

MICROANÁLISIS DE UNA CEPA DE *Aspergillus niger* BIOCATALIZADORA DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS HPA

J. Araujo-Blanco^{a*}, Y. Rojas^a, B. Depool^a, A. Antequera^a, J. Rodríguez^a, F. Yegres^a

^aUniversidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Unidad de Microbiología Ambiental, Unidad de Microscopía Electrónica (UNEFM) Cod. Postal 4101.

*Autor de Correspondencia, José Amable Araujo Blanco, Jefe de la Unidad de Microscopía Electrónica UNEFM, E-mail: jaab19@gmail.com; josearaujo@correo.unefm.edu.ve Tlf:+58-268-4606908

Recibido: Aprobado: Marzo 2016.

Publicado: Junio 2016.

RESUMEN

Los hongos de la especie *Aspergillus niger* exhiben una serie de propiedades que pueden ser aprovechadas desde la biotecnología. En la actualidad estas propiedades son utilizadas para la mico-remediación de espacios contaminados por compuestos recalcitrantes como los hidrocarburos, en especial la fracción aromática la cual es la de mayor interés ambiental. Se aisló una cepa de *A. niger* a partir de muestras de La Bahía de Amuay la cual fue seleccionada en medios suplementados con antraceno como representante de los HPA a 400 ppm, probada en un ensayo de factibilidad en medios de cultivos y aplicando ensayos de tratabilidad en muestras de agua de La Bahía por medio de Biorremediación *in vitro*. La cepa fue identificada macroscópicamente mediante cultivos en placa de Petri y microscópicamente por el método de cámara húmeda, los diversos cuerpos fructíferos fueron analizados mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). La cepa evaluada presentó una alta capacidad de eficiencia de remoción 75% en el ensayo de factibilidad y logró remover el 100% de los hidrocarburos en el ensayo de tratabilidad. El análisis morfoestructural mostró características distintivas de la especie en las hifas y las diversas partes de los cuerpos fructíferos. Los conidios presentaron cambios que proponen una modificación morfológica celular de la spora asexual frente a un ambiente adverso con contaminantes de interés ambiental como los HPA.

Palabras Claves: *Aspergillus niger*, Hidrocarburos, Bahía de Amuay

MICROANALYSIS OF A STRAIN *Aspergillus niger* CATALYZING POLYCYCLIC HYDROCARBONS AROMATICS HPA

ABSTRACT

Fungi of the species *Aspergillus niger* exhibit a number of properties that can be exploited from biotechnology. Nowadays these properties are used for the mico-remediation of contaminated recalcitrant compounds such as hydrocarbons, specially aromatic moiety spaces which is the largest environmental interest. strain of *A. niger* was isolated from samples of Bay Amuay which was selected in media supplemented with anthracene as a representative of the HPA 400 ppm, tested on a test feasibility in culture media and applying treatability tests in samples of water from the bay through Biorremediation *in vitro*. The strain was identified macroscopically using Petri dish cultures and microscopically by wet chamber method, the various fruiting bodies were analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The strain evaluated presented high capacity of 75% removal efficiency in achievement test feasibility and remove 100% of the hydrocarbons in the treatability test. Morphostructural analysis showed the distinctive characteristics of the species in the hyphae and the various parts of fruiting bodies. The proposed changes conidia presented a cellular morphological modification of asexual spore against an adverse environment with contaminants of environmental interest as the HPA.

Keyword: *Aspergillus niger*, Hydrocarbons, Amuay Bay.

INTRODUCCIÓN

La Bahía de Amuay es un espacio geográfico marino costero donde es posible aislar cepas de hongos que metabolizan hidrocarburos debido a su capacidad inducida

de la exposición con este tipo de compuestos por la actividad petrolera de la zona. Estudios sobre el tema sugieren que hongos del género *Aspergillus sp.* degradan

diversas fracciones del petróleo [1, 2, 3], en especial las pertenecientes a la especie *Aspergillus niger* quienes han mostrado ser versátiles en la degradación de la fracción aromática [1, 4, 5]. Esto se debe a la capacidad que posee en la colonización de diversos hábitats [6], lo que propone el interés ambiental de este hongo como un conspicuo agente natural controlador de compuestos xenobióticos, y recalitrantes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) en el agua, suelo y los bioaerosoles de zonas que históricamente presentan niveles de estos contaminantes de interés ambiental, como en el caso de La Bahía de Amuay, espacio cerúleo en donde es posible encontrar una microbiota que se encuentra adaptada y coopera para la búsqueda de un equilibrio frente a los cambios que se producen producto de la actividad antrópica. Este hecho natural puede mostrar un cambio en la óptica sobre el estudio de la micología hacia una visión de interés ambiental, poniendo de manifiesto el efecto de la micorremediación o uso de hongos microscópicos para la descontaminación de espacios ambientales, en la búsqueda de soluciones factibles de la descontaminación de espacios impactados por hidrocarburos. Es por ello que exploramos tecnologías de biorremediación ambiental con hongos microsporídicos como *A. niger*, que poseen un arsenal proteico enzimático capaz de generar una bioconversión de compuestos como los HPA [7]. Diversos estudios documentan que los hidrocarburos policíclicos aromáticos pueden ser removidos del agua [8, 9, 1] en un proceso carbonoclástico que incluye la ruptura del anillo aromático por enzimas fúngicas que permiten la asimilación es este tipo de carbono el cual es incorporado a la biomasa fúngica de este tipo de microorganismo [10].

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio.

La cepa fue aislada de muestras de agua colectadas en envases previamente esterilizados, tomadas en diez puntos equidistantes en un transepto de 9 km, en el lugar más cercano al área petrolera de La Bahía de Amuay (Figura 1). La ubicación georeferencial de la zona de estudio se encuentra en el cuadrante de 11° 45' N y 70° 13' O, en el lado Oeste de la Península de Paraguaná. Esta zona geográfica está clasificada como una Bahía abierta, con una estructura geomorfológica conformada por una planicie litoral con sistema de relieve de playa y terraza litoral y áreas de acantilados a los que les precede una zona completamente plana que genera una línea de costa cóncava, moldeada por el movimiento del mar, que presenta dos zonas de playa definidas, en la que se alternan especies botánicas de *Avicennia germinans* L. que generan parches ecológicos de manglares en crecimiento. De esta manera La Bahía de Amuay se constituye un accidente geográfico o porción de mar entre dos cabos, en la que existen obras de ingeniería portuaria petrolera como la refinería de Amuay y un área urbana donde se encuentra la población ancestral de pescadores de la que deriva el topónimo de la zona.

Aislamiento.

La especie *A. niger*, se aisló a partir de agua colectada en La Bahía de Amuay, en agar Czapek-Czapek Dox preparado en placa de Petri por triplicado a una concentración de K₂HPO₄ 1,0g; NaNO₃ 2,0g; KCl 0,5g; MgSO₄7H₂O 0,5g; FeSO₄7H₂O 0,001g; Agar 15,0g esterilizando a 121 °C a pH 5,5 [11], más cloranfenicol 0.4 g/L para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas, enriqueciendo los medios con 5% v/v de antraceno a 400 ppm diluido en *n*-hexano y otros utilizando 30g sacarosa como control positivo, y un grupo al que no se le adicionó fuente de carbono como control negativo.

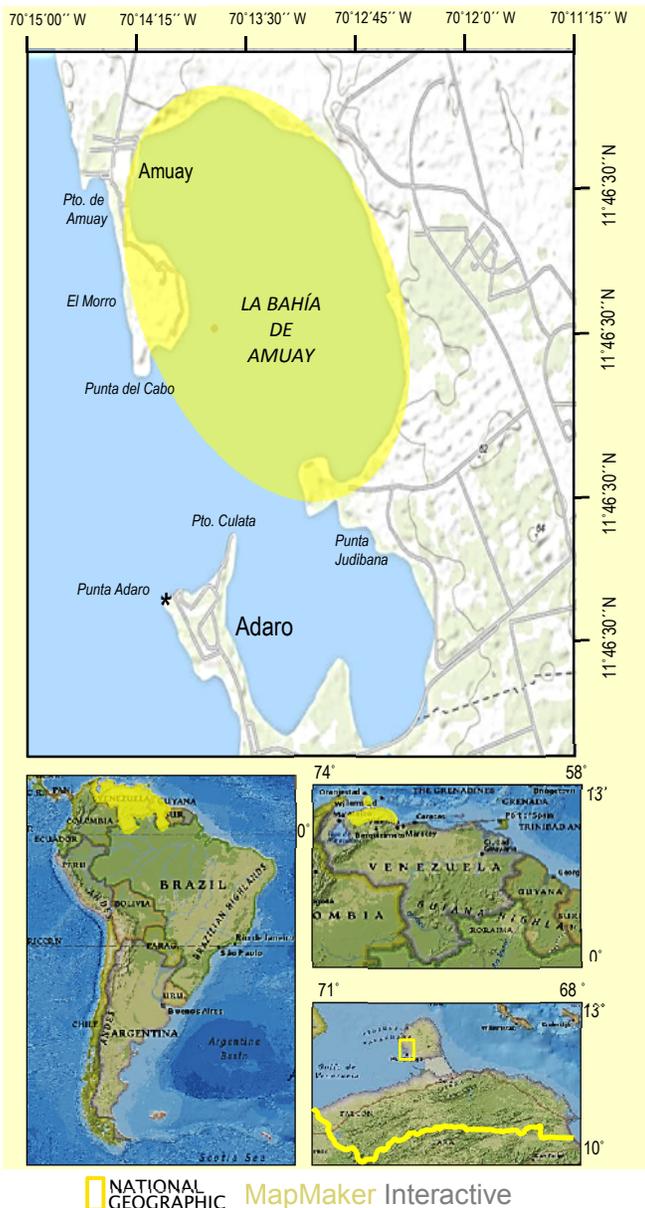


Fig. 1. Zona de estudio, La Bahía de Amuay, Península de Paraguaná estado Falcón. Foto-georreferenciación tomada de: <http://mapmaker.nationalgeographic.org/>, Modificado en ArcGIS Online, esri © <https://www.arcgis.com/home/> consultado 01/10/2015.

Ensayo de Factibilidad.

El ensayo de factibilidad consistió en la evaluación de la cepa para determinar su capacidad de remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos en medios de cultivo líquido. El experimento se realizó en dos grupos con el motivo de evaluar la biomasa y los (HPA) en las mismas condiciones experimentales. Para ello se

propagaron esporas en medio Sabouraud utilizando botellas de vidrio de 125 mL de forma inclinada, e incubados a 30°C por 10 días [12]. Cada envase fue sembrado por el método de estría con asa de platino. De la cepa se colectaron esporas en una solución salina estéril al 0,9 % con un factor de dilución de 10x, posteriormente se contó la concentración de esporas en un microscopio óptico, aplicando el método en cámara de Neubauer [13], el inoculo se ajustó a $1,5 \times 10^6$ esporas/ μ L. Fueron creados microambientes en tubos de ensayo con tapa rosca de 16x150 mm con capacidad de 20 mL para la evaluación de la unidades experimentales, estos fueron preparados con 10 mL de medio de cultivo líquido Czapek-Czapek Dox enriquecido, preparado a una concentración por litro de solución de: K_2HPO_4 1g; $NaNO_3$ 2g; KCl 0,5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 g/L más la adición de cloranfenicol como antibiótico a una concentración de 0,4 g/L [11], ajustando a pH 5,5 con una solución de HCl 1M previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Colocando 5% v/v de antraceno a 400 ppm preparado a partir de un compuesto de 98% de pureza disuelto en *n*-hexano, como fuente de carbono. Cada medio previamente preparado fue inoculado con un 5% de esporas previamente cuantificadas a una concentración de $1,5 \times 10^6$ esporas/ μ L, de igual manera se probaron dos controles positivos con 30g de sacarosa; glucosa y un control negativo sin fuente de carbono. Este proceso se realizó en dos grupos por triplicado, un grupo para realizar el análisis de la biomasa y otro para la determinación de análisis físico-químico HPA. Ambos grupos de unidades experimentales fueron incubadas a 30 °C con agitación a 150 rpm. Los dos grupos ensayados para el análisis físico-químico HPA y la medición de la biomasa fueron evaluados en periodos de tiempo de 0, 15, 30, 90 días simultáneamente. El primer grupo fue evaluado mediante la técnica de peso seco y el segundo grupo, fue analizado por el método normalizado EPA [14]. Los resultados obtenidos fueron determinados como perfil del crecimiento realizando gráficos [15]. La eficiencia de

remoción se evaluó por el consumo del sustrato calculando el (%) de degradación [16].

Ensayo de Tratabilidad.

En este ensayo se evaluó la remoción de las concentraciones de HPA previamente determinadas en muestras de agua de La Bahía de Amuay utilizando la cepa previamente evaluada en el ensayo de factibilidad. Para esto se sometió los HPA contenidos en el agua de La Bahía de Amuay con el inóculo de la cepa a una concentración de 2×10^6 esporas/ μ L seleccionada a un ensayo de bioaumentación, manteniendo una proporción fija de concentración de N/P de 1 mL/L Fertimax® con un flujo constante de aire. Dividido en dos grupos uno para los análisis microbiológicos y otro para los análisis de HPA con sus respectivos controles negativos [17]. La biomasa fue evaluada por peso seco [15]. Y los HPA por el método normalizado por la EPA [14].

Caracterización por macromorfología en placa de Petri y microanálisis por microscopía óptica y microscopía electrónica de Barrido (MEB).

La caracterización de hongos de la especie *Aspergillus niger*, se realizó mediante la macromorfología del cultivo en placa de Petri y micromorfología por microscopía óptica con un microscopio óptico trinocular, marca Nikon modelo FX-35DX y microscopía electrónica de Barrido (MEB), con un microscopio marca FEI modelo Quanta. Para ello se aislaron cultivos seleccionados en medios enriquecidos, aplicando la técnica de siembra en placa [11] en medios de cultivo propuestos para la identificación de hongos del género *Aspergillus* [18], el cual consistió en el uso de tres medios de cultivo y dos temperaturas de incubación durante siete días [19] a los cuales se les evaluó las características macroscópicas de borde, elevación, color y forma del cultivo en placa [20].

Para la evaluación de las características microscópicas, se aplicó el método de microcultivo en cámara húmeda [21, 22]. Posteriormente se realizaron tinciones simples y azul

de toluidina [11] las muestras obtenidas fueron observadas por microscopía óptica. Los diversos cuerpos fructíferos fueron evaluados según los caracteres morfológicos propuestos por la revisión para la identificación de la especie [20]. La cepa probada en los diferentes ensayos fue caracterizada e identificada por microscopía electrónica de Barrido con un microscopio FEI en modo ambiental a 15.00 kV. Se evaluó la morfometría del hongo aplicando herramientas digitales del software FEI Quanta para la medición del tamaño de los cuerpos fructíferos y las esporas.

Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos del perfil de crecimiento fueron, sometidos a una prueba de varianza, se consideraron las diferencias significativas cuando el valor de $p < 0,05$ para los datos estudiados, aplicando el test de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento.

La metodología aplicada con medios Czapek-Czapek Dox permitió aislar y caracterizar tres cepas de interés, dos de *Aspergillus flavus* y una de *Aspergillus niger*, esta última fue seleccionada para esta publicación. Obteniendo así hongos autóctonos de La Bahía de Amuay a partir de muestras de agua, componente del que es posible aislar microorganismos del género *Aspergillus* similar a lo propuesto por trabajos [8, 9]. Los hongos de la especie de interés fueron aislados de medios enriquecidos a una alta concentración de hidrocarburos (400 ppm) [23], adaptadas para la evaluación de la degradación de HPA. De igual manera los controles positivos mostraron crecimientos esperados en los medios con sacarosa y los controles negativos no presentaron crecimiento observables en las placas de Petri.

Evaluación del Ensayo Factibilidad:

La comparación de los diversos tratamientos aplicados para la evaluación del perfil de crecimiento de la cepa *A. niger* A1H123An por peso seco (Figura 2), mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en los diferentes tratamientos, con máximos crecimientos en los controles positivos con glucosa (C+GLU) y sacarosa (C+SAC) y mínimos o casi nulos en los controles negativos (C). De igual manera en las unidades experimentales donde la fuente de carbono fue HPA (C+H), presentaron una elevación constante de la biomasa.

La activación del metabolismo desde procesos catabólicos que liberen energía aprovechable por los procesos anabólicos del sistema, evidencia el uso de compuestos hidrocarbonados como base para el desarrollo de la biomasa de los hongos filamentosos o miceliales como *Aspergillus niger*, quien puede aprovechar su capacidad enzimática para la catálisis de compuestos como los HPA, como una fuente de carbono y energía, de esta manera estos compuestos complejos y tóxicos para el ambiente son degradados a compuestos más simples y aprovechables por las rutas metabólicas fúngicas [24, 25].

Los tratamientos presentaron valores de aumento en la biomasa, los cuales incorporaron carbono disponible del medio proporcionados en forma de HPA, con comportamiento similares a los controles positivos. Esto es posible dado que *Aspergillus niger* posee un conjunto de oxidasas que le permiten la transformación de compuestos aromáticos como los HPA presentes en los hidrocarburos con un crecimiento proporcional durante todo el ensayo, similar a lo descrito por otros autores [1, 26]. Las cepas evaluadas en el grupo para el análisis físico-químico HPA presentaron una disminución de la concentración de HPA en el tiempo de un 70% de remoción.

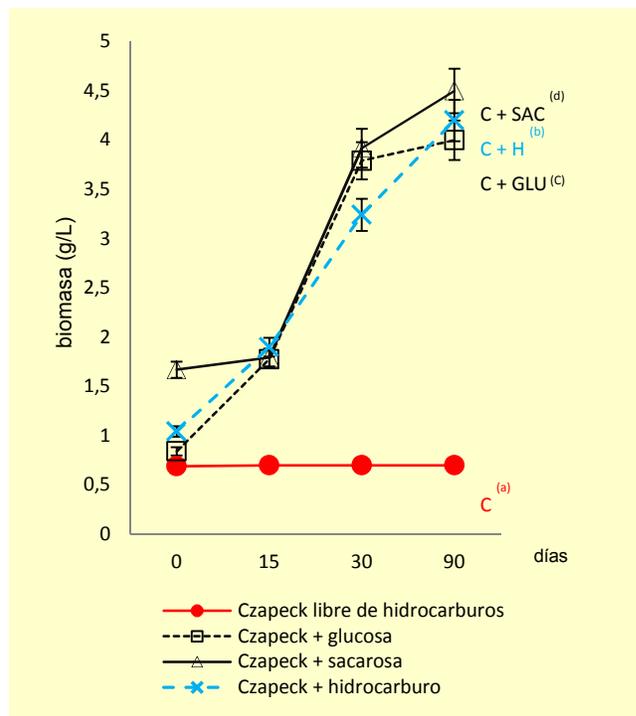


Fig. 2. Promedio aritmético de la biomasa de *Aspergillus niger* cepa A1H123An evaluada en ensayo de factibilidad medido en (g/L). Czapeck libre de hidrocarburos (C); Czapeck + glucosa (C+GLU); Czapeck + sacarosa (C+SAC); Czapeck + hidrocarburo (C+H); Las letras distintas (a), (b), (c), (d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en análisis de varianza.

La cepa evaluada mostró ser capaz de aumentar su biomasa al mismo tiempo que presentó un porcentaje alto de disminución de la concentración de hidrocarburos, esto es consistente con revisiones sobre el tema donde se consideran buenas capacidades de remoción de hidrocarburos para *Aspergillus niger* para compuestos como los hidrocarburos policíclicos aromático HPA [4, 5] donde existe una influencia del tiempo para el aumento de la capacidad de adaptación y uso de los HPA como fuente de carbono con un consecuente aumento de la biomasa [1, 7, 8].

Evaluación del Ensayo de Tratabilidad.

El ensayo de tratabilidad (Figura 3) permitió evaluar la capacidad de la cepa de *Aspergillus niger* mediante el diseño experimental de biorremediación del agua *ex situ*. Se observó un aumento de la biomasa y una disminución

total del compuesto con un aporte proporcional de fertilización y aireación.

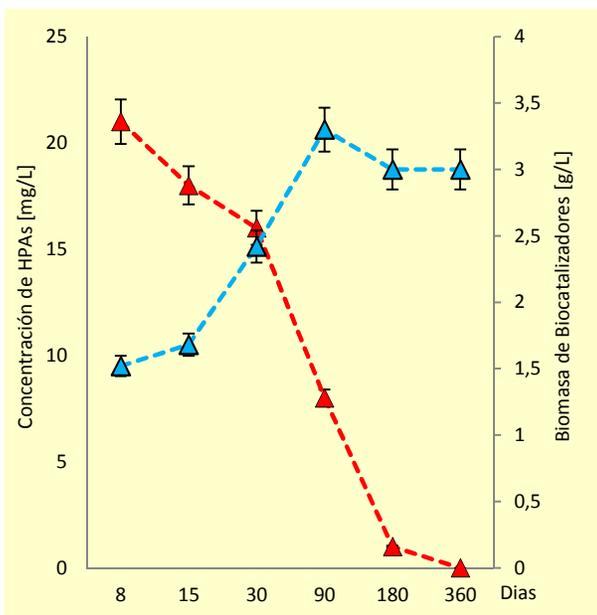


Fig. 3. Promedio aritmético de la biomasa de *Aspergillus niger* cepa A1H123An evaluada en ensayo de Tratabilidad medido en (mg/L).

Varios trabajos proponen porcentajes superiores al 50% utilizando esquemas similares [3, 27, 28, 29, 30] pero en periodos de tiempos variables en los que no se elimina el total del compuesto de la matriz de estudio, sin embargo la actividad asimilatoria del hongo presenta capacidad para remover el 100% de los HPA presentes en el agua colectada de La Bahía de Amuay.

Diversos estudios demuestran que la especie de estudio tiene capacidad de degradar con facilidad hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) [5, 31] además de ser un microorganismo de elección para el desarrollo de procesos químicos industriales lo que la clasifica como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) por su gran capacidad enzimática [4]. El uso del carbono proveniente de los HPA es producto de la escisión del anillo aromático el cual es usado como fuente de carbono disminuyendo su presencia dentro de los microcosmos evaluados y su disminución es equivalente a la descontaminación de matrices como el agua que puede ser vehículo de este tipo de contaminante de interés ambiental [32].

Caracterización de cepas de Aspergillus niger por macromorfología en placa de Petri y microanálisis por microscopía óptica y microscopía electrónica de Barrido (MEB).

El asilamiento permitió obtener cepas caracterizadas e identificadas como *Aspergillus niger*, las placas de Petri (Figura 4c) mostraron colonias con bordes ramificados, micelio elevado, color negro y forma algodonosa con aspectos típicos de la especie evaluados en placa de Petri en medio Czpeck [11, 33]. Las diversas colonias se agruparon en la cepa A1H123An cuya característica principal observable fue poseer color negro [20] con textura granular y una faz incolora o color crema. Los medios aplicados para la caracterización por el sistema de identificación [18, 19] permitieron aislar la cepa mitospórica de *Aspergillus niger* similar a los teleomorfos la cual se basa en las diferencias morfológicas y características culturales o de cultivo [6]. Todos los hongos aislados caracterizados e identificados presentaron un símil con los caracteres morfológicos clásicos aun utilizados [18, 6, 34, 35] y los propuestos en otras revisiones [20, 33] así como en las guías de identificación morfológica y claves taxonómicas actualizadas [6, 19].

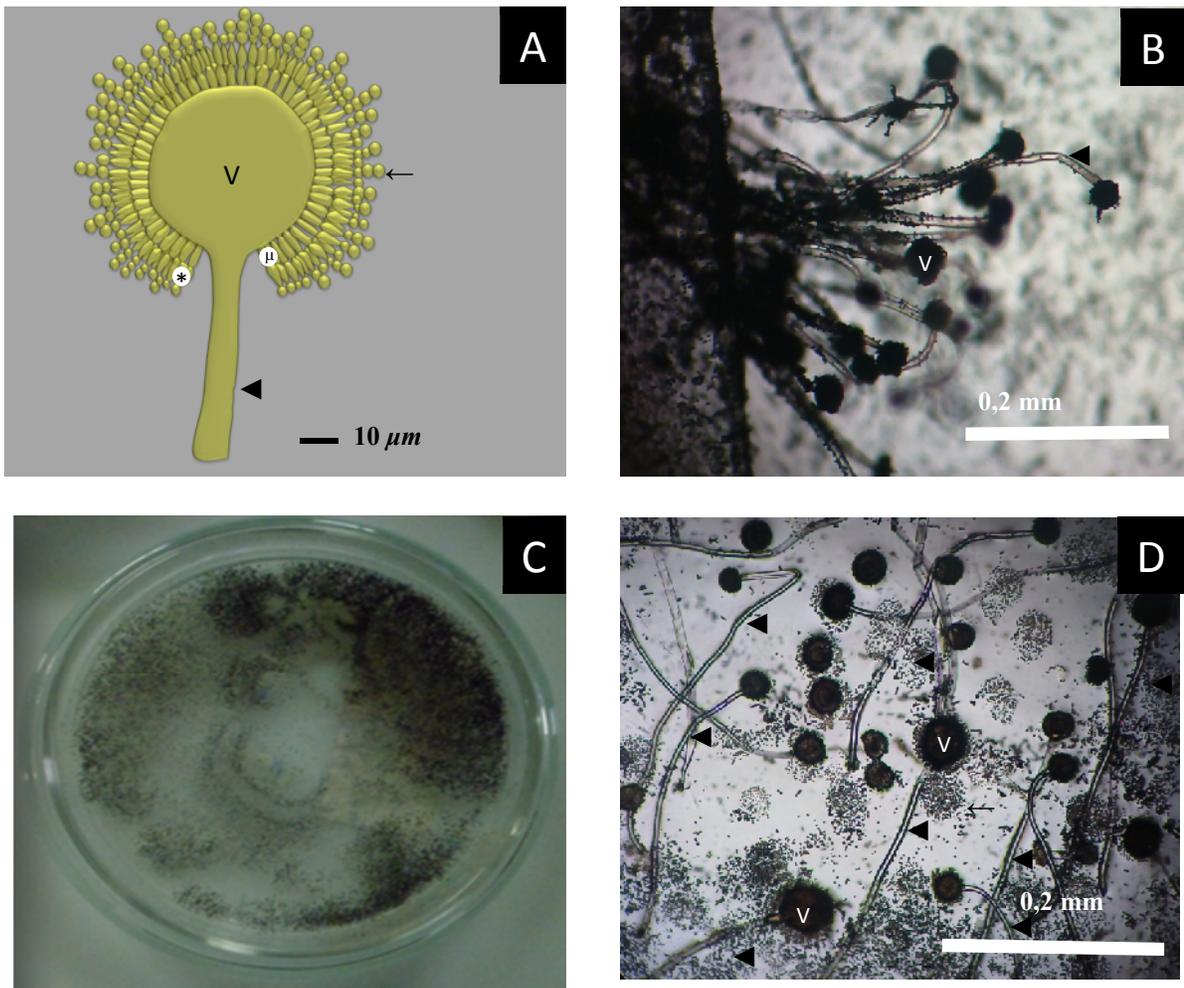


Fig. 4. Cepa de *Aspergillus niger*: **(A)** Idiotipo, **(B)** Micrografía de cuerpos fructíferos a 40X, micromarca (—) 0,2 mm **(C)**. Fotografía de placa Petri con cepa crecida en medio Czapeck modificando la fuente de carbono a 400 ppm. **(D)** Micrografía de cuerpos fructíferos dispersos a 40X micromarca (—) 0,2 mm: Vesícula (V), Fíalide (*), Métula (μ), Estípe (▼), Conidios o esporas asexuales (←).

Los diversos cuerpos fructíferos de las cepas aisladas (Figura 4a) presentaron conidióforos característicos de *Aspergillus* que incluyen aparatos conidianos los cuales parten de las hifas ordinarias del micelio, desarrolladas en el extremo libre de los pedicelos con tres zonas bien definidas [36, 37], la primera es la célula pie la cual une al cuerpo fructífero con el micelio, que puede o no estar separada con un septo [38], la segunda es el estípe (▼), esta es una sección de la estructura con forma cilíndrica y alargada que proyecta al micelio reproductor fuera del micelio vegetativo [6, 19] en forma aérea con geotropismo negativo. La tercera es la vesícula (V), que se desarrolla en el extremo apical o ápice con forma

esférica, hemisférica y a veces oval, globosa, subglobosa o elipsoidal [20] además toda la estructura del conidióforo puede poseer o no una doble pared la cual es característica distintiva entre especies [6, 19]. Sobre la vesícula se dispusieron células conidiogénicas denominadas comúnmente como fíalides (*) [39], sin embargo en diversas especies entre la vésicula y las fíalides se desarrollan otras células denominadas métulas (μ) [36]. Las cabezas conidiales que presentan únicamente fíalides se caracterizan como uniseriadas mientras que si presentan métulas y fíalides son biseriadas [20, 39]. A partir de la vesícula, se desarrollaron numerosas células conidiogénicas, que por

un proceso de gemación dieron origen a esporas asexuales, los cuales produjeron rosarios o cadenas de conidias o conidios [34, 39]. Estructura por medio del cual el hongo se propaga y da origen a otros clones de la misma especie cuando consigue condiciones ambientales y de nutrientes favorables para su crecimiento. La evaluación de la cepa (A1H123An) permitió identificar la dentro de la especie *Aspergillus niger* Van Tieghem la cual presentó cabezuelas aspergilaes de color negro carbón o pardo negruzco de diversos tonos oscuros (Figura 4b, d), a partir del cual se describe las características microscópicas (Tabla 1) definidas para la especie *Aspergillus niger* Van Tieghem [33, 40]. Estas características son tomadas en cuenta en la clasificación de la sección Nigri; Niger o complejo de especies *A. niger*, que incluye diversos organismos dentro del taxón en el que se ilustran 132 especies dentro de 18 grupos [41] los cuales siguen basándose en caracteres morfológicos y fisiológicos para su distinción [20, 33, 42]. Las evaluaciones microscópicas evidenciaron un micelio vegetativo con hifas septadas, el micelio reproductor presentó cuerpos fructíferos donde casi todos los conidióforos arrancaron a partir de células pie o hifas sumergidas incoloras (Figura 4b) o amarillentas, con colores pardos en las proximidades de la vesícula [40]. Las texturas observables del conidióforo fueron lisas (Figura 4 d), con pared gruesa. Normalmente estas estructuras se rompen con facilidad hendiéndose longitudinalmente en lacinias, aunque no son tabicadas

algunas veces pueden presentar algún tabique delgado [34]. La longitud y grueso fue muy variable de unas estípes a otras, oscilando entre 400-2500 micras (Tabla 1) [33]. Las vesículas del conidióforo (Tabla 1) presentaron pared gruesa, con formas redondas, globosas o subglobosas [43], de 30-75 micras (Figura 4B, D) sin embargo estas pueden llegar hasta las 100 micras de diámetro [33]. Sobre estas estructura con un centro globoso esférico se desarrollaron radialmente métulas y fiálides como esterígmás que en las colonias jóvenes se presentaron como pequeñas cabezuelas reducidas a una serie (uniseriadas) [6, 20, 39]. Sin embargo corrientemente se observaron dos series (biseridas), casi siempre de color pardo negruzco, a veces incoloros; los de la primera serie o métulas se encontraron apretados y midieron entre 12-20 micras por 3-6 micras de diámetro; y los de la segunda serie o fiálides, más flojos, midieron 7-10 micras por 3-4 de diámetro (Tabla 1) [6, 19].

Posterior a estas estructuras se escinden en columnas radiales cadenas conidiales de conidios o conidias que se desarrollaron como esporas asexuales con tamaños evaluados al microscopio óptico de 3-4,3 micras de forma globosa, sub esféricas de color hialino a café [33, 35, 39] *Aspergillus niger* no es un patógeno humano significativo ya que solo se ha reportado ser capaz de producir reacciones alérgicas, aunque esta especie es capaz de producir varias micotoxinas, sin embargo, la producción de micotoxinas parece ser controlada por las condiciones de fermentación [11].

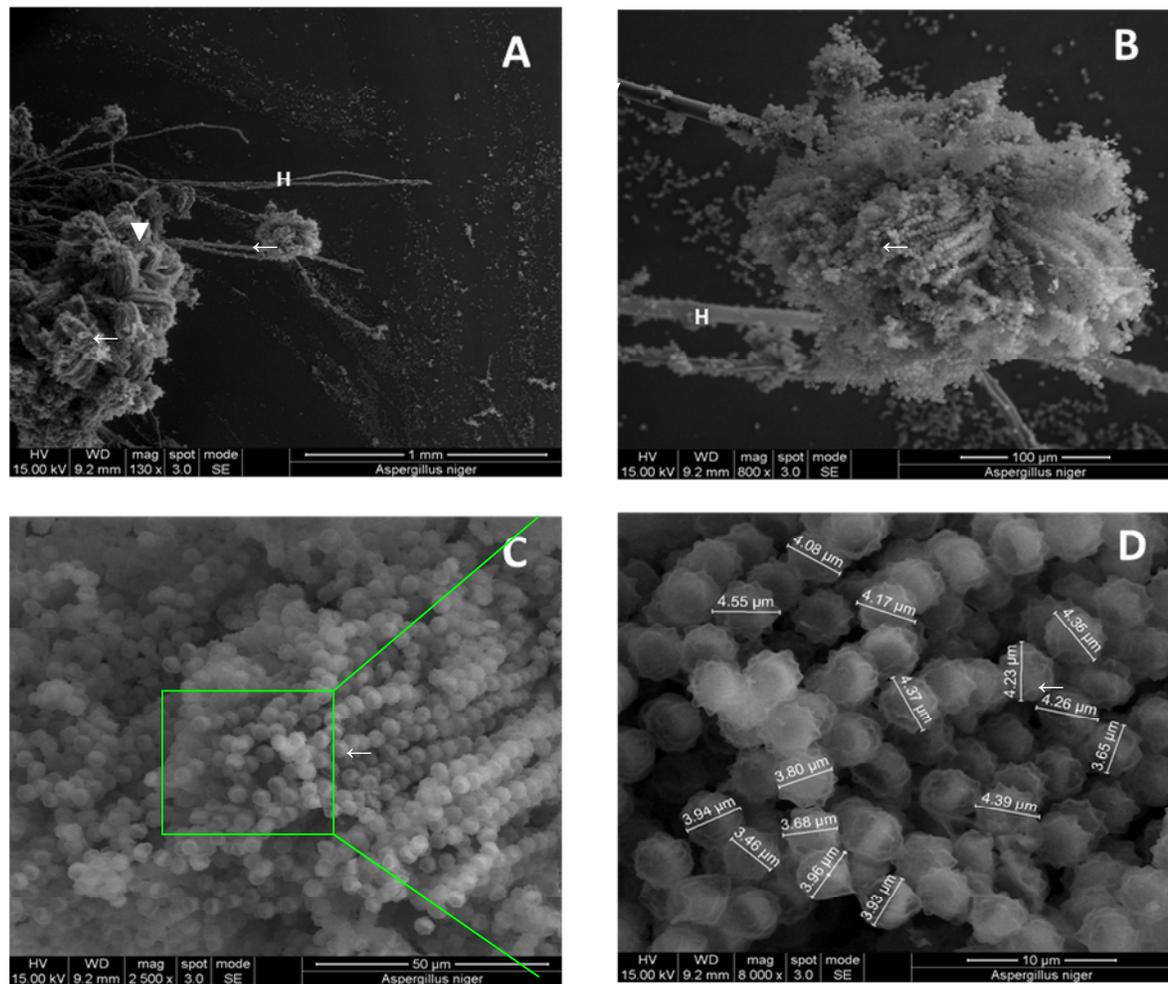


Fig. 5. Microanálisis de cepa de *Aspergillus niger*. (A) Micrografía de cuerpo fructífero, (B) Micrografía de cabeza conidial o conidióforo, (C). Micrografías racimos conidiales, (D). Micrografía de conidios o esporas asexuales: H= Hifa, Estipe (▼), Conidios o esporas asexuales (←).

Tabla 1. Diámetro de colonias y dimensiones estructurales de las especies del género *Aspergillus* del Phylum Ascomycota del orden Eurotiales caracterizadas.

Característica	<i>A. niger</i>
Estipe (longitud, μm)	400-2500
Vesícula (ancho, μm)	30-75
Métula (longitud x ancho, μm)	12- 20x3-6
Fiálides (longitud x ancho, μm)	7-10x3-4
Conidios (ancho, μm)	3-4,55

El análisis por microscopía electrónica mostró diversas estructuras típicas del cuerpo fructífero de la especie *Aspergillus niger* (Figura 5A) en el que fue posible identificar hifas y cabezas conidiales en concordancia

con los caracteres propuestos para la especie [6, 20], de igual manera fue posible evidenciar columnas de esporas o conidios asexuales [33]. En la figura 5b se evidencia con mayor detalle la naturaleza cenocítica de las hifas, la presencia de estipes como parte de la célula conidiogénica, a 2500X (Figura 5C) se identificó el conjunto de conidios que forman cadenas abundantes como racimos de esporas o rizos conidiales desde la vesícula del conidióforo. También es posible detectar en la parte superior de la micrografía como grupos de esporas aisladas que se separan de las cadenas o en el plano contraste detrás de la estructura del cuerpo fructífero, la cual es la base de la dispersión de este tipo de hongo, utilizando estas esporas que son transportadas

por el aire hacia otros componentes como el suelo y el agua.

Se identificó (Figura 5D) la naturaleza de los conidios con forma globosa, una textura rugosa y ornamentación espinulosa [20, 35], las proyecciones con pigmento depositado en los tubérculos o espinas entre las capas de tegumento es propio de una espora verrucosa característica propia *A. niger* [6, 33, 35, 39].

El uso de la herramienta morfométrica de cálculo micrográfico en plano de contraste del microscopio electrónico FEI Quanta [44] permitió evaluar los diversos tamaños de las esporas de la especie en estudio (Tabla 1), la media de las esporas analizadas fue de 4,06 μm con un mínimo de 3,46 μm y un nivel máximo de 4,55 μm (Tabla 2) [43]. Los diámetros máximos obtenidos son más grandes que los reportados para la especie en 3,5 micras [45] lo cual puede ser un indicio del reforzamiento de la pared fúngica frente al estrés sometido, o una posible modificación de una cepa adaptada al uso de HAP, de igual manera estas construyen una guarnición de reserva como agentes remediadores cuando de forma natural sea necesario, o la base para la extracción de enzimas capaces de degradar compuestos de interés ambiental como los HPA.

Tabla 2 Medidas de resumen de estadística descriptiva para la evaluación del diámetro en micras de conidios o esporas evaluadas por microscopía electrónica de barrido.

Media	D.E.	Mín	Máx
4,06	0,32	3,46	4,55

Desviación Estándar (D.E.), Valores Mínimos (Min), Valores Máximos (Máx).

CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez el microanálisis de una cepa identificada como *Aspergillus niger* Van Tieghem según sus caracteres distintivos macro y micro morfológicos,

obtenida del agua de La Bahía de Amuay. Los ensayos probados permitieron evidenciar la capacidad de biotransformar hidrocarburos en especial de HPA los cuales son contaminantes de interés medioambiental.

La especie resulta un agente efectivo para probar tecnologías de micorremediación ambiental, de hecho el microanálisis evidenció estrategias de adaptación que incluyen cambios en el yergue del tamaño de las esporas en presencia de este tipo de contaminante a concentraciones que alcanzan el zénit de la toxicidad, es por ello que se considera la importancia ambiental de este aislado fúngico como base para el uso de sus capacidades metabólicas en la descontaminación de ambientes como La Bahía de Amuay en búsqueda de la disminución de pasivos ambientales generados por la industria del petróleo utilizando microorganismos autóctonos.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores expresan agradecimiento al Instituto Zuliano de Tecnología INZIT y al Dr. Erick Plaza como director del Departamento de Microscopía Electrónica, por la colaboración prestada para el desarrollo de este proyecto enmarcado en la línea de investigación en bioremediación ambiental de la Unidad de Microbiología Ambiental y la Unidad de Microscopía Electrónica UNEFM.

REFERENCIAS

- [1] Pernía B., Demey J. R., Inojosa Y., Naranjo-Briceño L. (2012). "Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis" *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 3(1):1-40.
- [2] Salmanov M., Aliyeva S., Veliyev M., Bekrashi N. (2008) "The study of degradation ability of oil products and oil hydrocarbons by microscopic fungi isolated from polluted coastal areas of Absheron Peninsula of Caspian sea" *Ekoloji.* 17(68):59-64.

- [3] Ye J. S., Yin H., Qiang J., Peng H., Qin H. M., Zhang N., He B. Y. (2011) "Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*" *J. Hazard. Mater.* 185(1):174-181.
- [4] Cortés-Espinosa D.V., Absalón, Á.E. (2013) *Phenanthrene Removal from Soil by a Strain of Aspergillus niger Producing Manganese Peroxidase of Phanerochaete chrysosporium*, INTECH, Open Access Publisher, pp. 119-136.
- [5] Wunder T., Kremer S., Sterner O., Anke, H. (1994) "Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317" *Applied microbiology and biotechnology.* 42(4):636-641.
- [6] Samson, R.A., Varga, J. (2007). *Aspergillus systematics in the genomic era*. Utrecht The Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre. *Studies in Mycology.* 59:1- 210.
- [7] Mittal A., Singh P. (2009) "Studies on biodegradation of crude oil by *Aspergillus niger*" *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences.* 27(1):57-60.
- [8] Okoro, C.C. (2008). "Biodegradation of hydrocarbons in untreated produce water using pure fungal cultures" *Afr. J. Microbiol. Res.* 2:217-223.
- [9] Okoro C.C., Amund, O.O. (2010) "Biodegradation of produced water hydrocarbons by *Aspergillus fumigatus*" *Journal of American Science.* 6(3):143-149.
- [10] Leahy J.G., Colwell, R.R. (1990) "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment" *Microbiological reviews.* 54(3):305-315.
- [11] Casas R., *Micología General* (1994) Caracas-Venezuela: Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela, pp. 845.
- [12] Larone D.H., (2011) *Medically important fungi: a guide to identification.* American Society of Microbiology, pp. 485.
- [13] Vélez P., Posada F.J., Marín P., González M.T., Osorio E., Bustillo A.E. (1997) "Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos" *Boletín Técnico Cenicafé.* 17(1):37.
- [14] United States Environmental Protection Agency Office of Environmental Information, Emergency Planning and Community Right-to Know (2001) *Act – Section 313: Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category, EPA 260-B-01-03*, Washington, DC, pp. 40.
- [15] Rhodes P.M., Stanbury, P.F. (1997) *Applied microbial physiology.* IRL Press at Oxford University Press, pp. 270.
- [16] Eaton A.D., Franson M.A.H., APH Association, AWW Association. (2005) WE Federation. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, American Public Health Association, Washington, DC, USA*, pp. 1200.
- [17] Xu Y., Lu M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials.* 183(1):395-401.
- [18] Klich M.A., Pitt, J.I. (1988) *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs.* Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, pp. 184.
- [19] Klich M.A., (2002) *Identification of Common Aspergillus species.* Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelauteurs, pp. 116.
- [20] Abarca M.L., (2000) "Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial" *Rev. Iberoam. Micol.* 17(A):S79-S84.
- [21] Riddell R.W., (1950) "Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture" *Mycologia.* 42(2):265-270.

- [22] Gomes D., Cavalcanti M.A.Q., Fernandes M.J.S., Lima, D.M.M., Passavante, J.Z.O. (2008) "Filamentous fungi isolated from sand and water of "Bairro Novo" and "Casa Caiada" beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil" *Brazilian Journal of Biology*. 68(3):577-582.
- [23] Chávez-Gómez B., Quintero R., Esparza-García F., Mesta-Howard A.M., De la Serna, F.Z.D., Hernández-Rodríguez C. H., Rodríguez-Vázquez R. (2003) "Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith" *Bioresource Technology*. 89(2):177-183.
- [24] Aguilar C.N., Augur C., Favela-Torres E., Viniestra-González G. (2001) "Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid" *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26(5):296-302.
- [25] Torres N.V., (1994) "Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*: I. Model definition and stability of the steady state" *Biotechnology and Bioengineering*. 44(1):104-111.
- [26] Naranjo L., Urbina H., Sisto A.D., Leon, V. (2007) "Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil" *Biocatalysis and Biotransformation*. 25(2-4):341-349.
- [27] Acevedo F., Pizzul L., González M.E., Cea M., Gianfreda L., Diez M.C. (2010) "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from *Anthracophyllum discolor*" *Chemosphere*. 80(3):271-278.
- [28] Sánchez O., Ferrera I., Vigués Frantzen N., García de Oteyza T., Grimalt, J.O., Mas Gordi J. (2006) "Presence of opportunistic oil-degrading microorganisms operating at the initial steps of oil extraction and handling" *International Microbiology*. 9(2):119-124.
- [29] Guiraud P., Bonnet J. L., Boumendjel A., Kadri-Dakir M., Dusser M., Bohatier J., Steiman, R. (2008) "Involvement of *Tetrahymena pyriformis* and selected fungi in the elimination of anthracene, and toxicity assessment of the biotransformation products" *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 69(2):296-305.
- [30] Qiang, J., Yin, H., Peng, H., Ye, J. S., Qin, H. M., He, B. Y., & Zhang, N. (2009). "Isolation of an anthracene-degrading strain *Aspergillus fumigatus* A10 and its degradation characteristics" *Huan jing ke xue= Huanjing kexue/[bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui] Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui.* 30(5):1298-1305.
- [31] Bamforth S.M., Singleton, I. (2005) "Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions" *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80(7):723-736.
- [32] Różalska S., Szewczyk R., Długoński J. (2010) "Biodegradation of 4-n-nonylphenol by the non-ligninolytic filamentous fungus *Gliocephalotrichum simplex*: a proposal of a metabolic pathway" *Journal of Hazardous Materials*. 180(1):323-331.
- [33] Gautam, A.K., Bhadauria, R. (2012) "Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder" *African Journal of Biotechnology*. 11(104):16814-16823.
- [34] Loustau Gómez de Membrillera, J. (1951) "Clave determinativa de las especies del género *Aspergillus*" *Anales de la Universidad de Murcia*. 3:1-63.
- [35] Kozakiewicz Z., (1989) "Aspergillus species on stored products" *Mycological Papers*. 161:1-188.
- [36] Minter D., Hawksworth DL., Onions AHS., Kozakiewicz Z., (1985) *Descriptive terminology of the conidiogenous structures in Aspergillus and*

- Penicillium*, In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, S.R.y.J. Pitt, Editor. New York, Plenum Press, pp. 71-87.
- [37] Nithiyaa P., Nur Ain Izzati, M.Z., Umi Kalsom, Y., Salleh B. (2012) "Diversity and morphological characteristics of *Aspergillus* species and *Fusarium* species isolated from cornmeal in Malaysia" *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 35(1):103-116.
- [38] Eltem R., Askun T., Nermin S., Taskin E.O., Efendiler, H. (2004) "Colonial and morphological characteristics of some *Aspergillus* Fr.: Fr. species isolated from vineyards in Manisa and Izmir provinces (Turkey)" *Turk. J. Bot.* 28:287-298.
- [39] Cruz R., (2014) "Guía para el diagnóstico de laboratorio de enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos" *Revista Chilena de Infectología*. 31(2):173-179.
- [40] Vega A.S., Valdés L.F., Rendón A.C. (2012) "Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico" *Revista Universidad EAFIT*. 38(128):33-42.
- [41] Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijck, P. (2002) "On the safety of *Aspergillus niger* a review" *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59(4-5):426-435.
- [42] Wucherpennig T., Hestler T., Krull R. (2011) "Morphology engineering—osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity" *Microb Cell Fact.* 10(58):2-15.
- [43] Colin V.L., Baigorí M.D., Pera, L.M. (2013) "Tailoring fungal morphology of *Aspergillus niger* MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: biotechnological applications" *AMB Express*. 3(27):1-13.
- [44] FEI., (2008) *Standard Operating Procedure FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope*, FEI. COMPANY, pp. 25.
- [45] Fang T.H., Kang S.H., Hong Z.H., Wu, C.D. (2012) "Elasticity and nanomechanical response of *Aspergillus niger* spores using atomic force microscopy" *Micron*. 43(2):407-411.