento de esporas se realizó en 10 g de sustrato de cada una de las repeticiones de los tres tratamientos (T, R y CN). En la tabla 1 se registra el promedio de recuento de esporas por tratamiento. En los tratamientos T y R se observó un mayor número de esporas de HMA de aspecto viable comparado con el inóculo inicial ($175 \pm$ esporas en 400 g de sustrato que equivale a 4 esporas/ 10 g). En el tratamiento CN no se observaron esporas de HMA. El número de esporas producidas al final del estudio (34 semanas de ensayo) en los tratamientos T y R sí tienen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$, F: 0.681) entre sí (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio del recuento de esporas en el sustrato de cada tratamiento, al final del ensayo.

	Esporas / 10 g de sustrato		Significancia estadística	
	\bar{x}	$\sigma_{\bar{x}}$	P	F
T	115	± 9		
R	64	± 4	<0.01	0.681

T, tratamiento con HMA nativo; R, tratamiento con HMA modelo; CN, control negativo.

En la muestra analizada se evidenció que la mayoría de las esporas observadas en el sustrato estaban germinadas (Figura 2).

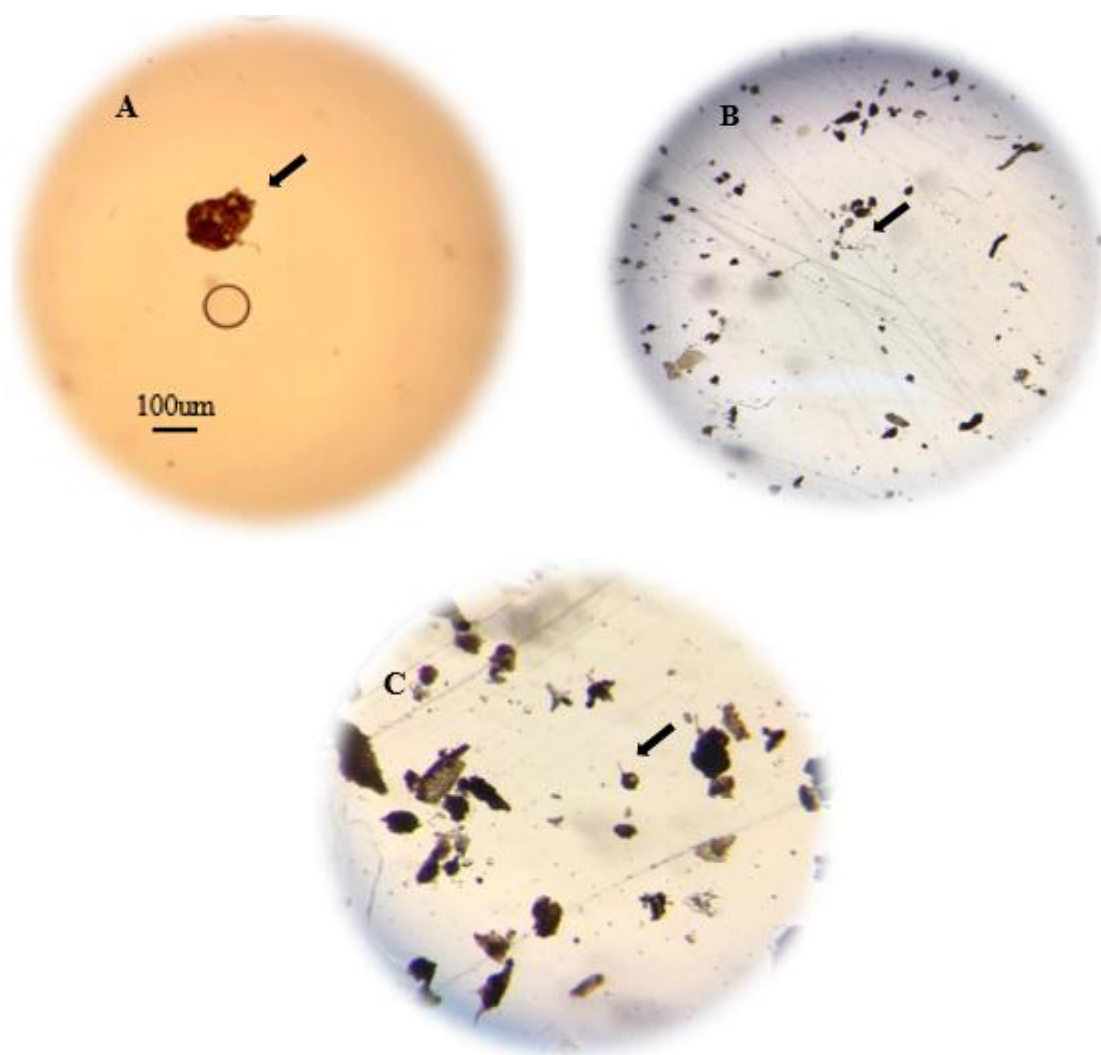


Figura 2. Esporas con hifas germinativas provenientes de los tratamientos. (A, B) espora del tratamiento R con inóculo de HMA modelo *R. irregularis*. (C) esporas del tratamiento T con inóculo nativo de la Amazonía ecuatoriana. Figura A con aumento de 20x en microscopio óptico, figuras 2B y 2C con magnificación de 70x en estereomicroscopio.

5.1.3 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Las plantas RyeGrass (*L. multiflorum*) asociadas o no a HMA, crecieron en el sustrato contaminado con hidrocarburos durante 34 semanas en condiciones controladas y se recolectaron para determinar las variables de estudio (Figuras 3, 4, 5).

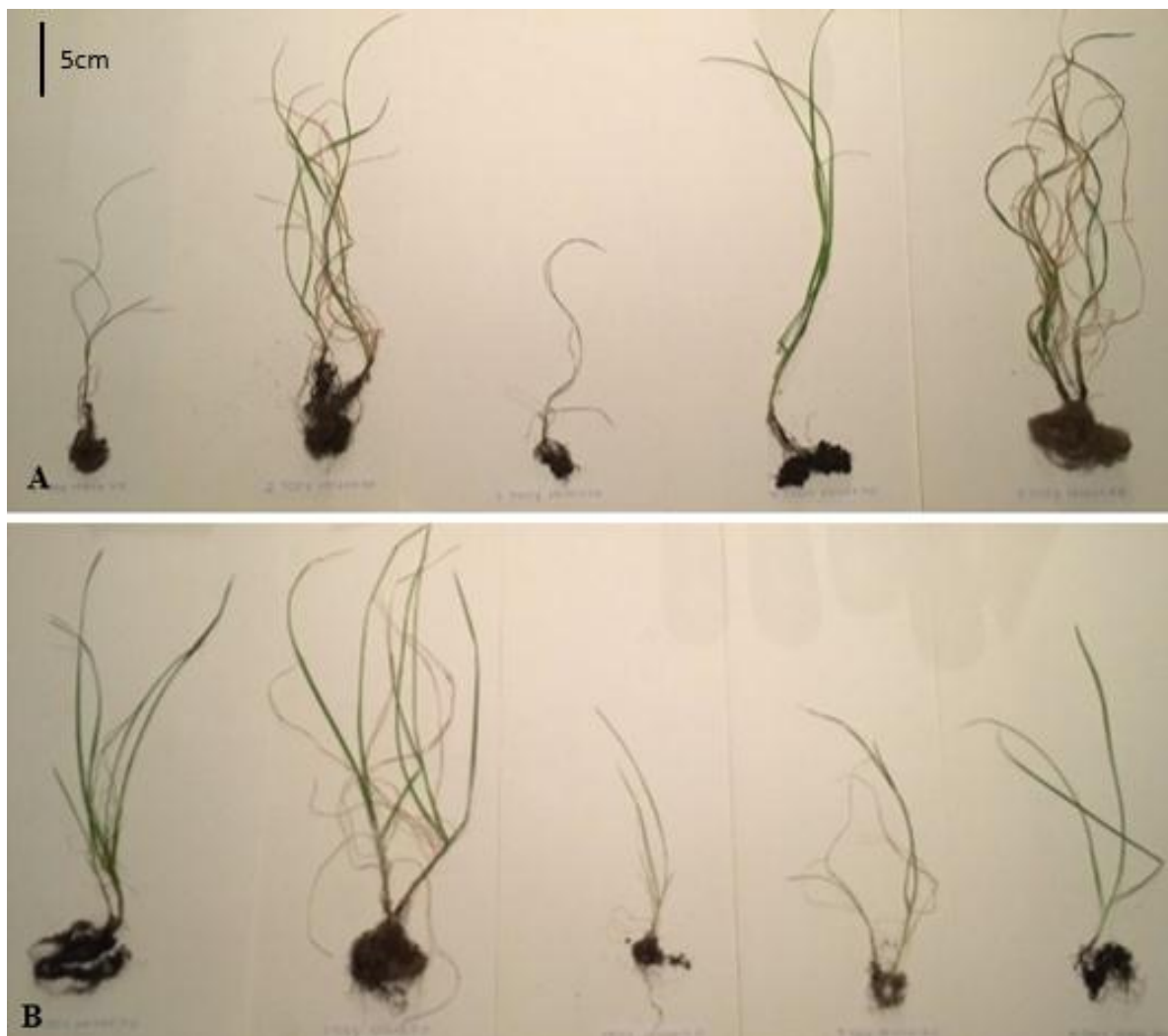


Figura 3. Plantas RyeGrass tratamiento T. (A) Se presentan las repeticiones 1, 2, 3, 4 y 5, (B) repeticiones 6, 7, 8, 9 y 10. A y B inmediatamente después de levantado el ensayo.



Figura 4. Plantas RyeGrass, tratamiento R. (A) Se presentan las repeticiones 1, 2, 3, 4 y 5, (B) repeticiones 6, 7, 8, 9 y 10. A y B inmediatamente después de levantado el ensayo.



Figura 5. Plantas RyeGrass del tratamiento CN. (A) Se presentan las repeticiones 1, 2, 3, 4 y 5, (B) repeticiones 6, 7, 8, 9 y 10. A y B inmediatamente después de levantado el ensayo.

Para analizar el efecto del inóculo micorrízico sobre el crecimiento vegetal se registraron tres variables: altura de planta, porcentaje de peso seco aéreo y radicular. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Altura (cm), porcentaje de peso seco aéreo y radicular de los diferentes tratamientos del ensayo.

Tratamientos	N	Altura (cm)		Porcentaje de peso seco			
				Radicular		Aéreo	
		\bar{X}	$\sigma_{\bar{x}}$	\bar{X}	$\sigma_{\bar{x}}$	\bar{X}	$\sigma_{\bar{x}}$
T	6	30.4	± 3.83 a	43.1	± 4.57 a	50.0	± 10.41 b
CN	10	31.6	± 1.69 a	43.6	± 4.89 a	75.3	± 2.94 a
R	8	21.8	± 1.56 b	27.6	± 7.35 b	70.8	± 4.79 a
Significancia estadística							
P		< 0.01		< 0.05		< 0.05	
F		5.96		4.26		5.02	
CV		22 %		22%		23%	

T, tratamiento con HMA nativo; R, tratamiento con HMA modelo, CN, control negativo. \bar{X} , Media de altura de planta, porcentaje de peso seco aéreo y radicular; σ , error estándar; N, número de repeticiones por tratamiento, CV, coeficiente de variación. Las letras (a y b) representan los diferentes grupos formados con la prueba de Tukey, los datos seguidos con las mismas letras no tienen diferencias significativas entre ellos.

Los resultados de las variables “altura” y “porcentaje de peso seco radicular” evidencian diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.01$ en ambos casos); con la prueba de Tukey se evidenció que los tratamientos T y CN se encuentran en el mismo grupo (grupo a) y el tratamiento R se encuentra en un grupo diferente (grupo b), de mayor altura.

En la variable “porcentaje de peso seco aéreo” se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$); con la prueba de Tukey se evidenció que los tratamientos CN y R pertenecían al mismo grupo (a) y el tratamiento T a un grupo diferente (b), de menor peso seco.

Por lo tanto, en “altura” y “porcentaje de peso seco radicular” los tratamientos T y CN resultaron mejores, es decir, presentaron las plantas más altas y con mayor porcentaje de peso seco al compararlos con R; y en el caso de “porcentaje de peso seco aéreo” los tratamientos R y CN presentaron mayor porcentaje de peso seco que el tratamiento T (Tabla 2).

5.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUSTRATO POR CG-FID.

5.2.1 CONCENTRACIÓN DE C17, C18, PRISTANO Y FITANO

Tabla 3. Resumen de varios ANOVA realizados para concentración de los hidrocarburos

Ttos	CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS (mg/g)							
	C17		C18		PRISTANO		FITANO	
	\bar{X}	σ_x	\bar{X}	σ_x	\bar{X}	σ_x	\bar{X}	σ_x
CN	0.002	±0.000 a	0.002	±0.000 a	0.018	±0.002 a	0.024	±0.002 a
R	0.000	±0.000 a	0.000	±0.000 a	0.024	±0.002 a	0.027	±0.003 a
T	0.016	±0.002 b	0.016	±0.003 b	0.042	±0.005 b	0.047	±0.005 a
CS-tf	0.018	±0.002 b	0.015	±0.002 b	0.065	±0.004 c	0.076	±0.004 b
CS-ti	0.116	±0.004 c	0.105	±0.005 c	0.105	±0.003 d	0.153	±0.012 c
Significancia estadística								
P	< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01	
F	789.69		431.57		102.45		100.119	
CV	18%		24%		19%		23%	

T, tratamiento con HMA nativo; R, tratamiento con HMA modelo; CN, control negativo. CS-tf, Control Sustrato- tiempo final; CS-ti, Control Sustrato- tiempo inicial. \bar{X} , media de concentración de hidrocarburos (mg/g); σ , error estándar; CV, coeficiente de variación. Las letras (a, b, c y d) representan los diferentes grupos formados con la prueba de Tukey, los datos seguidos con las mismas letras no tienen diferencias significativas entre ellos.

El ANOVA para la determinación de la concentración de hidrocarburos evidencia que existen diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos para los cuatro compuestos analizados, C17, C18, pristano y fitano ($p < 0.01$ en todos los casos). Se realizó, además, la prueba de Tukey para evidenciar la formación de grupos. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y Figura 6.

Con la prueba de Tukey se evidenció que en el caso de los compuestos C17 y C18 los tratamientos R y CN se ubicaron en el mismo grupo (a) y resultaron ser los mejores para degradar estos compuestos, sin embargo, el tratamiento T no resultó efectivo para la degradación de C17 y C18 ya que se ubicó en el mismo grupo (b) que el Control Sustrato- tiempo final (Tabla 3 y Figura 6 A y B, respectivamente).

En el caso del compuesto pristano los tratamientos R y CN se ubicaron en el mismo grupo (a) y tuvieron la mayor degradación, seguidos del tratamiento T que fue el segundo mejor en degradación (b) (Figura 6 C). Finalmente, en cuanto al compuesto fitano la prueba de Tukey evidenció que los tratamientos T, R y CN (todos en el grupo a) son igual de efectivos para degradar este compuesto seguidos de CS-tf (grupo b) (Figura 6 D).

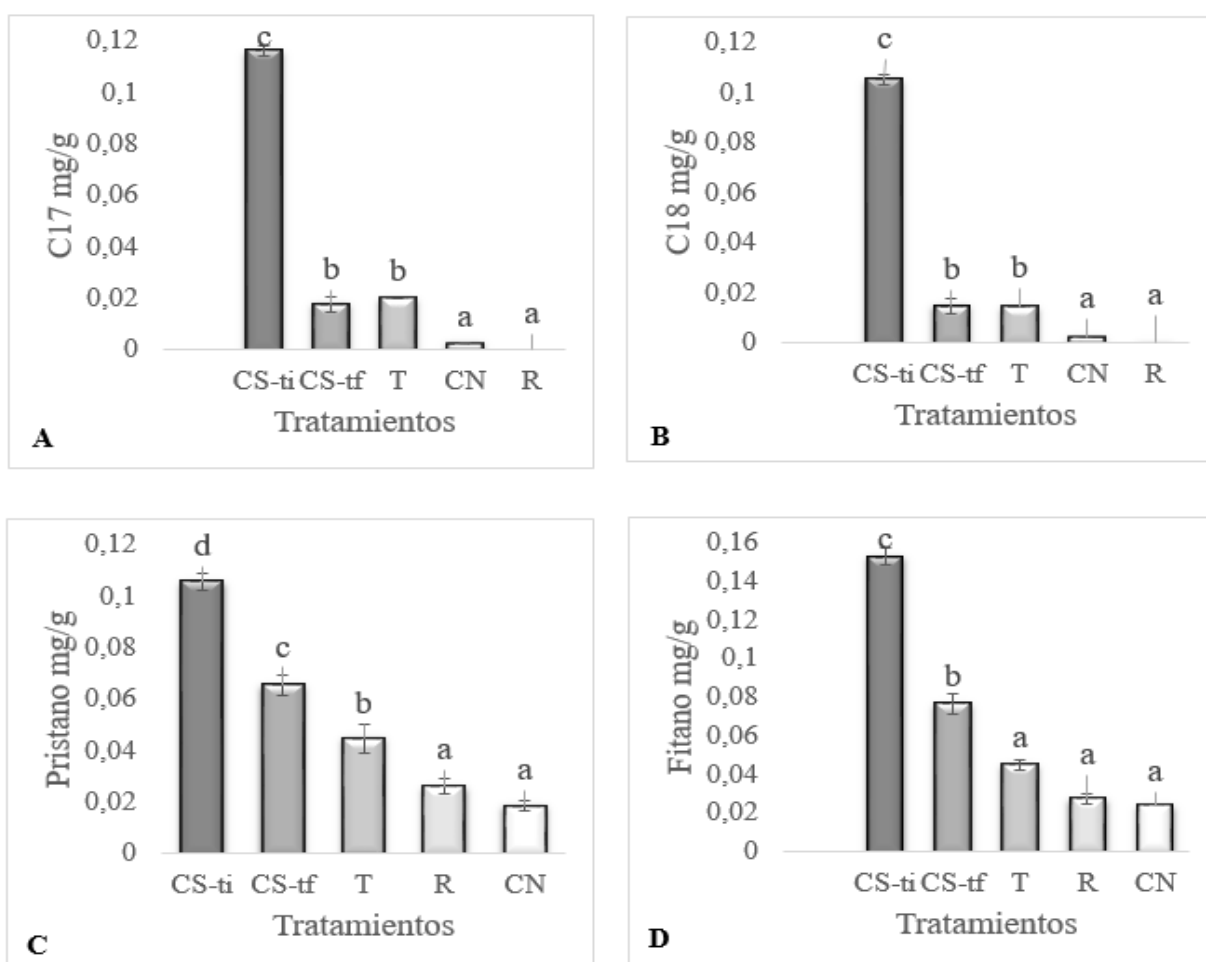


Figura 6. Gráficos de degradación de los diferentes hidrocarburos en el sustrato. T, tratamiento con HMA nativo; R, tratamiento con HMA modelo; CN, control negativo. (A) Degradación de C17. (B) Degradación de C18. (C) Degradación de pristano y (D) Degradación de fitano. Las letras a,b,c y d representan a los diferentes grupos formados al realizar la prueba de Tukey, los tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas entre ellos.

5.2.2 ÍNDICES C17/ PRISTANO Y C18/ FITANO hacer 8,8,9

Tabla 4. Resumen de varios ANOVA realizados de índices de biodegradación en el sustrato.

Tratamientos	Índice de biodegradación			
	C17/pristano		C18/fitano	
	\bar{x}	σ_x	\bar{x}	σ_x
R	0.00	±0.00 a	0.00	±0.00 a
CN	0.13	±0.02 b	0.09	±0.01 b
CS-tf	0.27	±0.02 c	0.19	±0.02 c
T	0.39	±0.02 d	0.37	±0.03 d
CS-ti	1.10	±0.00 e	0.61	±0.01 e
Significancia estadística (P y F)				
P	< 0.01		< 0.01	
F	355.192		171.139	
CV	17%		21%	

T, tratamiento con HMA nativo; R, tratamiento con HMA modelo; CN, control negativo; CS-tf: Control Sustrato- tiempo final; CS-ti, Control Sustrato- tiempo inicial. \bar{x} , media de índices de biodegradación; σ , error estándar; CV, coeficiente de variación. Las letras (a, b, c, d y e) representan los diferentes grupos formados con la prueba de Tukey, los datos seguidos de diferentes letras tienen diferencias significativas entre ellos.

La prueba ANOVA demostró que existen diferencias altamente significativas entre las medias de los índices indicadores de biorremediación “C17/ pristano” y “C18/ fitano” ($p < 0.01$ en ambos casos) y la prueba de Tukey evidenció la formación de grupos entre los tratamientos (Tabla 4 y Figura 7 A y B, respectivamente).

Los índices revelaron que en todos los tratamientos existieron procesos de biodegradación de hidrocarburos. El proceso de biodegradación fue mayor en el tratamiento R (grupo a), seguido de CN (grupo b) y finalmente T (grupo c). Es importante aclarar que el Control Sustrato- tiempo final (CS- tf) presentó también un considerable proceso de biorremediación (Tabla 4 y Figura 7).

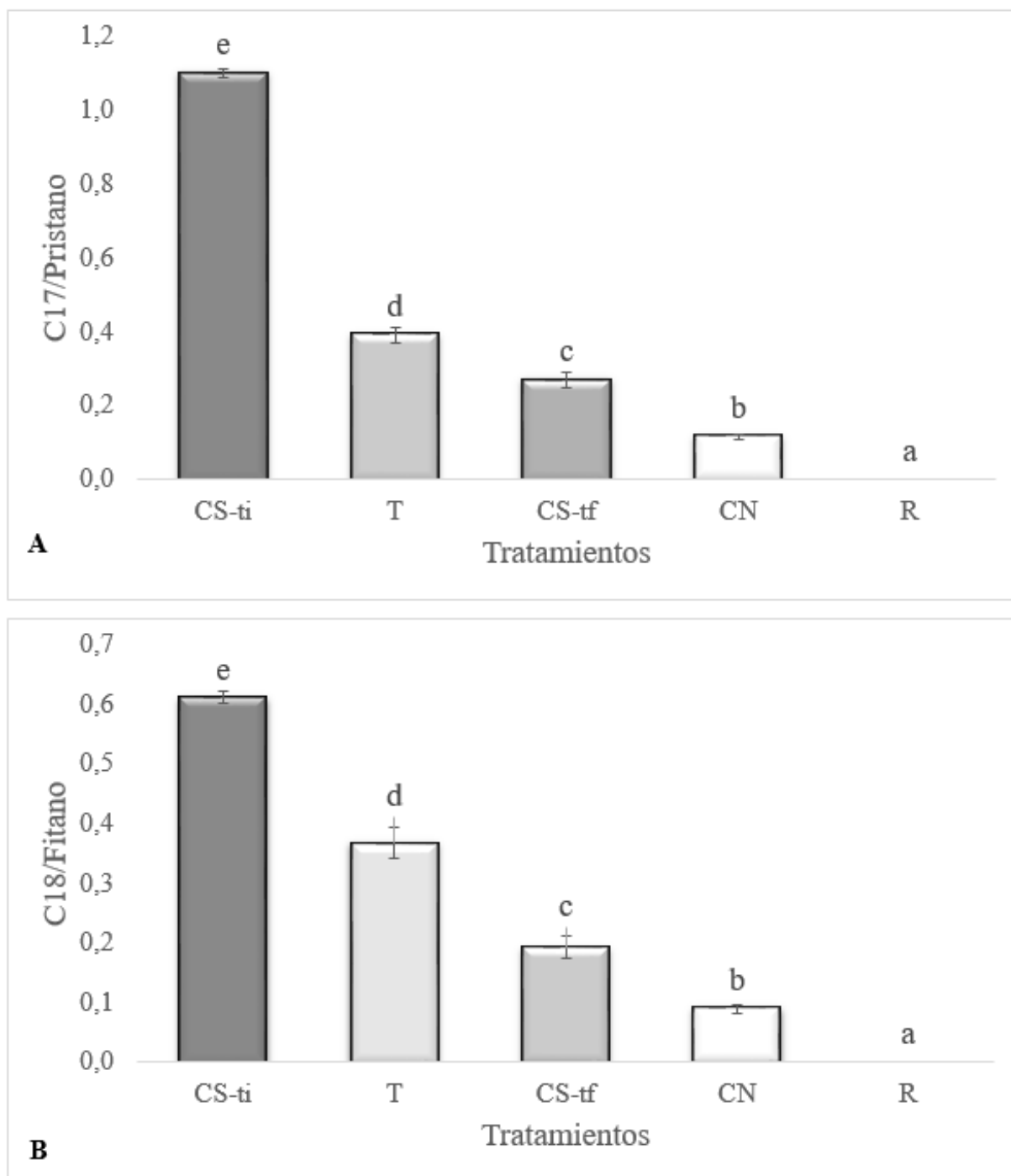


Figura 7. Índices de degradación de hidrocarburos. (A) Índice C17/ pristano y (B) índice C18/ fitano. Las letras (a, b, c, d y e) representan los diferentes grupos formados con la prueba de Tukey, los datos seguidos de diferentes letras tienen diferencias significativas entre ellos.

5.2.3 PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE PRISTANO Y FITANO.

Tabla 5. Porcentajes de degradación de pristano y fitano en el sustrato.

Tratamientos	Porcentaje de degradación			
	Pristano		Fitano	
	\bar{X}	$\sigma_{\bar{x}}$	\bar{X}	$\sigma_{\bar{x}}$
R	77.4	±2.28 a	83	±1.71 a
CN	82.6	±1.88 a	84.5	±1.52 a
T	60.1	±4.81 b	69.5	±3.69 b
CS-tf	38.0	±3.52 c	50.0	±2.81 c
Significancia estadística (P y F)				
P	<0.01		<0.01	
F	31.44		31.16	
CV	11%		8%	

T, tratamiento con HMA nativo; R, tratamiento con HMA modelo; CN, control negativo; CS-tf: Control Sustrato- tiempo final. \bar{X} , Media de porcentajes de degradación; σ , error estándar; CV, coeficiente de variación. Las letras (a, b y c) representan los diferentes grupos formados con la prueba de Tukey, los datos seguidos de diferentes letras tienen diferencias significativas entre ellos.

El ANOVA demostró que existen diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos CN, T y R con relación al porcentaje de degradación de pristano y fitano ($p < 0.01$ en ambos casos) (Tabla 5 y Figura 8). En ambos casos, los tratamientos R y CN presentan mayor porcentaje de degradación de pristano y fitano (grupo a) al compararlos con el tratamiento T (grupo b) (Figura 8 A y B, respectivamente). Adicionalmente, el Control Sustrato- tiempo final (CS-tf) (grupo c) presentó menor degradación que los tratamientos T, R y CN (Tabla 5 y Figura 8).

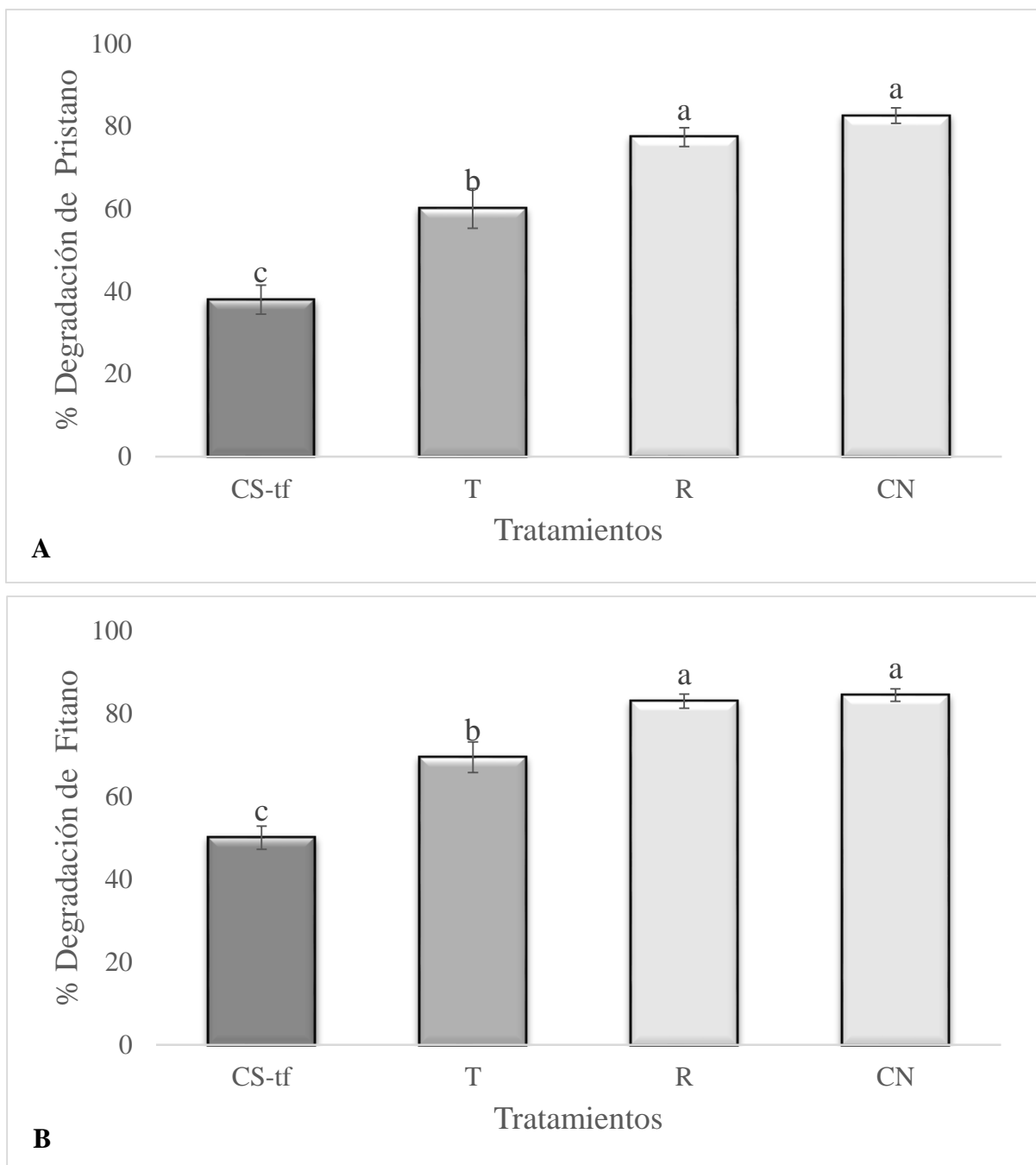


Figura 8. Porcentajes de degradación de pristano y fitano para cada tratamiento en el sustrato. (A) Porcentajes de degradación de pristano y (B) Porcentajes de degradación de fitano. Las letras (a, b y c) representan los diferentes grupos formados con la prueba de Tukey, los datos seguidos de diferentes letras tienen diferencias significativas entre ellos.

5.3 ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ACOMPAÑANTE

Tabla 6. Recuento de bacterias, hongos y actinomicetos por gramo de sustrato.

Tratamiento	Microorganismo					
	Bacterias (UFC/ g)		Hongos (Propágulos/ g)		Actinomicetos (UFC/ g)	
	\bar{x}	σ_x	\bar{x}	σ_x	\bar{x}	σ_x
T	48	$\pm 13 \times 10^4$	105	$\pm 4 \times 10^3$	7	$\pm 0.33 \times 10^5$
R	63	$\pm 19 \times 10^4$	110	$\pm 8 \times 10^3$	3	$\pm 0.67 \times 10^5$
CN	58	$\pm 22 \times 10^4$	127	$\pm 5 \times 10^3$	15	$\pm 6.56 \times 10^5$
Significancia estadística						
P	0.68		0.08		0.059	
F	0.41		3.96		4.70	

T, tratamiento con HMA nativo; R, tratamiento con HMA modelo; CN, control negativo; UFC, Unidades Formadoras de Colonia.

En el sustrato de los tres tratamientos se analizó el recuento de unidades formadoras de colonias de bacterias, actinomicetos y propágulos de hongos. Al realizar el ANOVA; los resultados evidenciaron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos T, R y CN en el recuento de bacterias, hongos y actinomicetos (p: 0.683, p: 0.080 y p: 0.059, respectivamente) presentes en el sustrato (Tabla 6).

6 DISCUSIÓN

6.1 ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN MICORRÍZICA ENTRE LAS CEPAS DE HMA Y LAS PLANTAS DE PASTO RYEGRASS (*Lolium multiflorum*).

La relación micorrízica es una simbiosis entre las raíces de una planta y el micelio de un hongo. La asociación micorrízica tiene un rol clave: mantener la productividad de la planta, ya sea en ambientes naturales o en cultivos agrícolas. (Brundrett y Tedersoo, 2018). Los HMA han sido considerados importantes para la fitoremediación de suelos contaminados con petróleo o sus derivados debido a que favorecen a la planta hospedera en la absorción de nutrientes como el fósforo y nitrógeno, incrementan la disponibilidad de agua (Salzer, Corbiere y Boller, 1999; Liu y Dalpé, 2009), brindan protección contra microorganismos patógenos del suelo y otros factores abióticos como salinidad y acidez (Lenoir et al., 2016). Además, gracias a la red micorrízica que forman dentro del suelo, el alcance de la biorremediación es mayor (Heinonsalo, Jørgensen, Haahtela, y Sen, 2000; Bianciotto y Bonfante, 2002; Kirk et al., 2005).

Los HMA son microorganismos endosimbiontes obligados que representan del 5 al 10% de toda la biomasa microbiana del suelo (Berruti et al., 2014) y colonizan las raíces de la mayoría de las plantas vasculares, aproximadamente el 72% de las mismas (Brundrett y Tedersoo, 2018). Sin embargo, existen varios factores que pueden afectar la formación y desarrollo de la asociación simbiótica: abióticos, bióticos y antropogénicos. Abióticos como la temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes, pH, salinidad y propiedades físicas del suelo (Lenoir, Fontaine, y Sahraoui, 2016). Los factores bióticos como especificidad planta/ hongo, efectividad y número de propágulos, adaptación de los HMA, el metabolismo de la microflora acompañante y la presencia de organismos patógenos (Amor, 2011). Finalmente los factores antropogénicos como prácticas agrícolas de fertilización, arado y contaminación, (Amor, 2011; Lenoir et al., 2016) son los mayores causantes de su disminución poblacional.

En este estudio, el análisis microscópico de las raíces de las plantas de pasto evidenció una escasa colonización micorrízica en los dos tratamientos inoculados, el tratamiento T con HMA nativo y el tratamiento R con HMA modelo *R. irregularis*, como se observa en la Figura 1. Varios estudios que han investigado esta relación micorrízica en condiciones de

contaminación por crudo o sus derivados (Crudo, diésel, HAPs, antraceno, entre otros) demostraron resultados similares (Cabello, 1999; Kirk et al., 2005; Leyval y Binet, 1998).

Existen cuatro posibles razones principales por las que el establecimiento de la relación micorrízica entre los HMA y la planta puede verse afectado. La primera razón es que las propiedades del agente contaminante (hidrocarburo), afecta el ciclo de desarrollo de los HMA y por lo tanto su establecimiento; la segunda razón es que las raíces de las plantas de pasto utilizadas en este estudio no estuvieron pre-micorrizadas, lo que resultó desfavorable; la tercera razón es la baja afinidad entre las plantas hospederas y los HMA utilizadas y, finalmente, la cuarta razón es que los inóculos micorrízicos utilizados provienen de la colección de HMA perteneciente a la PUCE- Nayón son de lento crecimiento. Estas cuatro razones principales se discuten a continuación.

La primera razón a discutir es que las propiedades del contaminante pueden afectar el potencial de colonización de los HMA (Cabello, 1997). Varios autores coinciden en que las propiedades fisicoquímicas del petróleo pueden afectar el crecimiento de los HMA y reducir la colonización de las raíces, la producción de esporas y su germinación (Cabello, 1997; Verdin, Lounès-Hadj, Fontaine, Grandmougin, y Durand, 2006; Debiane et al., 2008; Hassan et al., 2014; Driai et al., 2015). Se ha demostrado también que los contaminantes de hidrocarburos provocan una reducción de la colonización micorrízica al dificultar la detección de un hospedero compatible, o interrumpir algún paso en el ciclo de desarrollo de los HMA (germinación de esporas, elongación de la hifa germinativa, colonización de la raíz, desarrollo de hifa extraradical y esporulación) una vez realizado el contacto con el hospedero (Lenoir et al., 2016). Leyval y Binet (1998) sugieren que en suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) el nivel de contaminación o alguno de sus componentes, inhiben la colonización o afectan la supervivencia de los HMA si es que la colonización fue exitosa. Finalmente, también se ha sugerido que la propiedad hidrofóbica de los hidrocarburos puede inhibir o retrasar la germinación de las esporas al afectar su hidratación (Franco et al., 2007, Tommerup, 1983).

En este trabajo se utilizó una concentración de 5% p/p de hidrocarburo debido a que en ensayos previos (datos no publicados) realizados por Mónica Garcés PhD. la encargada de la colección del laboratorio de Micología de la PUCE-Nayón se determinó la capacidad de

crecimiento de las semillas de pasto en sustrato contaminado con crudo hasta en un 10% p/p de contaminación (Comunicación personal con PhD. Mónica Garcés, 2018), por lo que se pretendía investigar la capacidad de los HMA de colonizar las plantas de pasto en un ambiente de estrés alto dentro de este rango máximo de tolerancia, por lo que se escogió la mitad (5% p/p de crudo). Debido a la evidencia encontrada en las fuentes bibliográficas citadas previamente, la primera razón por la que puede explicarse el resultado de la escasa colonización de raíces por HMA obtenido en este estudio (Figura 1) es que las propiedades del contaminante afectaron negativamente la colonización de raíces al afectar el ciclo de desarrollo y establecimiento-la simbiosis.

La segunda razón que discutir es que las raíces de las plantas de pasto utilizadas en este ensayo no estaban pre-micorrizadas, Cabello (1995) demostró que al mezclar el inóculo micorrízico con sustrato contaminado con hidrocarburos, este inhibió el desarrollo de la colonización en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) inoculadas con *Glomus mosseae* y *G. fasciculatum* por completo. Sin embargo, al realizarse una pre-micorrización de las plantas sembradas en el mismo sustrato, los HMA sobrevivieron a la contaminación con hidrocarburos (Cabello, 1995). Debido al tiempo que toma que las raíces de las plantas se colonicen con HMA, en este estudio se pretendió analizar si colocar el inóculo de los HMA en el sustrato al mismo tiempo que la planta germinada resultaba favorable. Los resultados de colonización escasa de este estudio (Figura 1) demostraron que la aplicación del inóculo micorrízico en el sustrato contaminado colocado al mismo tiempo de siembra de las plantas no resultó favorable para la colonización, lo que coincide con el estudio de Cabello (1995) mencionado anteriormente.

La pre-micorrización de las raíces de plantas que se utilizarán para bioremediación de suelos contaminados parece ser una estrategia útil para asegurar la micorrización de estas, sin embargo, aun cuando las raíces están colonizadas, los contaminantes de hidrocarburos tienen efectos negativos sobre la colonización, como lo demuestra Garcés et al. (2017) quienes analizaron el efecto de contaminantes de hidrocarburos sobre raíces pre-micorrizadas (PM) de plántulas de maíz con *R. irregularis*. Las plántulas de maíz tenían un porcentaje de colonización de $60 \pm 2\%$ previo al trasplante en sustrato contaminado con diésel (D). Después de 46 días de ensayo se analizó el porcentaje de colonización de las raíces de los tratamientos en presencia (PM+D) y ausencia de diésel (PM-D) presentando un incremento del 6% en el tratamiento PM-

D (64.6 ± 10.9 %), y una disminución de más del 50% de colonización en el tratamiento PM+D (29.2 ± 6.7 %) (Garcés et al., 2017). Ese estudio evidenció que, a pesar de que las plantas estaban pre-micorrizadas, el porcentaje de colonización puede verse afectado por la presencia de hidrocarburos, lo que es un punto importante para considerar al aplicar HMA en plantas para fitorremediación.

La tercera razón para explicar la escasa colonización es la falta de afinidad entre la planta (*Lolium multiflorum*) utilizada en el ensayo y las cepas de HMA estudiadas. A pesar de que la relación HMA-planta no se considera específica, sí existe cierto grado de afinidad (Barrer, 2009; Symanczik, 2016). También se ha determinado que es posible que algunas especies de HMA son especialistas y están presentes solamente en determinados ecosistemas (Barrer, 2009), por lo tanto, solo crecerán con las plantas adaptadas a dichos ambientes (Oehl et al., 2003; Symanczik, 2016). Adicionalmente, la variación genética entre individuos pertenecientes a una misma especie y entre especies de HMA, pueden influenciar en la compatibilidad entre la planta hospedera y los HMA, así como determinar su beneficio sobre las mismas (Barrer, 2009; Castillo, Borie, Oehl, y Sieverding, 2016). Finalmente, las condiciones fisicoquímicas del suelo pueden provocar un tipo de especificidad con las plantas hospederas que se desarrollan en estos suelos (Barrer, 2009). Debido a este fenómeno de afinidad es factible considerar que la afinidad entre las cepas de HMA utilizadas en este ensayo y la planta de pasto fue muy baja, lo que influyó en el adecuado establecimiento de la simbiosis.

Es importante mencionar que en un ensayo realizado a la par con este trabajo se utilizaron tres inóculos de HMA en plantas de maíz (dos de la colección de hongos micorrízicos nativos de suelos contaminados con hidrocarburos del laboratorio de Micología de la PUCE-Nayón y un tercero con el hongo modelo *R. irregularis*). Este ensayo paralelo con plantas de maíz se mantuvo en las mismas condiciones de invernadero que las plantas de pasto y durante el mismo tiempo de ensayo. Las variables diferentes entre los dos ensayos fueron los inóculos de HMA nativos utilizados (el hongo modelo utilizado sí fue el mismo), el sustrato usado que fue una mezcla de varios suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de la Amazonía Ecuatoriana en lugar de compost más roca volcánica estéril y la planta hospedera que en este caso fue maíz.

Al analizar la colonización de raíces del ensayo en estas plantas de maíz se halló una colonización muy alta. Aunque las cepas de HMA nativos probadas en ambos ensayos fueron diferentes, todas fueron colectadas en la misma ubicación y mantenidas bajo las mismas condiciones en los cultivos trampa. Estos resultados demuestran que los HMA pertenecientes a la colección del laboratorio de Micología de la PUCE-Nayón se encuentran activos y aptos para colonizar en condiciones de estrés por contaminación con hidrocarburos, pero es posible que las plantas de RyeGrass (*L. multiflorum*) no tienen la misma afinidad con los HMA utilizados en este trabajo.

La cuarta razón para explicar la escasa colonización micorrízica fue el crecimiento lento de los HMA pertenecientes a la colección del laboratorio de Micología de la PUCE-Nayón. Los HMA de esta colección provienen de plantas de suelos contaminados con hidrocarburos de la Amazonía Ecuatoriana y el hongo modelo *Rhizophagus irregularis* (GINCO). Se ha referenciado que la germinación de los hongos nativos de suelos contaminados con hidrocarburos de la colección tuvo una fase larga de adaptación (1-2 años) en la planta trampa utilizada *in vitro* y que los cultivos trampa no se mantuvieron con sustrato contaminado con petróleo debido al alto costo que esta metodología implicaba. Esto sugiere que los hongos, al no mantener la presión selectiva del hidrocarburo en los cultivos trampa del laboratorio, podrían haber disminuido su tolerancia a este contaminante y esta podría ser otra posible causa de la baja colonización en las plantas de este estudio (Comunicación personal con PhD. Mónica Garcés, 2018).

Una vez analizada la colonización de raíces al final del ensayo se realizó un recuento del número de esporas de aspecto viable dentro del sustrato. Este recuento demostró la presencia de un gran número de esporas en los tratamientos T y R (115 ± 9 y 63 ± 4 esporas/ 10 g de sustrato, respectivamente) comparado con el inóculo inicial (4 esporas /10 g de sustrato) (Tabla 1). Estos resultados sugieren que los dos inóculos de HMA encontraron la manera de esporular, a pesar de presentar una colonización intraradical escasa. En esta investigación, la mayoría de las esporas estaban germinadas aun cuando existió escasa colonización de las raíces y estaban recubiertas de hidrocarburos (Figura 2), lo que coincide con los hallazgos de Franco et al. (2007).

Se ha determinado que una relación micorrízica se establece gracias a exudados liberados por las raíces de la planta. Estos compuestos difusibles permiten iniciar y estimular el crecimiento hifal durante la colonización de las raíces (Gadkar, David, Kunik, y Kapulnik, 2001; Barrer, 2009). Estudios como el de Kirk et al. (2005) plantean que el petróleo interfiere con la emisión/recepción de esta señal, además de ejercer un efecto tóxico sobre el crecimiento fúngico. Sin embargo, se sugiere que, en ausencia de los exudados de la raíz, las esporas de los HMA pueden germinar y desarrollar el tubo germinativo inicial (Harrison, 1999; Kirk et al., 2005). Se piensa que el contacto directo entre la hifa y las células epidérmicas de la pared vegetal puede permitir el establecimiento de una relación micorrízica funcional (Harrison, 1999; Kirk et al., 2005). Por lo tanto, se considera que en el presente estudio el contaminante pudo tener un efecto sobre la emisión/ recepción de la señal química entre la planta y el HMA, sin embargo, también existió la comunicación entre las esporas y las células de la raíz (por la presencia de esporas germinadas) aunque la colonización fue escasa.

Las esporas son consideradas estructuras de resistencia (Franco et al., 2007). En un ambiente inhóspito, como la presencia de hidrocarburos, el aumento del número de esporas en el sustrato, a pesar de su limitado desarrollo intraradical sugiere que los HMA de este estudio se encuentran en una fase de adaptación al medio contaminado. En ambos tratamientos existió una alta esporulación, aunque T esporuló aproximadamente el doble que los HMA del tratamiento R, lo que sugiere que los hongos de T tuvieron mayor dificultad para adaptarse al medio.

6.1.1 CRECIMIENTO VEGETAL

Al analizar el crecimiento vegetal a través de los parámetros “altura” y “porcentaje de peso seco radicular” se evidenció que los tratamientos T y CN presentaron valores más altos y con mayor porcentaje de peso seco al compararlos con el tratamiento R (Tabla 2). En cuanto al “porcentaje de peso seco aéreo” los tratamientos R y CN resultaron mejores que el tratamiento T. En los tres parámetros analizados, el tratamiento CN presenta mejores resultados, comparados con los tratamientos T y R. Esto sugiere que la inoculación de HMA no tuvo un efecto positivo en el crecimiento de las plantas de pasto comparadas con las plantas no inoculadas en presencia de sustrato contaminado con 5% de crudo y, aparentemente, el esfuerzo en el establecimiento de la simbiosis supone un menor crecimiento de las plantas.

Los HMA son dependientes del carbono (C) suministrado por la planta hospedera que actúa como un sumidero de este compuesto (Valentine, Mortimer, Kleinert, Kang y Benedito, 2013). Varios autores han sugerido que el C que provee la planta hospedera y es utilizado por el HMA, representa un costo energético considerable para la planta que puede repercutir en su crecimiento (Jones, Hodge, y Kuzyakov, 2004; Smith y Read, 2008; Hassan et al., 2014). Esta puede ser la razón de un menor crecimiento traducido en menor peso seco y altura.

A pesar de que estos resultados (Tabla 2) sugieren que la inoculación con HMA no tuvo un efecto positivo en el crecimiento vegetal, es importante mencionar que aunque el establecimiento de la relación micorrízica es costo-energético para la planta hospedera, la relación simbiótica puede retribuir un beneficio para la misma a largo plazo, al mejorar la absorción de otros nutrientes una vez establecida (Stribley y Read, 1980; Snellgrove et al., 1982; Smith, Smith, St John, Nicholas, 1985; Son y Smith, 1988; Smith y Read, 2008). Además, en ambientes contaminados con hidrocarburos, la inoculación con HMA pueden mejorar el saneamiento de la rizósfera al mejorar la actividad microbiana y el crecimiento y tolerancia de las plantas hospederas (Gamal, 2005; Gamarra, 2014).

6.2 DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUSTRATO

En todos los tratamientos del ensayo (T, R, CN) incluido el CS los índices de C17/pristano y C18/fitano decrecieron al final del ensayo al compararlos con los datos iniciales del CS-ti (Tabla 3, Figura 6). Esto evidenció la existencia de procesos de biodegradación en todos los tratamientos. Estos resultados coinciden con varios estudios que determinaron la existencia de procesos de biodegradación al analizar el valor de estos índices (Commendatore, Esteves, y Colombo, 2000; Cerqueira et al., 2011; Minai et al., 2015). Los índices de biorremediación C17/pristano y C18/fitano ($p < 0.01$, F: 754.96; $p < 0.01$, F: 414.71, respectivamente) evidenciaron que el tratamiento R inoculado con *R. irregularis* tuvo un mayor proceso de biorremediación seguido del tratamiento no inoculado (CN), como se puede observar en la Tabla 4, Figura 7.

Los isómeros ramificados pristano y fitano se biodegradan con mayor lentitud y dificultad al compararlos con aquellos compuesto de estructura lineal como C17 y C18 (Atlas, 1975; Paudyn, Rutter, Kerry Rowe, y Poland, 2008; Cerqueira et al., 2011; Ortíz y García, 2003; Minai et al., 2015). A pesar de que el pristano y fitano son relativamente resistentes a la

degradación, existen microorganismos que pueden degradarlos (Ilori et al., 2011). Por lo tanto, los índices de C17/pristano y C18/ fitano se usan para analizar la efectividad de los tratamientos de biodegradación (Ilori et al., 2011) mediante los efectos de la volatilización y la presencia de microorganismos capaces de degradar la fracción alifática del crudo (Colombo, Pelletier, Brochu, Khallit, y Catogglo, 1989; Commendatore et al., 2000; Ortíz y García, 2003; Minai et al., 2015).

Al calcular el porcentaje degradado de pristano y fitano ($p < 0.01$, $F = 31.44$; $p < 0.01$, $F = 31.16$, respectivamente) los tratamientos R y CN fueron los más efectivos (Tabla 5, Figura 8). Estos resultados coinciden con estudios previos que demuestran la efectividad de *R. irregularis* para potenciar procesos de biorremediación de hidrocarburos (Driai et al., 2015; Rajtor y Piotrowska, 2016). Así también, la alta efectividad de CN demostrada en los ensayos puede deberse, como ya se dijo, a que el establecimiento de la relación micorrízica tiene costo energético para la planta, por lo que las plantas sin inóculo micorrízico pudieron enfocar su energía en la degradación de hidrocarburos y no en establecer la relación simbiótica (Jones et al., 2004; Smith y Read, 2008; Hassan et al., 2014).

6.3 MICROBIOTA ACOMPAÑANTE

Varios estudios demuestran que microorganismos como bacterias, actinomicetos, hongos y algas poseen la capacidad de degradar hidrocarburos por lo tanto, pueden crecer en sustratos contaminados con estos (Boonchan, Britz, y Stanley, 2000; Varjani y Upasani, 2013; Wilkes, Golding, y Rabus, 2016; Varjani, 2017). Debido a esta evidencia bibliográfica no resultó sorprendente que después de 34 semanas de ensayo se estableciera un microbioma en el sustrato. Por el método de dilución en placa se evidenció la existencia de bacterias, actinomicetos y hongos en los tres tratamientos. El recuento de los tres microorganismos no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos. La presencia de estos grupos microbianos en un sustrato previamente esterilizado sugiere una capacidad degradadora de petróleo. Así lo estipula Atlas (1991), quien demostró que los microorganismos degradadores de petróleo representan menos del 0.1% del microbioma en ecosistemas no contaminados, sin embargo su densidad poblacional aumenta del 1 al 10% en ambientes contaminados con hidrocarburos (Atlas, 1991; Varjani, 2017). Debido a la presencia de bacterias, actinomicetos y hongos en los tres tratamientos, es válido considerar que estos grupos microbianos

acompañantes pudieron jugar un papel en la degradación de los hidrocarburos del sustrato, como lo explican Atlas (1981) y Varjani et al (2015) que han demostrado que la cooperación catabólica entre los diferentes grupos microbianos durante la biodegradación de contaminantes es muy importante (Atlas, 1981; Varjani, Rana, Jain, Bateja, y Upasani, 2015; Varjani, 2017).

7. CONCLUSIONES

El crecimiento de HMA asociados a plantas que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos es una herramienta interesante para la biorremediación. Se puede concluir que los HMA utilizados en este estudio están viables por el aumento de las esporas a pesar de la escasa colonización. Es posible que se requiera un mayor tiempo de ensayo para permitir una adecuada adaptación y el mejor establecimiento de la simbiosis.

La baja colonización de las raíces pudo deberse a efectos adversos del contaminante sobre los exudados de la raíz, la germinación de las esporas, la infección de las raíces y la interrupción de señales entre los simbioses.

Los índices C17/pristano y C18/fitano evidenciaron que en todos los tratamientos existieron procesos de biodegradación y que el tratamiento con *R. irregulares* tuvo el mayor grado de degradación, seguido de CN. Sin embargo, en cuanto a porcentaje de biorremediación R y CN se comportan de manera semejante, pero debido al mayor índice de degradación de R se puede sugerir que las plantas micorrizadas pueden ser más eficientes en biorremediación y se tendría que evaluar otros HMA nativos, con diferentes plantas para determinar otras relaciones simbióticas que potencien la fitorremediación.

La limitada actividad de degradación del tratamiento con inóculo nativo (T) pudo deberse a que, aparentemente, se trata de un HMA de crecimiento lento pues el cultivo trampa inicial de este HMA nativo tuvo un desarrollo muy largo *in vitro* (alrededor de dos años), lo que sugiere que estos resultados podrían variar si se extendiera el tiempo del estudio.

La efectividad de CN demostrada en los ensayos seguramente se debe a que el establecimiento de la relación micorrízica representa un costo energético para la planta, por lo que las plantas sin inóculo micorrízico pudieron enfocar su energía en la degradación de hidrocarburos y no en establecer la relación simbiótica.

El análisis de la microbiota acompañante evidenció la existencia de bacterias, hongos y actinomicetos en el sustrato sin diferencias significativas entre los tratamientos. El establecimiento de este bioma se dio porque, aunque el ensayo se realizó en un invernadero, donde se controlaron las condiciones, no se trataba de un ambiente estéril, como no lo era el crudo utilizado. Los resultados sugieren que la microbiota existente tiene resistencia al crudo por lo que pudo reproducirse en el sustrato y puede ser la responsable parcial de la degradación en los controles.

La revisión bibliográfica sugiere que utilizar plantas con sus raíces previamente colonizadas con HMA podría ser una metodología más efectiva para la fitoremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, a pesar de que el contaminante puede afectar la colonización de las mismas. Esto puede ser motivo de futuros estudios.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero. (2017). Rendición de Cuentas 2017. Recuperado de <http://www.controlhidrocarburos.gob.ec/rendicion-de-cuentas-2017/>
- Akhundova, E., Atakishiyeva, Y. (2015). Interaction between plants and biosurfactant producing microorganisms in petroleum contaminated absheron soils. En M. Ozturk, M. Ashraf, A. Aksoy, y M. S. A. Ahmad (Eds). *Phytoremediation for Green Energy*. New York: Springer Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-007-7887-0
- Alarcón, A., Davies, F., Autenrieth, R., Zuberer, D. (2008). Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. 10(4), 251-263. doi: 10.1080/15226510802096002
- Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., y Sprocati, A. (2009). Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*, 407(8), 3024–3032. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.01.011
- Amor, A. (2011). Efectos de la inoculación del hongo de micorrización *Tuber melanosporum* y la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* en la calidad de la plántula de *Pinus halepensis* (Disertación de pregrado). Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Atlas, R. (1975). Effects of Temperature and Crude Oil Composition Petroleum Biodegradation. *Applied Microbiology*, 30(3), 396–403. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC187194/>
- Atlas, R. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180–209. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281502/>
- Atlas, R. (1991). Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation oil spills. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 52(2), 149–156. doi: 10.1002/jctb.280520202

- Atlas, R. (1997). Bioestimulación para mejorar la biorrecuperación microbiana. En M. Levin y M. Gealt (Eds). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimulación, modificación de microorganismos y aplicaciones*. (21-40). Madrid: McGraw-Hill.
- Azubuike, C., Chikere, C., y Okpokwasili, G. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1–18. doi: 10.1007/s11274-016-2137-x
- Banco Central del Ecuador. (2018). Cifras del sector petrolero ecuatoriano No. 133 Recuperado de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/cspe2018133.pdf>
- Bianciotto, V., y Bonfante, P. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 365–371. doi: 10.1023/A:1020544919072
- Barrer, S. (2009). El Uso De Hongos Micorrizicos Arbusculares Como Una Alternativa Para La Agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 7(1). Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14.pdf>
- Berruti, A., Borriello, R., Orgiazzi, A., Barbera, A., Lumini, E., y Bianciotto, V. (2014). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and their Value for Ecosystem Management. En O. Grillo (Ed.), *Biodiversity - The Dynamic Balance of the Planet*. doi: 10.5772/58231
- Boonchan, S., Britz, M., y Stanley, G. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1007–1019. doi: 10.1128/AEM.66.3.1007-1019.2000
- Brundrett, M., y Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108-1114. doi: 10.1111/nph.14976
- Cabello, M. (1995). Efectos de la contaminación con hidrocarburos sobre hongos formadores de micorrizas vesículo- arbusculares (MVA). *Boletín Micológico*, 10(1–2), 77–83. doi:

10.22370/bolmicol.1995.10.0.1083

- Cabello, M. (1997). Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*, 22(3), 233–236. doi: 10.1016/S0168-6496(96)00094-3
- Cabello, M. (1999). Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbon polluted soils. *Journal of Basic Microbiology*, 39(2), 89–95. Recuperado de [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4028\(199905\)39:2<89::AID-JOBM89>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4028(199905)39:2<89::AID-JOBM89>3.0.CO;2-D)
- Cabello, M. (2009). Mycorrhizas and hydrocarbons. En G. Gadd (Ed). *Fungi in bioremediation*, 456-471. doi: 10.1017/CBO9780511541780.018
- Castillo, C., Borie, F., Oehl, F., y Sieverding, E. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity: prospecting in Southern-Central zone of Chile. A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(2), 400–422. doi: 10.4067/S0718-95162016005000036
- Cerqueira, V., Hollenbach, E., Maboni, F., Vainstein, M., Camargo, F., Peralba, M., y Bento, F. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(23), 11003–11010. doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.074
- Chamba, I., Rosado, D., Kalinhoff, C., Thangaswamy, S., Sánchez, A., y Gazquez, M. (2017). Erato polymnioides – A novel Hg hyperaccumulator plant in ecuadorian rainforest acid soils with potential of microbe-associated phytoremediation. *Chemosphere*, 188, 633–641. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.160
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., y Sharma, A. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, 63(2), 417–431. doi: 10.1007/s13213-012-0543-3
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., y Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33(6), 745–755. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.003
- Chibuike, G. (2013). Use of mycorrhiza in soil remediation: A review. *Scientific Research and*

Essays, 8(35), 1679–1687. doi: 10.5897/SRE2013.5605

Colombo, J., Pelletier, E., Brochu, C., Khalilt, M., y Catogglo, J. (1989). Determination of hydrocarbon sources using n -alkane and potyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case Study : Rio de La Plata Estuary , Argentina. *Environmental Science y Technology*, 23(7), 888–894. doi: 10.1021/es00065a019

Commendatore, M., Esteves, J., y Colombo, J. (2000). Hydrocarbons in coastal sediments of Patagonia, Argentina: Levels and probable sources. *Marine Pollution Bulletin*, 40(11), 989–998. doi: 10.1016/S0025-326X(00)00042-4

Debiane, D., Guillaume, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Grandmougin, A., Shirali, P; Lounes, A. (2008). In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany*, 64(2), 120–127. doi: 10.1016/j.envexpbot.2008.04.003

Departamento Administrativo Nacional de Estadística en Colombia. (2008). *Estimación e interpretación del Coeficiente de Variación de la encuesta COCENSAL*. Recuperado de https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/censo/est_interp_coefvariacion.pdf

Departamento de Salud de los EEUU, Agencia de Salud Pública y Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de enfermedades. (1999). Toxicological profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). 3. Identity and analysis of Total Petroleum Hydrocarbons. Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp123.pdf>

Di Benedetto, A., y Tognetti, J. (2016). Técnicas de análisis de crecimiento de plantas : su aplicación a cultivos intensivos. *Revista de Investigación Agropecuaria*, 42(3), 258–282. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/ria/v42n3/v42n3a07.pdf>

Driai, S., Verdin, A., Laruelle, F., Beddiar, A., y Lounès-Hadj, A. (2015). Is the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* able to fulfil its life cycle in the presence of diesel pollution? *International Biodeterioration and Biodegradation*, 105, 58–65. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.08.012

Ebitson, M y Gallagher, D. (2016). Method Detection Limits for EPA Method 8015 Diesel

- Range Organics using Fully Automated extraction and concentration. *Horizon Technology, Inc.* Recuperado de https://www.horizontechinc.com/wp1/wp-content/uploads/2016/07/AN056_091214_Method_DLs_EPA_Method_8015.pdf
- Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Uribe, R., Reyes, R., Flores, D., Arce, J. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. *Instituto Mexicano del Petróleo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.* Recuperado de <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CG008215.pdf>
- Foght, J. (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons : pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15, 93–120. doi: 10.1159/000121324
- Franco, A., Ferrera, R., Varela, L., Pérez, J., y Alarcón, A. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *Journal of Basic Microbiology*, 47(5), 378–383. doi: 10.1002/jobm.200610293
- Gadkar, V., David-Schwartz, R., Kunik, T., y Kapulnik, Y. (2001). Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization. Factors Involved in Host Recognition. *Plant Physiology*, 127, 1493–1499. doi: 10.1104/pp.010783.vitro
- Gamal, R. (2005). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in phytoremediation of soil rhizosphere spiked with Poly Aromatic Hydrocarbons. *Mycobiology*, 33(1), 41–50. doi: 10.4489/MYCO.2005.33.1.041
- Gamarra, R. (2014). Factibilidad de uso de la asociación planta-hongos Glomeromycota en la biorestauración de un suelo contaminado con hidrocarburo. Tesis doctoral. Universidad Central de Caracas Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Gao, Y., Li, Q., Ling, W., y Zhu, X. (2011). Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2–3), 703–709. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.09.076
- Garcés, M., Senés, C., Declerck, S., y Cranenbrouck, S. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungal

- community composition in *Carludovica palmata*, *Costus scaber* and *Euterpe precatoria* from weathered oil ponds in the Ecuadorian Amazon. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.02134
- Garcés, M., Calonne, M., Plouznikoff, K., Misson, C., Navarrete, M., Cranenbrouck, S., Declerck, S. (2018). Dynamics of short-term phosphorus uptake by intact mycorrhizal and non-mycorrhizal maize plants grown in a circulatory semi-hydroponic cultivation system. *Frontiers in Plant Science*.8.1471. doi: 10.3389/fpls.2017.01471.
- Gil, I. (13 de junio de 2013). ¿Por qué hay un derrame petrolero por semana en Ecuador? BBC Mundo. Recuperado de http://www.bbc.com/mundo/noticias/2013/06/130610_ciencia_ecuador_derrame_rio_liempieza_ig
- Gomis, V. (2008). *Cromatografía de gases*. *Cromatografía de gases*. Universidad de Alicante. Recuperado de <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8247>
- Harrison, M. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 361–389. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.361
- Hassan, S., Bell, T., Stefani, F., Denis, D., Hijri, M., y St-Arnaud, M. (2014). Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-contaminated and uncontaminated soils following willow (*Salix* spp. L.) planting. *PlosOne*, 9(7), 1–10. Recuperado de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102838>
- Heinonsalo, J., Jørgensen, K., Haahtela, K., y Sen, R. (2000). Effects of *Pinus sylvestris* root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(5), 451–464. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872081>
- Hernández, H. (2014). Respuestas morfológicas y fisiológicas de rizofagos intraradices y medicago sativa ante contaminación por diésel.(Disertación doctoral). Colegio de Postgraduados, México.

- Huesemann, M. (2017). Biodegradation and Bioremediation of Petroleum Pollutants in Soil. En A. Singh y O. Ward. (Eds.). Applied bioremediation and phytoremediation (13-34). Recuperado de <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-05794-0>
- Iffis, B., St-Arnaud, M., y Hijri, M. (2017). Petroleum contamination and plant identity influence soil and root microbial communities while AMF spores retrieved from the same plants possess markedly different communities. *Frontiers in Plant Science*, 8(8), 1–16. Recuperado de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01381/full>
- Ilori, M., Adebusoye, S., Obayori, O., Oyetibo, G., Ajidahun, O., James, C., y Amund, O. (2011). Extensive biodegradation of Nigerian Crude Oil (Escravos Light) by newly characterized yeast strains. *Petroleum Science and Technology*, 29(21), 2191–2208. doi: 10.1080/10916461003681620
- Instituto Nacional de Estadística de Chile. (2016). *Anexo estadístico1: Coeficientes de Variación y error asociado al estimador*. Recuperado de http://historico.ine.cl/ene/files/pdf/anexo_estadistico_coeficiente_de_variacion_y_error_asociado_al_estimador_v20160429.pdf
- Ismail, Y., McCormick, S., and Hijri, M. (2011). A fungal symbiont of plant-roots modulates mycotoxin gene expression in the pathogen *Fusarium sambucinum*. PLoS ONE 6:e17990. doi: 10.1371/journal.pone.0017990
- Joner, E., Johansen, A., Loibner, A., de la Cruz, M., Szolar, O., Portal, J., y Leyval, C. (2001). Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science and Technology*, 35(13), 2773–2777. doi: 10.1021/es000288s
- Jones, D., Hodge, A., y Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist Trust*, 163(3), 459–480. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x
- Joye, S., Kleindienst, S., y Peña, T. (2018). SnapShot: Microbial Hydrocarbon Bioremediation. *Cell*, 172(6), 1336–1336. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.059
- Kaimi, E., Mukaidani, T y Tamaki, M. (2007). Screening of twelve plant species for

- phytoremediation of petroleum hydrocarbon- contaminated soil. *Plant Production Science*, 10(2), 211-218. doi: 10.1626/pp.s.10.211.
- Khanna, S. y Gharpure, A. (2017). Petroleum carcinogenicity and aerodigestive tract: In context of developing nations. *Cureus*, 9(4), 1202-1209. doi: 10.7759/cureus.1202
- Kirk, J., Moutoglis, P., Klironomos, J., Lee, H., y Trevors, J. T. (2005). Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and in vitro transformed carrot root cultures. *Plant and Soil*, 270(1), 23–30. doi: 10.1007/s11104-004-1013-x
- Kumar, A., Devi, S., y Singh, D. (2018). Significance and approaches of microbial bioremediation in sustainable development. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*, 93–114. doi: 10.1007/978-981-13-0053-0_5
- Kumari, B., y Singh, D. (2016). A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Ecological Engineering*, 97, 98–105. doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.08.006
- Leahy, J., y Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305–315. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372779/>
- Lenoir, I., Lounés-Hadj, A., Laruelle, F., Dalpé, Y., y Fontaine, J. (2016). Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 213, 549–560. doi: 10.1016/j.envpol.2016.02.056
- Lenoir, I., Fontaine, J., y Lounes-Hadj, A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses : A review. *Phytochemistry*. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.01.002
- Leyval, C., y Binet, P. (1998). Effect of Polyaromatic Hydrocarbons in Soil on Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Journal of Environmental Quality*., 27(2), 402–407. doi: 10.2134/jeq1998.00472425002700020022x
- Liao, J., Wang, J., y Huang, Y. (2015). Bacterial community features are shaped by geographic location, physicochemical properties, and oil contamination of soil in main oil fields of

- china. *Microbial Ecology*, 70(2), 380–389. doi: 10.1007/s00248-015-0572-0
- Liu, A., y Dalpé, Y. (2009). Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular mycorrhizal leek plants. *International Journal of Phytoremediation*, 11(1), 39–52. doi: 10.1080/15226510802363444
- McGonigle, T., Miller, M., Evans, D., Fairchild, G., y Swan, J. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 115(3), 495–501. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
- Martins, S., Melloni, R., Melloni, E. (2017). Growth mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi and formation of mycorrhiza in soil contaminated by cadmium. *Scientia Agraria*, 18(3), 48-60. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/320694130_Growth_mycelium_of_arbuscular_mycorrhizal_fungi_and_formation_of_mycorrhiza_in_soil_contaminated_by_cadmium
- Meharg, A. (2018). The potential for utilizing mycorrhizal associations in soil bioremediation. En G. Gadd (Ed). *Fungi in Bioremediation* (pp 45–455). Dundee: Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511541780
- Minai, D y Herfatmanesh, A. (2007). Biodegradation of aliphatic and aromatic fractions of heavy crude oil-contaminated soil: A pilot study. *Bioremediation journal*, 11(2), 71-76. doi: 10.1080/10889860701351589
- Minai, D., Rohanifar, P., y Azami, S. (2015). Assessment of bioremediation of aliphatic, aromatic, resin, and asphaltene fractions of oil-sludge-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(4), 1253–1260. doi: 10.1007/s13762-014-0720-y
- Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana. (2015). El caso Chevron/ Texaco en Ecuador. Una lucha por la justicia ambiental y social. Recuperado de <https://www.cancilleria.gob.ec/wp-content/uploads/2015/06/Expediente-Caso-Chevron-abril-2015.pdf>
- Miransari, M. (2010). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant biology*, 12(4), 563–569. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00308.x

- Montoya, S., y Páez, C. (2012). *Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales*. Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda, Colombia.
- Noori, A., Maivan, H., y Alaie, E. (2014). Leucanthemum Vulgare Lam. Germination, Growth and Mycorrhizal Symbiosis Under Crude Oil Contamination. *International Journal of Phytoremediation*, 16(9), 962–970. doi: 10.1080/15226514.2013.810577
- Nwoko, C. (2014). Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi on the physiological performance of *Phaseolus vulgaris* grown under crude oil contaminated soil. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 2(2), 9–14. doi: 10.4236/gep.2014.24002
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mader, P., Boller, T., y Wiemken, A. (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2816–2824. doi: 10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003
- Ortíz, J., García, M. (2003). Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería*, 351, 41–45. Recuperado de https://www.academia.edu/22555802/Biomarcadores_y_su_utilidad_en_la_evaluaci%C3%B3n_de_la_biodegradaci%C3%B3n_del_petr%C3%B3leo
- Pacheco, M. (14 de mayo de 2018). USD 112 millones invertirá Petroamazonas en bienes y servicios en la Amazonía. *Diario El Comercio*. Recuperado de <http://www.elcomercio.com/actualidad/millones-inversion-petroamazonas-contratacion-servicios.html>
- Pagano, M., Oehl, F., Silva, G., Maia, L., Silva, D., y Cabello, M. (2016). Advances in Arbuscular Mycorrhizal Taxonomy. En M. Pagano, *Recent Advances on Mycorrhizal Fungi* (pp. 15–22). doi: 10.1007/978-3-319-24355-9
- Panigrahi, S., Velraj, P., y Subba, T. (2019). Functional microbial diversity in contaminated environment and application in bioremediation. En S. Das y H. Ranjan (Eds.). *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp 359-385). Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00021-6

- Paudyn, K., Rutter, A., Kerry, R., y Poland, J. (2008). Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. *Cold Regions Science and Technology*, 53(1), 102–114. doi: 10.1016/j.coldregions.2007.07.006
- Petroamazonas EP. (2018). Petroamazonas EP Proyecto Amazonía Viva, de Petroamazonas EP, alcanza un millón de metros cúbicos de suelo remediado. Recuperado de <https://www.petroamazonas.gob.ec/?p=7895>
- Pinchin, H., Williams, J., May, E., Mant, C., y Hodkinson, B. (2013). In Situ and microcosm investigations into the phytoremediation of hydrocarbon-contaminated lagoon sediments using *Phragmites australis*. *Journal of Environmental Engineering*, 139(4), 488–495. doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000591
- Pineda, R. (2004). Presencia de hongos micorrízicos arbusculares y contribución de *Glomus intraradices* en la absorción y translocación de cinc y cobre en girasol (*Helianthus annuus* L.) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina (Disertación de Tesis doctoral). Universidad de Colima, México.
- Plouznikoff, K., Declerck, S., y Calonne, M. (2016). Mitigating abiotic stresses in crop plants by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. En C. Vos y K. Kazan (Eds.), *Belowground Defence Strategies in Plants* (pp. 341–400). Switzerland: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-42319-7
- Rajtor, M., y Piotrowska, Z. (2016). Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. *Chemosphere*, 162, 105–116. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.071
- Roy, S., Hens, D., Biswas, D., Biswas, D., y Kumar, R. (2002). Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World Journal of Microbiology y Biotechnology*, 18(6), 575–581. doi: 10.1023/A:1016362819746
- Sajna, K., Sukumaran, R., Gottumukkala, L., y Pandey, A. (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology*, 191. doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.126
- Salzer, P., Corbiere, Á., y Boller, T. (1999). Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago*

- truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*, 208(3), 319–325. doi: 10.1007/s004250050565
- Sánchez, J. (2015). *Introducción a la estadística en las ciencias biológicas*. Publicidad Giro. Quito, Ecuador.
- Seklemova, E., Pavlova, A y Kovacheva, K. (2001). Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradatio*, 12(5), 311-316. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1014356223118>
- Shan, B., Zhang, Y., Cao, Q., Kang, Z., Li, S. (2014). Growth responses of six leguminous plants adaptable in Northern Shaanxi to petroleum contaminated soil. *Environmental Science*, 35(3), 1125-1130. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24881406>
- Sharma, B., Dangi, A., y Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management*, 210, 10–22. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.12.075
- Smith, F., Smith, S., St John, B., Nicholas. D. (1985). Inflow of N and P into roots of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. En V. Gianinazzi y S. Gianinazzi (Eds.). *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (pp. 371–375). Paris, Francia: Editorial INRA.
- Smith, S., y Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Elsevier. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/book/9780123705266/mycorrhizal-symbiosis>
- Snellgrove, R., Splittstoesser, W., Stribley, D., y Tinker, P. (1982). The distribution of carbon and the demand of the fungal symbiont in leek plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, 92(1), 75–87. doi: 10.1111/j.1469-8137.1982.tb03364.x
- Son, C., y Smith, S. (1988). Mycorrhizal growth responses: interactions between photon irradiance and phosphorus nutrition. *New Phytologist*, 108(3), 305–314. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb04167.x
- Srivastava, J., Naraian, R., Kalra, S., y Chandra, H. (2014). Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 1787–1800. doi: 10.1007/s13762-013-0412-z

- Stribley, D., y Read, D. (1980). The biology of mycorrhiza in the Ericaceae: VII. The relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen sources. *New Phytologist*, 86(4), 365–371. doi: 10.1111/j.1469-8137.1980.tb01677.x
- Symanczik, S. (2016). *Arbuscular mycorrhizal (AM) fungal diversity of arid lands: From AM fungal species to AM fungal communities* (Tesis doctoral). Universidad de Basel, Suiza.
- Thompson, J y Wildermuth, G. (1989). Colonization of crop and pasture species with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a negative correlation with root infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Canadian Journal of Botany*, 67(3). Recuperado de: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/b89-092#.XJ-zdFVKjIU>
- Valentine, A., Mortimer, P., Kleinert, A., Kang, Y., Benedito, V. (2013). Carbon Metabolism and Costs of Arbuscular Mycorrhizal Associations to Host Roots. En R. Aroca (Ed.). *Symbiotic Endophytes* (233-252). doi: 10.1007/978-3-642-39317-4_12
- Varjani, S., y Upasani, V. (2013). Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2(10), 5377–5383. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/8f6b/839cb6d2390501f5224c558815984a7b9fc8.pdf>
- Varjani, S., Rana, D., Jain, A., Bateja, S., y Upasani, V. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat , India. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 103, 116–124. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.03.030
- Varjani, S. J., y Upasani, V. N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, 222, 195–201. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.006
- Varjani, S. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.037
- Venton, J. (2018). Gas Chromatography (GC) with Flame-Ionization Detection. JoVE, Cambridge Science Education Database. Recuperado de:

<https://www.jove.com/science-education/10187/gas-chromatography-gc-with-flame-ionization-detection>

- Verdin, A., Lounès-Hadj, A., Fontaine, J., Grandmougin, A., y Durand, R. (2006). Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza*, 16(6), 397–405. doi: 10.1007/s00572-006-0055-8
- Walker, C. (2005). A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-inhabiting fungi. *Inoculum* 56(4), 68–69. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/230752393_A_simple_blue_staining_technique_for_arbuscular_mycorrhizal_and_other_root-inhabiting_fungi
- Wang, S., Xu, Y., Lin, Z., Zhang, J., Norbu, N., y Liu, W. (2017). The harm of petroleum-polluted soil and its remediation research. *AIP Conference Proceedings*, 1864(1). doi: 10.1063/1.4993039
- Widdel, F., y Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Environmental biotechnology*, 12(3), 259–276. doi: 10.1016/S0958-1669(00)00209-3
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, T., y Rabus, R. (2016). Metabolism of hydrocarbons in n - Alkane-utilizing anaerobic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26, 138–151. doi: 10.1159/000442160
- Xu, Y. y Lu, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), 395-401. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.07.038
- Xun, F., Xie, B., Liu, S., y Guo, C. (2015). Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 598–608. doi: 10.1007/s11356-014-3396-4
- Zhu, H., Liu K., Yang X., Liu, Q. (2013). Sedimentary controls on the sequence stratigraphic architecture in intracratonic basins: an example from the Lower Permian Shanxi

Formation, Ordos Basin, Northern China. *Marine and Petroleum Geology*, 45, 42-54.
doi: 10.1016/j.marpetgeo.2013.04.017

ANEXOS

ANEXO 1. Formulaciones de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de bacterias, hongos y actinomicetos.

BHI- Medio deshidratado marca BD Difco ® Lote 0320200

Agar Caseína- Almidón

Componente	Gramos/ Litro
Almidón soluble	10
Caseína	0.3
KNO ₃	2
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.05
K ₂ HPO ₄	2
NaCl	2
CaCO ₃	0.02
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01
Agar	18

Tomado de Aryal, S. (2016). Starch Casein Agar (SCA)- Composition, Principle, Uses, Preparation and Result interpretation. Recuperado de <https://microbiologyinfo.com/starch-casein-agar-sca-composition-principle-uses-preparation-and-result-interpretation/>

Agar Rosa de Bengala

Componente	Gramos/ Litro
Polipeptona	5
Glucosa	10
Sulfato de magnesio	0.5
Fosfato potásico	1
Rosa de Bengala	0.06
Cloranfenicol	0.20
Agar	15

Tomado de MicroKit. (2013). Rosa Bengala Cloranfenicol Agar. Recuperado de https://www.microkit.es/distribuidores-microkit/pdf/microkit39_es.pdf