



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Caracterización funcional de la comunidad bacteriana cultivable aislada del suelo de la zona de descarga de la fosa petrolera Bare-9. San Tomé. Edo. Anzoátegui**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO  
Presentado ante la Ilustre Universidad  
Central de Venezuela, por el Br. Barrios  
A., Arturo H. como requisito para optar al  
Título de Licenciado en Biología.  
Tutora: Dra. Nora Malaver

Caracas, Venezuela  
Febrero – 2011

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA**

**ACTA**

Quienes suscriben la presente acta, miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el siguiente Trabajo Especial de Grado por el Br. Arturo Barrios bajo el título “**Caracterización funcional de la comunidad bacteriana cultivable aislada del suelo de la zona de descarga de la fosa petrolera Bare-9. San Tomé. Edo. Anzoátegui**”. Para optar al título de Licenciado en Biología mención Ecología, consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos y por lo tanto lo declaramos APROBADO

**APROBADO EL 17 DE FEBRERO DE 2011 EN NOMBRE DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA POR EL SIGUIENTE JURADO EVALUADOR**

  
**Dra. Marcia Toro**

  
**Dra Beatriz Pernía**

  
**Dra. Nora Malaver**  
**Tutora**

DEDICATORIA

A mis padres

A mis amigos

A todos los que me guiaron y ayudaron en mi formación

## Agradecimientos

A mis padres, Lourdes Aguirre y Gilberto Barrios, por apoyarme en mi carrera, en mis decisiones, por estar ahí cuando los necesité. Por ser una fuente infinita de amor, paciencia y sabiduría que espero poder igualar. Por soportarme, ayudarme y enseñarme, en los buenos y malos momentos, mi deuda no puede ser más grande. No es fácil expresar el amor y agradecimiento hacia ustedes, me siento privilegiado por ser su hijo y haber recibido su ternura. Dios los tenga en su gloria.

A la profesora Nora Malaver y Maria del Pino Rodriguez por cumplir una función más allá del académico y empapar mi vida con ese aspecto familiar, que nutrido con Alejandra Zamora y Alicia Barreto, no solo me brindaron sus conocimientos y sabiduría sino que también obtuve la motivación, guía y ayuda en habilidades y destrezas que no esperaba. A todas por ayudar en mi formación no sólo como profesional sino como un ser integral. Gracias por soportarme, sé que no se las puse fácil.

A mis hermanos y hermanas, Manuel, Verónica, Cristina y Ricardo, por su motivación, estímulo, distracción y paciencia con lo que me ayudaron para seguir y llegar a este día y a los que siguen.

A todos mis amigos, en especial a Adrian Perez, Manuel Matos, Jesús Hernández (Cristo), Ruben Biomon (Bencho), Joshimer Rodriguez (Joshi), Alberto Mejía, Wilfrido Ortega, José Ali Briceño, Wilfredo Montero, Wendy Montero, Edecio Villarroel, Henry Cova, Luis Hernandez (Chino), Johan Barrantes, Ronald Tovar, Rodrigo Guevara, Gerardo Useche, Miguel Guevara, Vanessa Gamez, Milagros Salas, por ustedes la palabra amigo, así como pana, compadre, colega, compañero de armas, nakama, es que se vuelve valioso, un privilegio serlo de ustedes. Gracias por su colaboración, apoyo, dudas, discusiones, con la cual se enriquecieron más de una tarea, informe, salida de campo y desde luego, esta tesis.

En particular a profesores como Jesús Alberto León, Tomás Revilla, Maria Josefina Hernandez (Chepina), Pedro Rodríguez, Maribe Raimundez, Felix Castillo, Izaskun Petralanda, Concepción Hernandez, Ismael Hernandez, Nora Malaver y Maria del Pino Rodriguez, que me motivaron a abarcar mas, a ver más allá, a desear más en lo académico y aunque no me involucré en todos los proyectos siempre sentí el interés y tentación. Igualmente gracias por evitar que me disperse en esa nube de pensamientos e ideas.

A la universidad, la UCV, por ofrecer todas las condiciones, servicios, infraestructura, profesores, obreros, amigos, con los que compartí, me formé y de la cual siento un orgullo y sentido de pertenencia.

## **Caracterización funcional de la comunidad bacteriana cultivable aislada del suelo de la zona de descarga de la fosa petrolera Bare-9. San Tomé. Edo. Anzoátegui**

### **RESUMEN**

Mediante el presente estudio enmarcado dentro del proyecto Misión Ciencia “Desarrollo y Validación de Nuevas Tecnologías para el Saneamiento Ambiental de Pasivos Generados por la Actividad Petrolera”, dentro del subproyecto “Caracterización del Medio Físico Natural en Áreas Impactadas con Hidrocarburos” se pretende caracterizar funcionalmente la comunidad bacteriana del suelo de la zona de descarga de la fosa petrolera (Bare-9) y así determinar la estructura funcional de la comunidad y grupos funcionales con capacidad de degradar sustratos complejos, crecer sobre hidrocarburos y producir biosurfactantes.

Para el estudio se evaluaron dos cuadratas (B9I y B9D) dentro de la zona de descarga, caracterizados por presentar derrame petrolero y la zona con vegetación (B9V), donde se encontraron valores de abundancia del orden de  $10^9$  UFC/gr. de suelo en las zonas impactadas, hasta  $10^{12}$  UFC/gr. de suelo en la zona sin impacto.

El estudio incluye la caracterización fenotípica (macro y micromorfología de las cepas) y bioquímicamente por su crecimiento en diferentes sustratos, usando una fuente única de carbono, encontrándose un gran número de cepas capaces de degradar azúcares simples como glucosa (80%), de utilizar fuentes nitrogenadas el nitrato y de hidrolizar la urea y proteínas (80%) y un bajo número de cepas capaces de degradar sustratos complejos como celulosa, lignina, pectina con valores cercanos o menores al 20%.

Con los resultados obtenidos y utilizando como herramienta el análisis multivariado de Cluster se conformaron grupos de cepas con características similares en sus respuestas frente a diferentes sustratos que conforman los denominados grupos funcionales. Se determinó que la diversidad funcional era mayor en la zona impactada (B9I) que en la zona con vegetación donde se espera, a pesar de encontrar similar número de grupos funcionales (GF) entre las diferentes comunidades.

Los grupos funcionales agruparon en mayor medida a cepas proteolíticas, urea, reductoras de nitrato y con capacidad de utilizar el acetato como única fuente de carbono, características presentes en todas las localidades evaluadas. Se encontró una mayor similitud entre la comunidad impactada B9D y la zona con vegetación (B9V).

Se destacaron las cepas de interés por su potencial biotecnológico a ser utilizado en procesos de biorremediación a los que se les realizaron bioensayos para determinar la producción de compuestos tenso-activos

## Índice de Contenido

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	MARCO TEÓRICO .....	3
1.	Fosas Petroleras .....	3
2.	La Comunidad Microbiana .....	4
2.1.	Factores que Afectan el Desarrollo de las Comunidades Microbianas .....	6
3.	Diversidad Funcional.....	8
3.1.	Antecedentes en Estudios en la Diversidad de la Comunidad Microbiana .....	10
4.	Biosurfactantes en el tratamiento de suelos contaminados con Hidrocarburos .....	11
4.1.	Antecedentes en el uso de Biosurfactantes en la Biorremediación de suelos. ....	17
5.	Hipótesis .....	18
III.	OBJETIVOS .....	19
1.	Objetivo General.....	19
2.	Objetivos Específicos .....	19
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
1.	Métodos de Campo .....	20
1.1.	Caracterización de la Zona de Estudio .....	20
1.2.	Toma de Muestras de suelo .....	23
2.	Métodos de Laboratorio.....	26
2.1.	Caracterización de la Comunidad Bacteriana .....	26
2.2.	Análisis Funcional .....	28
2.3.	Caracterización de las Cepas con el Potencial de Interés Biotecnológico .....	29
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
1.	La abundancia de la comunidad bacteriana .....	38
2.	Caracterización macro y micromorfológica de la comunidad. ....	38
3.	Caracterización Bioquímica de la Comunidad Bacteriana. ....	42
4.	Análisis Funcional .....	46
5.	Selección de los grupos funcionales con potencial de producción de Biosurfactantes .....	56
VI.	CONCLUSIONES .....	64
VII.	RECOMENDACIONES .....	65
VIII.	REFERENCIAS.....	66
IX.	ANEXOS .....	77

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema de la estructura general de los surfactantes .....	12
<b>Figura 2A:</b> Estructura general de las micelas .....	13
<b>Figura 2B:</b> Estructura micelar. Esquema de micelas conteniendo contaminantes hidrofóbicos (Hidrocarburos Poli aromáticos) .....	13
<b>Figura 3:</b> Relación entre la concentración del biosurfactante y la CMC, el cambio en la tensión superficial y la formación de micelas .....	14
<b>Figura 4:</b> Estructuras representativas de biosurfactantes .....	15
<b>Figura 5:</b> Climadiagrama de la región .....	21
<b>Figura 6:</b> Ubicación geográfica de la fosa Bare-9 .....	22
<b>Figura 7:</b> Fotografía de la fosa, cerca del área de muestreo .....	22
<b>Figura 8:</b> Imágenes del área de muestreo .....	23
<b>Figura 9A:</b> Esquema de la fosa Bare-9 y de la ubicación de los sitios de muestreo .....	24
<b>Figura 9B:</b> Esquema de los sitios de muestreo y puntos muestreados aleatoriamente .....	25
<b>Figura 10:</b> Actividades realizadas en el laboratorio para la caracterización de la comunidad bacteriana .....	25
<b>Figura 11:</b> Esquema de diluciones y siembra .....	26
<b>Figura 12:</b> Preparación de cepas con potencial de producir biosurfactantes y determinación de su actividad emulsificante .....	31
<b>Figura 13:</b> Esquema del ensayo de actividad emulsificante, utilizando kerosene .....	31
<b>Figura 14:</b> Esquema de purificación de biosurfactantes, a partir del medio de cultivo hasta el compuesto puro .....	34
<b>Figura 15:</b> Curva de regresión de ramnosa .....	35
<b>Figura 16:</b> Esquema de distribución de las semillas sobre el papel de filtro dentro de la capsula de Petri .....	36
<b>Figura 17:</b> Gráficos de Porcentaje (%) de cepas según tipo celular en la Zona de Descarga y la Zona con Vegetación de la Fosa .....	41
<b>Figura 18:</b> Caracterización Bioquímica de las tres comunidades .....	43
<b>Figura 19:</b> Clúster de la comunidad B9I .....	47
<b>Figura 20:</b> Clúster de la comunidad B9D .....	48
<b>Figura 21:</b> Clúster de la comunidad B9V .....	49
<b>Figura 22:</b> Clúster de la comunidad B9I y B9D en conjunto .....	51
<b>Figura 23:</b> Análisis de Clúster. Dendograma comparando las tres comunidades .....	54
<b>Figura 24:</b> Producción de Biosurfactante medida por el índice de emulsificación (E24) en medio suplementado con kerosene, glicerina y glucosa en YPG y PPGAS .....	58
<b>Figura 25:</b> Cambio de la Tensión Superficial en función de la concentración de ramnolípidos determinados por ramnosa equivalentes .....	59

<b>Figura 26:</b> Efectos en la germinación de semillas de tomate en función de las concentraciones del Biosurfactante .....	60
<b>Figura 27:</b> Desarrollo de la plántula. Efectos en el crecimiento sobre la radícula y el hipocotilo de la raíz .....	61
<b>Figura 28:</b> Índice de Toxicidad. Utilizando semillas de tomate como indicador de toxicidad y el sobrenadante a diferentes concentraciones .....	61



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Ejemplos comunes de biosurfactantes, organismos productores y composición .....	16
<b>Tabla 2:</b> Pruebas Bioquímicas .....	28
<b>Tabla 3:</b> Medios utilizados en la producción de biosurfactantes .....	33
<b>Tabla 4:</b> Tabla de volúmenes para las diluciones evaluadas .....	36
<b>Tabla 5:</b> Densidad Bacteriana de las zonas de descarga B9I y B9D y de la zona con vegetación B9V .....	38
<b>Tabla 6a:</b> Morfotipos de las colonias aisladas en la zona B9I .....	39
<b>Tabla 6b:</b> Morfotipos de las colonias aisladas en la zona B9D .....	39
<b>Tabla 6c:</b> Morfotipos de las colonias aisladas en la zona B9V .....	40
<b>Tabla 7:</b> Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad B9I, su Índice de Importancia (Pi) y Características de los aislados de cada GIF .....	47
<b>Tabla 8:</b> Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad B9I. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas .....	48
<b>Tabla 9:</b> Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad B9D, su Índice de Importancia (Pi) y Características de los aislados de cada GIF .....	49
<b>Tabla 10:</b> Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad B9D. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas .....	49
<b>Tabla 11:</b> Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad B9V, su Índice de Importancia (Pi) y Características de los aislados de cada GIF .....	50
<b>Tabla 12:</b> Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad B9V. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas .....	50
<b>Tabla 13:</b> Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad (B9I y B9D). Índice de Importancia (Pi) de los GIF y Características de cada GIF .....	51
<b>Tabla 14:</b> Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad (B9I y B9D). Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas .....	51
<b>Tabla 15:</b> Características de los Grupos de Identidad Funcional al agrupar las tres comunidades .....	53
<b>Tabla 16:</b> Características de los nodos que agrupan los grupos funcionales al reunir las tres comunidades. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas en común .....	53
<b>Tabla 17:</b> Resumen de la información derivada de los análisis de de clúster de las comunidades de las zonas aisladas y consideradas en conjunto .....	55

## I. INTRODUCCIÓN

La degradación del ambiente es un tema altamente preocupante para todos los países debido a las graves consecuencias no sólo ecológicas, sino también sociales y económicas. Uno de los principales problemas es el manejo inadecuado y acumulación de desechos de la industria petrolera, los cuales están formados principalmente por hidrocarburos, además de agua, ripsos, productos químicos, catalizadores gastados, asbestos, interfaces de tanques y residuos provenientes de derrames; resultado del proceso de perforación, extracción, transporte y procesamiento de la industria petrolera. Estos componentes, que contienen gran proporción de compuestos orgánicos e inorgánicos, no son autóctonos del ambiente o están en concentraciones mayores a las naturales, generando un efecto nocivo, por lo que se consideran contaminantes y deben manejarse de forma adecuada (Speight, 1999; Corneo, 2001; Madrid y Cataldi, 2002; Peña, 2005; Araujo y col., 2004; Párraga, 2005).

Estos desechos de la industria petrolera son destinados para su control y tratamiento para así evitar la contaminación de otras localidades a fosas petroleras las cuales son excavaciones de terreno al aire libre (Corneo, 2001; Madrid y Cataldi, 2002; Peña, 2005). Sin embargo estas estructuras son susceptibles a accidentes y dada la carencia de evaluación y control de estos sitios, se ha incrementado en el tiempo el potencial que poseen los contaminantes de migrar a través de fracturas y canales así como por inundaciones producto de las lluvias, con la posibilidad de contaminar suelos, acuíferos, aguas superficiales y otras partes del ecosistema que los rodea (Rosenberg y Ron, 1995; Madrid y Cataldi, 2002).

En Venezuela existen mas de 12.000 fosas petroleras las cuales representan un problema ambiental a nivel nacional, especialmente en la adyacencias del Lago de Maracaibo y en el Oriente del país donde se han almacenado por décadas desechos de las actividades de exploración y producción y no han recibido un tratamiento adecuado para evitar daños mayores al ambiente y a la salud de los habitantes en áreas adyacentes (Madrid y Cataldi, 2002; Párraga, 2005; Arellano, 2008).

Los desechos en las fosas generan una serie de cambios fisicoquímicos dada las nuevas condiciones de materia orgánica y compuestos tóxicos presentes en el medio, lo que afecta y pone en peligro a la comunidad microbiana, reflejándose en su diversidad (Rosenberg y Ron, 1995; Rivera-Cruz y col., 2002; Bundy y col., 2002). Esta

comunidad microbiana está compuesta principalmente por cinco grupos de microorganismos; bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios, siendo la comunidad bacteriana el grupo dominante (Alexander, 1980; Infante y Vásquez, 1999; Infante, 2005; Das y Mukherjee, 2007; Domínguez, 2008; Frers, 2010).

Aun en un ambiente impactado con compuestos tóxicos, existen microorganismos que son capaces de sobrevivir y que por selección natural constituirán la comunidad dominante ante las nuevas condiciones ambientales, que participan en el reciclado de minerales y biodegradación de la materia orgánica e inorgánica así como la remoción y degradación de compuestos tóxicos que son depositados en el suelo (Leahy y Colwell, 1990; Crawford, 1995; Antía, 1995; Atlas y Bartha, 2002; Bastardo, 2005; Infante, 2005). Ello cumple con lo postulado por Gayle (1952) y Alexander (1965) que afirman que para cualquier compuesto orgánico existe un organismo que puede degradarlo bajo las condiciones adecuadas, de lo contrario la evolución podría producir la cepa o el pool de genes que utilizan al contaminante como sustrato hasta degradarlo (Atlas y Bartha, 2002; Alvarez e Illman, 2006; Domínguez, 2008).

La evaluación de la diversidad de las comunidades microbianas puede ser diferenciada según un arreglo de tres elementos interrelacionados; diversidad taxonómica, diversidad genética y diversidad funcional (Alexander, 1980; Zak y col., 1994; Bastardo, 2005; Zamora, 2008). El análisis de la estructura funcional de la comunidad microbiana está fundamentado en el potencial bioquímico y las interacciones de las poblaciones microbianas con las variables fisicoquímicas del ambiente.

El estudio de la diversidad funcional tiene la capacidad de caracterizar la comunidad, analizar y destacar grupos funcionales según su potencial bioquímico, determinar la diversidad de la misma en un lugar específico, a la vez que permite conocer el impacto de los contaminantes sobre la estructura funcional de la comunidad, la participación de los microorganismos en el reciclaje de nutrientes y la capacidad de recuperación del ecosistema o la resiliencia del mismo. Esto facilita seleccionar y estimular cepas de la comunidad vinculadas a los procesos de recuperación del ambiente (Duarte y col., 2001; Peña, 2005; Zamora, 2006; Bozo y col., 2007; Domínguez, 2008; León, 2008). De allí la necesidad de generar un aporte al conocimiento de las comunidades microbianas sometidas a las perturbaciones producto de la disposición de

los hidrocarburos en las fosas, que actúan en la adaptación de las comunidades a las nuevas condiciones y en la restricción de la diversidad de la comunidad.

En el presente trabajo se empleará el análisis funcional como herramienta sensible a los cambios capaz de comparar las diferencias entre distintas comunidades, con el alcance de apoyar en la generación y desarrollo de tecnologías limpias, como la biorremediación y el uso de biosurfactantes, los cuales ayudan en la recuperación del ambiente. La biorremediación como proceso biotecnológico es capaz de eliminar contaminantes y recuperar sitios contaminados, a través de procesos de biotratamiento basados en la explotación del potencial de degradar contaminantes que poseen los microorganismos (hongos, bacterias), el uso de enzimas de origen microbiano asociadas a la biodegradación de hidrocarburos (Crawford, 1995; Colleran, 1997; Atlas y Bartha, 2002; Srinivas, 2008). El uso de los biosurfactantes facilita la solubilización y de los contaminantes poco polares e incrementa la disponibilidad y superficie de ataque de estos compuestos a la comunidad microbiana y beneficia las técnicas de biorremediación (Christofi e Ivshina, 2002).

Asimismo, se pretende establecer la estructura de la comunidad bacteriana presente en el suelo impactado por derrame de la zona de descarga de la fosa petrolera Bare – 9 y compararla con la de la comunidad de la zona con vegetación no impactada. A través del análisis funcional se destacarán los grupos funcionales de interés biotecnológico, incluyendo particularmente aquellas cepas productoras de biosurfactantes y degradadoras de moléculas modelo.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **1. Fosas Petroleras**

Las fosas petroleras son excavaciones de terreno al aire libre donde se reciben los desechos producto del proceso de perforación, extracción, transporte y procesamiento de la industria petrolera. Estos desechos están formados por lodos bentoníticos, hidrocarburos, agua, ripios, productos químicos, catalizadores gastados, asbestos, interfaces de tanques y residuos provenientes de derrames (Araujo, 2004; Párraga, 2005).

Según el tamaño y el tipo de desecho que es dispuesto en las fosas, Arellano (2008) las clasifica de la siguiente manera:

- **Muros Quemadores:** Son pequeñas construcciones de 2 metros de profundidad y 40 m<sup>2</sup> de superficie, ubicados cerca de los pozos petroleros, destinados para eliminación de crudo por medio de la quema.
- **Fosas de Perforación:** Son excavaciones en el suelo con una superficie de 1500 a 2000 m<sup>2</sup> y de 2 a 3 metros de profundidad, dispuestas para fluidos, desechos y cortes de perforación.
- **Fosas de Producción:** Manejan volúmenes que alcanzan los 7.500 m<sup>3</sup>, almacenan agua salada producto de los desechos de los procesos de la hidratación del petróleo, son acondicionadas con muros de contención, con una superficie mayor a los 2.000 m<sup>2</sup>.

El efecto perjudicial sobre el ambiente que ejerce la problemática de los desechos de las fosas hace necesario indagar y promover procesos y tecnologías amigables con el ambiente, que aceleren la degradación de contaminantes, favoreciendo al mismo tiempo la preservación de los ecosistemas (Infante, 2001; Garbisu y col., 2002). Esta necesidad ha conllevado al desarrollo y aplicación de técnicas que permitan minimizar o destruir los desechos basadas en procesos físicos, químicos, biológicos o una mezcla de estos, entre las que se encuentran la ventilación, la incineración y el arrastre por aire, así como la extracción con solventes y los procedimientos de oxidación-reducción y técnicas de biorremediación (Corneo, 2001; Peña, 2005).

## **2. La Comunidad Microbiana**

Los microorganismos son los principales participantes en la degradación de la materia orgánica, la remoción de compuestos tóxicos y el mantenimiento del equilibrio ecológico en el ambiente (Crawford, 1995; Atlas y Bartha, 2002). Sin embargo, la historia de la microbiología ambiental o ecología microbiana es reciente, y se inicia a partir de la década de 1960, cuando el estudio de los microorganismos y su interrelación con el ambiente se hizo frecuente junto con los avances en los estudios de microbiología y el enfoque en sus aportes a la calidad ambiental. Esto generó el reconocimiento de la participación de los microorganismos en el flujo de materia y energía a través de los ecosistemas, dada sus capacidades metabólicas para transformar sustancias complejas, orgánicas e inorgánicas, entre los que se cuentan desde contaminantes, hasta moléculas sencillas y accesibles para los organismos productores (Antía, 1995; Atlas y Bartha, 2002; Bastardo, 2005).

Uno de los cambios en los factores fisicoquímicos del suelo y del equilibrio ecológico son debido a los derrames y la disposición de desechos petroleros en las fosas, siendo estos una de las principales y más graves fuentes de contaminación del suelo. Actualmente se reconoce y se ha determinado la capacidad de microorganismos para degradar un gran número de compuestos, tales como hidrocarburos de diversa toxicidad. La susceptibilidad de los hidrocarburos a la actividad microbiana sigue el siguiente orden; saturados > aromáticos > resinas > asfáltenos, con las diferencias y limitantes por la composición del crudo (Atlas, 1975; Leahy y Colwell, 1990; Antía, 1995; Ijah, 1998; Rivera-Cruz y col., 2002; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005; Bastardo, 2005; Infante, 2005; Okoh y Trejo-Hernandez, 2006; Surridge y col., 2009).

Las principales comunidades de microorganismos que participan en la degradación de hidrocarburos en el ambiente son la comunidad fúngica y la comunidad bacteriana, sin embargo cada organismo de la comunidad sólo puede metabolizar un limitado grupo de hidrocarburos. Así, la capacidad de la comunidad de degradar la compleja mezcla del crudo está determinada por la diversidad enzimática de los microorganismos en utilizar a los hidrocarburos como sustratos. De la comunidad bacteriana es frecuente identificar a cepas del género de *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Berjerinckia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Methylosinus*, *Mycobacterium*, *Mycococcus*, *Nitrosomonas*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Xanthobacter* spp (Atlas, 1975; Leahy y Colwell, 1990; Ijah, 1998; Rivera-Cruz y col., 2002; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005; Okoh y Trejo-Hernandez, 2006; Surridge y col., 2009).

El éxito de la degradación no sólo depende del potencial por parte de la comunidad bacteriana sino que también está afectada por factores abióticos. Las variables que afectan la tasa de biodegradación se pueden englobar en tres condiciones como; (a) la estructura de la comunidad microbiana, (b) la composición y biodisponibilidad de los contaminantes, y (c) las características físicas y químicas de los sitios contaminados (Atlas y Bartha, 2002; Peña, 2005; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005; Okoh y Trejo-Hernandez, 2006).

## 2.1. Factores que Afectan el Desarrollo de las Comunidades Microbianas

La distribución y funcionamiento de las poblaciones microbianas están influenciadas por factores abióticos diversos. Efectos como la limitación de nutrientes y la tolerancia ambiental regulan la existencia de diferentes microorganismos por medio de la supervivencia y crecimiento de estas poblaciones. Estos están basados en los principios de la Ley del mínimo de Liebig y la ley de la tolerancia de Shelford respectivamente (Atlas y Bartha, 2002). Según la Ley de Liebig el crecimiento de las poblaciones bacterianas se ve determinado por el nutriente cuya concentración sea la más escasa o limitante. Estos son utilizados para la producción de energía, biomasa y la biosíntesis de diferentes productos microbianos. La ley de Shelford establece que para el éxito y desarrollo de cada organismo, éste requiere de una serie de condiciones y cada uno presenta límites de tolerancia ante variables tales como factores físicos y químicos, la temperatura, el pH, entre otros. (Atlas y Bartha, 2002).

Algunas de las variables antes descritas pueden resultar difíciles de modificar dentro de los sitios contaminados. Asimismo la alteración de estos factores podrían favorecer la actividad microbiana e igualmente afectar la solubilidad y disponibilidad de los contaminantes, permitiendo su migración a otros ecosistemas, así como la de los demás nutrientes y perjudicar así a la comunidad microbiana (Colleran, 1997). Para esto es necesario conocer la influencia de los factores como:

1. *El pH del suelo*: Las bacterias exhiben un crecimiento y actividad óptima cerca de pH neutros, siendo el intervalo óptimo entre un pH de 6 a 8, aunque hay variables dependiendo del tipo del contaminante. Ha sido típico encontrarse con suelos ácidos, donde se han aplicado técnicas para neutralizar el pH (Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005).
2. *La Temperatura*: Que afecta tanto el metabolismo bacteriano como a la tasa de crecimiento, al estado y la fisicoquímica del contaminante. El intervalo óptimo está dentro de los 20 ° C a 40 ° C (Atlas, 1975; Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005).
3. *La Humedad*: Los microorganismos requieren un intervalo de actividad del agua ( $\alpha_w$ ) de 0,9 – 1,0 o un 30 a 90% de saturación del agua, y el intervalo frecuente

de humedad ( $\alpha_w$ ) en los suelos es de 0,0 a 0,99 y 0,98 en ambientes acuáticos (Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005).

4. *Salinidad*: En estudios de degradación de hidrocarburos se ha observado una correlación entre la salinidad y la tasa de mineralización de fracciones de crudo, donde la biodegradación era mas elevada cuando la salinidad mínima y decrecía con salinidades mayores al doble de la salinidad marina normal (Leahy y Colwell, 1990; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005).
5. *Concentración de Nutrientes*: Se refiere a la disponibilidad de nutrientes, tales como nitrógeno y fósforo, para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas (Olivieri y col., 1976; Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005; Okoh y Trejo-Hernandez, 2006).
6. *Disponibilidad de Oxígeno*: La actividad biológica requiere de la provisión de oxígeno para mejorar la actividad catalítica y respiratoria de los microorganismos, encontrándose valores 50 a 100 veces menores en condiciones anaeróbicas. La misma puede ser suplementada por medio de la percolación de agua enriquecida con oxígeno y ventilación, entre otros (Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Adams y col., 1999; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005).
7. *Estructura Química y Concentración de Hidrocarburos*: Dada la naturaleza y proporción de los contaminantes la susceptibilidad de los compuestos a la degradación así como la composición con otros agregados (como metales, plaguicidas, etc.) se encuentra afectada. Influye tanto en la solubilidad en el agua, como en la formación de agregados con el suelo y por el reconocimiento enzimático y susceptibilidad al ataque microbiano (Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Adams y col., 1999; Van Hamme y col., 2003; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005; Okoh y Trejo-Hernandez, 2006).
8. *Biodisponibilidad del Hidrocarburo*: Variable que define el nivel y facilidad de degradación del compuesto, debido tanto a la solubilidad del compuesto y acceso a este por parte de las bacterias como por la acción y capacidad de la actividad enzimática de los microorganismos (Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Adams y col., 1999; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005). Sobresalen ante esta limitación los biosurfactantes como compuestos, producidos por los microorganismos, con propiedades tenso – activas favoreciendo la solubilización



y dispersión de los contaminantes y mejorando así el proceso de biorremediación. Preferidos dada su eficiencia, baja toxicidad para el ecosistema y biodegradabilidad además de la facilidad de su producción (Georgiou y col., 1992; Christofi e Ivshina, 2005; Rahman y col., 2007).

9. *Comunidad Microbiana*: La capacidad de degradar contaminantes por parte de los microorganismos depende de la presencia y expresión de genes capaces de esta actividad. La misma puede ser acondicionada por medio de la *bioaugmentación*, estrategia donde se inocula una población de organismos exógenos, como por medio de la *bioestimulación*, donde se modifican las condiciones abióticas y se favorece a la comunidad autóctona (Leahy y Colwell, 1990; Colleran, 1997; Adams y col., 1999; Bundy y col., 2002; Van Hamme y col., 2003; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005; Okoh y Trejo-Hernandez, 2006).

Así las comunidades microbianas están sujetas a los cambios sobre estas variables y difieren en número y frecuencia de especies (Zak y col., 1994; Malaver, 1996; López, 2002). La caracterización de la comunidad permite determinar las diferencias entre comunidades y evaluar los efectos de la contaminación por hidrocarburos en las mismas (Malaver, 1996; Bastardo, 2005; Zamora, 2008).

Estudios de la ecología microbiana implican la detección de los procesos y productos dentro de las comunidades por empleo de ensayos biológicos y químicos, además del aislamiento de los microorganismos, para así aumentar de esta manera el conocimiento fundamental de la ecología de los organismos (Malaver, 1996; López, 2002; León, 2008; Zamora, 2008).

### **3. Diversidad Funcional**

La diversidad biológica se puede definir por el número total de especies y por el número de especies que son comunes, que están presentes en el mismo espacio y tiempo (Krebs, 1985). En el caso de las comunidades microbianas se puede ser diferenciado en cuanto a un arreglo de tres elementos interrelacionados; diversidad taxonómica, diversidad genética y diversidad funcional (Alexander, 1980; Zak y col., 1994; Bastardo, 2005; Zamora, 2008). El estudio de cada uno, está enfocado en determinar las especies presentes, el número de genomas distintos, y la capacidad de bioquímica de

degradar compuestos orgánicos, respectivamente (Alexander, 1980; Zak y col., 1994; Bastardo, 2005; Zamora, 2008).

La diversidad funcional se destaca sobre las otras dado al potencial de obtener información sobre los roles microbiológicos en los ecosistemas, como en los ciclos biogeoquímicos, la degradación de la materia orgánica, animal y vegetal y la degradación de contaminantes, a través de la caracterización de la comunidad microbiana en función de sus características fenotípicas.

Para el logro de esta caracterización existe una gran cantidad de información sobre nuevas técnicas que describen la diversidad funcional. Dentro de estas técnicas se encuentran las basadas en técnicas moleculares, por la determinación de ácidos grasos fosfolípidos (PLFA), y por perfiles metabólicos a través de la utilización de fuentes de carbono por parte de la comunidad, a través del Biolog® se considera el efecto sinérgico de todas las poblaciones sin diferenciar la participación de microorganismos particulares, y por medio del Análisis Funcional se considera el perfil fenotípico de las poblaciones aisladas previamente, las cuales son agrupadas posteriormente según su potencial bioquímico en la comunidad en los denominados Grupos Funcionales (Garland y Mills, 1991; Zak y col., 1994; Malaver, 1996; López, 2002; Bastardo, 2005; Zamora, 2008).

La diversidad funcional es definida entonces como el número y tipo de fuentes de carbono utilizados por una muestra de la comunidad, sin la necesidad de llegar a la identificación taxonómica de las cepas, ni la diversidad de genomas, sólo su capacidad y actividad bioquímica en el ecosistema (Antía, 1995; Malaver, 1996; Goodfriend, 1998; Zamora, 2008).

Esta caracterización permite determinar la diversidad y estructura de la comunidad microbiana en un ambiente específico, comparar sitios en el tiempo y en el espacio en función de la frecuencia de aparición de microorganismos con características bioquímicas similares (Malaver, 1996; Bastardo, 2005; Peña, 2005; Zamora, 2006; Domínguez, 2008; León, 2008; Zamora, 2008).

Igualmente el estudio de la diversidad funcional permite caracterizar la comunidad con el potencial para la biorremediación, así como el efecto de la contaminación por desechos petroleros sobre la estructura comunitaria. Así, al conocer

el impacto de los contaminantes sobre la estructura de la comunidad y el papel de los microorganismos en el entorno contaminado se puede evaluar la capacidad de recuperación del ecosistema, es decir su resiliencia, además de seleccionar, estimular y mantener cepas vinculadas a los procesos de recuperación del ambiente (Duarte y col., 2001; Peña, 2005; Zamora, 2006; Bozo y col., 2007; Domínguez, 2008; León, 2008).

### **3.1. Antecedentes en Estudios en la Diversidad de la Comunidad Microbiana**

Dada la importancia de las comunidades microbianas en las funciones y homeostasis del ecosistema y el efecto de cambios ambientales y de la contaminación sobre estas, se revisan las principales respuestas de las comunidades ante los daños ambientales (Bozo y col., 2007). Entre los análisis que se basan en el perfil bioquímico de respuestas frente a diferentes sustratos carbonados tenemos los estudios realizados por el laboratorio de Microbiología Ambiental del IZET, entre los que se encuentran:

Peña (2005) realizó un estudio geoquímico y microbiológico a dos fosas, JM-162 Y JMN-184, ubicadas en San Joaquín, estado Anzoátegui, las cuales presentaban diferentes tratamientos, evaluando variables físicas, químicas y microbiológicas en perfiles de relleno de 300 cm. de profundidad, como indicadores de cambios en el tiempo (1999 y 2001) y comparados con suelos control, no impactados por actividad petrolera. Los resultados obtenidos mostraron diferencias en el tratamiento de las fosas, donde la aplicación de fertilizantes (NPK) y la reforestación modificó e incrementó la diversidad de la comunidad de bacterias. Mientras que el no acondicionamiento de la región en la fosa JMN-184 no favoreció a la comunidad, lo que produjo el confinamiento de los hidrocarburos, así mismo los suelos cercanos presentaron una disminución de diversidad funcional.

Zamora (2006) evaluó los cambios fisicoquímicos y microbiológicos por el efecto de la adición de crudo y fertilizante, indicó el efecto sobre la diversidad microbiana con el estudio de la caracterización funcional y destacó que la estructura de la comunidad es modificada, al favorecer aquellas cepas heterotróficas con la capacidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono sobre aquellas que no presentan esta adaptación, determinándose así una disminución en el número relativo de grupos proteolíticos, lignolíticos y celulolíticos.

Continuando con estos estudios, a nivel de laboratorio Domínguez (2008) realizó la caracterización funcional de la comunidad microbiana (hongos y bacterias) aislados de la fosa JM-162, y seleccionó aquellas cepas con crecimiento en medio suplementado con sustratos complejos, tales como lignina, pectina y quitina, y suplementado con petróleo. De esta manera selecciona un total de 18 cepas; 6 bacterianas y 12 fúngicas. Con estas cepas se conformaron consorcios a los que se realizaron ensayos de degradación de diferentes fracciones de crudo, donde se destacan los saturados y los aromáticos con una mayor tasa de degradación, las resinas y asfáltenos como las fracciones con menor tasa de biodegradación. Se concluyó que la eficiencia de los consorcios hongos-bacterias era mayor que con los hongos y las bacterias por separado.

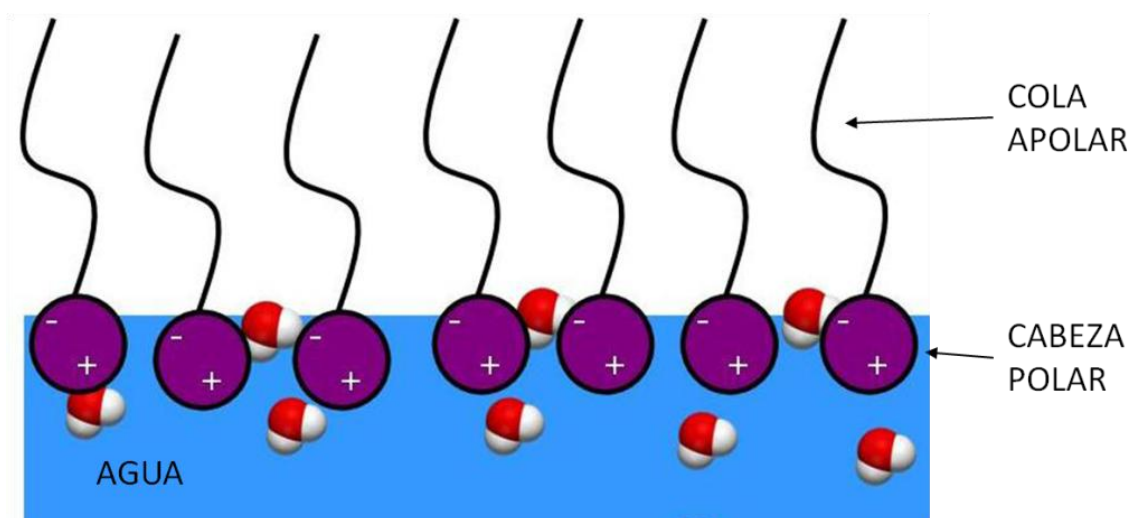
León (2008), caracterizó funcional y molecularmente la comunidad bacteriana cultivable asociada a rípios de perforación base agua impregnado con petróleo pesado, destacando los grupos funcionales con el potencial de producción de biosurfactantes. León discriminó de ochenta cepas caracterizadas, 14 cepas con el potencial mencionado, y a las cuales se les determinó la diversidad genética de la comunidad bacteriana mediante la técnica de DNA Fingerprint. A través de la caracterización funcional a nivel bioquímico y por medio de bioensayos sobre el potencial de producir biosurfactantes, se destacaron tres cepas: *Comamonas* sp., *Ochrobactrum* sp. y *Pseudomonas stutzeri*, a las cuales se les evaluó la actividad emulsificante, revelando su potencial como biocatalizadores en procesos de biorremediación con contaminantes generados por la industria petrolera.

#### **4. Biosurfactantes en el tratamiento de suelos contaminados con Hidrocarburos**

La biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos que se encuentran en el petróleo es uno de los factores limitantes en la biodegradación, al estar concentrados en una segunda fase orgánica y presentar baja solubilidad en el agua, cercano al 0,02% del crudo disuelto en agua, lo que restringe el alcance y acción por parte de la comunidad microbiana, que por lo general deben tomar del medio extracelular a los contaminantes e introducirlo al intracelular para ser metabolizado (Leahy y Colwell, 1990; Georgiou y col., 1992; Colleran, 1997; Desai y Banat, 1997; Adams y col., 1999; Wilkinson y col., 2002; Christofi e Ivshina, 2002; Youssef y col., 2004; Saadoun y Al-Ghzawi, 2005; Rodrigues y col., 2006; Rahman y col., 2007; Van Hamme y Urban, 2009).

Se consideran generalmente tres modos para el transporte de hidrocarburos a las células microbianas, (i) por interacción directa de comunidad microbiana con los contaminantes disueltos en la fase acuosa, este depende de la solubilidad y transferencia de masa del compuesto hidrofóbico en el agua, (ii) por contacto directo de las células con la fase orgánica donde se concentran los hidrocarburos, limitado por la superficie de esta fase y se llevaría a cabo por difusión o por transporte activo, y (iii) por la interacción entre los microorganismos y los contaminantes en emulsión y dispersados en la fase acuosa, para lo que se requiere de un factor solubilizante (Muller-Hurtig, 1993; Banat y col., 2000; Christofi e Ivshina, 2002; Christofi e Ivshina, 2005; Pacwa-Płociniczak y col., 2011).

Los surfactantes son moléculas anfipáticas, formadas por una región hidrofílica o polar y una región hidrofoba o poco polar (Figura 1), que reducen la tensión superficial e interfacial, permiten la solubilización de los compuestos hidrofóbicos en el agua y mejora su biodisponibilidad y superficie de contacto con la comunidad bacteriana (Rahman y col., 2007; Whang y col., 2008; Pacwa-Płociniczak y col., 2011; Soberón-Chávez y Maier, 2011).

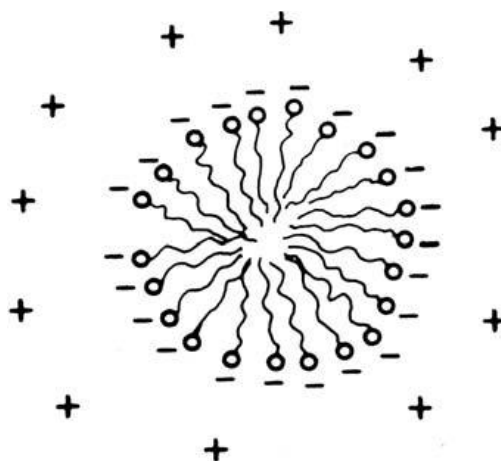


**Figura 1:** Esquema de la estructura general de los surfactantes. (Imagen modificada a partir de la publicada en Pacwa-Płociniczak y col., 2011)

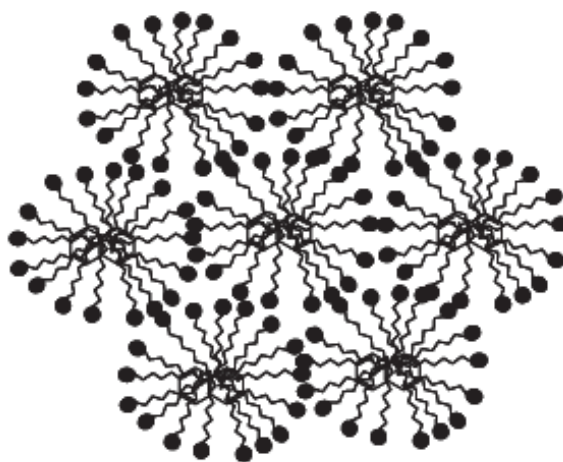
Esta propiedad tensoactiva de mezclar o dispersar a los compuestos poco polares en el agua como emulsión resulta al encapsular los contaminantes en agregados denominados micelas (Georgiou y col., 1992; Desai y Banat, 1997; Banat y col., 2000; Youssef y col., 2004; Christofi e Ivshina, 2005; Rodrigues y col., 2006; Rahman y col.,

2007; Miller y Neogi, 2008; Van Hamme y Urban, 2009; Soberón-Chávez y Maier, 2011).

Las micelas son estructuras en la que se dispone la región hidrofóbica de los surfactantes en el centro, con el compuesto hidrofóbico y la región hidrofílica en contacto con el agua (Figura 2) (Christofi e Ivshina, 2005; Miller y Neogi, 2008; Soberón-Chávez y Maier, 2011).

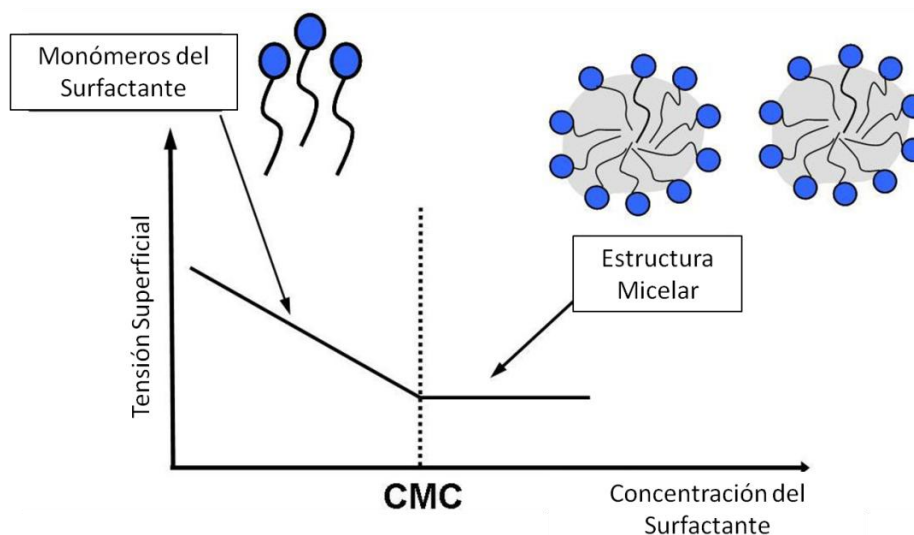


**Figura 2A:** Estructura general de las micelas (con surfactantes aniónicos o de carga negativa). Cabeza polar en contacto con el solvente polar y cola apolar en el centro, sin compuestos hidrofóbicos. (Imagen de Miller y Neogi, 2008)



**Figura 2B:** Estructura micelar. Esquema de micelas conteniendo contaminantes hidrofóbicos (Hidrocarburos Poliarmáticos) (Imagen de Christofi e Ivshina, 2005)

La formación de micelas ocurre encima de la denominada concentración micelar crítica (CMC), a esta concentración disminuyen los monómeros libres de los surfactantes, se agregan en las estructuras micelares y se alcanzan los valores más bajos de tensión superficial (Figura 3) (Zhang y Miller, 1992; Desai y Banat, 1997; Christofi e Ivshina, 2005; Miller y Neogi, 2008; Chávez y col., 2009; Raiger y López, 2009; Soberón-Chávez y Maier, 2011; Pacwa-Płociniczak y col., 2011).

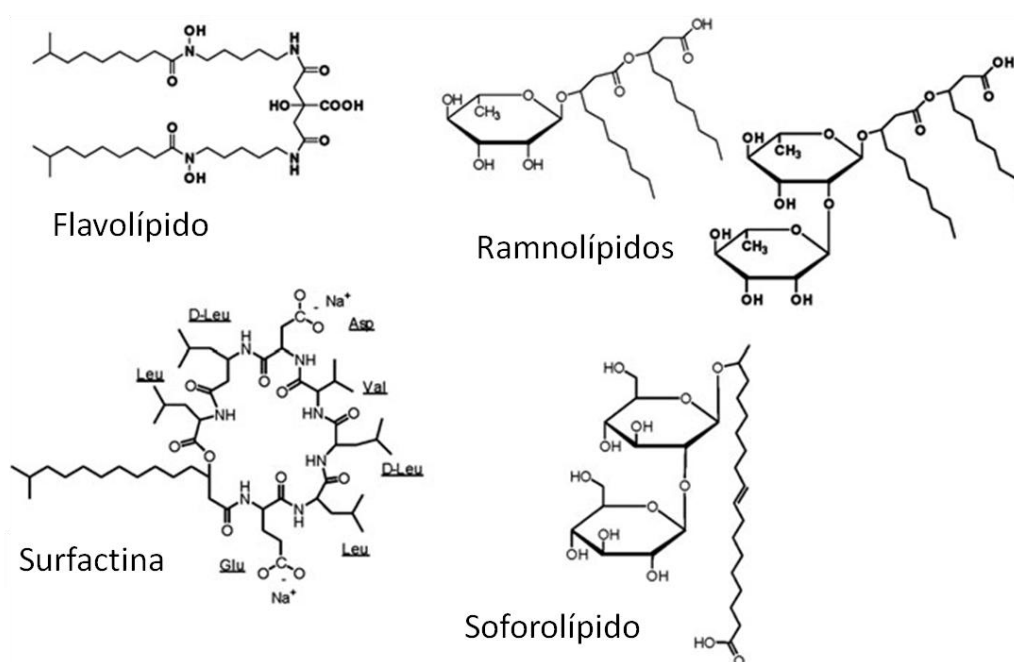


**Figura 3:** Relación entre la concentración del biosurfactante y la CMC, el cambio en la tensión superficial y la formación de micelas (Imagen modificada a partir de la publicada en Pacwa-Płociniczak y col., 2011)

En función de la CMC se pueden comparar a los surfactantes, cuanto menor sea la CMC mejor será el surfactante, pues se requiere menor concentración del mismo para formar micelas y disminuir la tensión superficial (Desai y Banat, 1997; Raiger y López, 2009; Pacwa-Płociniczak y col., 2011), así como la actuación de los contaminantes en presencia de los compuestos tenso-activos; a concentraciones superiores a la referida por la CMC aumenta la tasa de biodegradación de los contaminantes y a concentraciones por debajo de la CMC se facilita la movilización de los mismos (Christofi e Ivshina, 2005; Mulligan, 2005; Whang y col., 2008; Pacwa-Płociniczak y col., 2011).

Según su origen los surfactantes se clasifican en sintéticos, por ser producto de derivados del petróleo o en biosurfactantes, que son sintetizados por microorganismos (Desai y Banat, 1997; Christofi e Ivshina, 2005; Soberón-Chávez y Maier, 2011). Estos últimos presentan ventajas sobre los surfactantes sintéticos por ser menos tóxicos y

menos persistentes en el ambiente, además de mostrar una mayor eficiencia y facilidad de producción (Georgiou y col., 1992; Banat y col., 2000; Mulligan, 2005; Christofi e Ivshina, 2005; Whang y col., 2008; Raiger y López, 2009), aunque se ha reportado que varios biosurfactantes presentan actividad antimicrobiana, lo que podría reducir la población responsable de la biodegradación de los contaminantes (Lang y Warner, 1993; Banat y col., 2000; Christofi e Ivshina, 2002; Van Hamme y Urban, 2009).



**Figura 4:** Estructuras representativas de biosurfactantes (Imagen de Soberón-Chávez y Maier, 2011)

Los biosurfactantes se pueden clasificar según estructura (i) glicolípidos donde se encuentran los Ramnolípido, (ii) lipopéptidos y lipoproteínas, (iii) fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos neutrales, (iv) biosurfactantes poliméricos y (v) partículas surfactantes (Georgiou y col., 1992; Desai y Banat, 1997; Youssef y col., 2004; Christofi e Ivshina, 2005; Sulbaran y col., 2005; Rodrigues y col., 2006; Rahman y col., 2007).

La síntesis de estos compuestos está afectada por las condiciones de crecimiento tales como la fuente de carbono, su relación con la concentración de nutrientes, nitrógeno y fósforo, donde se observó que se incrementa la producción cuando están limitados (Desai y Banat, 1997; Miller y Zhang, 1997). Asimismo está asociada



específicamente a los géneros de los microorganismos que los producen, aunque pueden existir diferencias entre las especies del grupo (Miller y Zhang, 1997).

**Tabla 1:** Ejemplos comunes de biosurfactantes, organismos productores y composición (Tabla modificada a partir de la publicada en Raiger y López, 2009)

Biosurfactante		Organismos que lo producen	Parte Hidrofóbica	Parte Hidrofílica
Grupo	Clase			
Glicolípido	Ramno lípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	Ácido $\beta$ - hidroxidecanoico	1 o 2 moléculas de ramnosa
	Trehalo lípidos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia</i> sp.	Ácido Micólico	Trehalosa
	Soforo lípidos	<i>Candida apícola</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>	Ácido Hidroxiácido	Soforosa
	Celobio lípidos	<i>Ustilago maydis</i>	Ácido graso	Celobiosa
Lipopéptido y Lipoproteínas	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
	Lichenysin A, Lichenysin B	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
	Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp.	Hidroxiácido	Péptido cíclico
	Ornitina, lisina	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i>	Compuesto alifático de cadena larga	Grupos amino y grupos ácido
Fosfolípidos, Ácidos grasos y Lípidos Neutrales	Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp.	Ácido graso	Grupo fosfato
	Ácidos grasos (ácido corinomicólico, espiculispórico, etc.)	<i>Capnocytophaga</i> sp., <i>Penicillium piculisporum</i> <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i> <i>Nocardia erythropolis</i>	Ácido graso	
	Lípidos polioles	<i>Rhodotorula glutinus</i> <i>Rhodotorula graminus</i>	Ácido graso	Polioxipropilenglicol
	Diglicosil diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>	2 ácidos grasos	di-hidrato de carbono + glicerol
Biosurfactantes Poliméricos	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Complejo de proteínas y polisacáridos aniónicos	
	Streptofactin	<i>Streptomyces tendae</i>	Proteína hidrofóbica de alto peso molecular	
Partículas Surfactantes	Surfactantes particulados	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N. <i>Pseudomonas marginalis</i>	Vesículas extracelulares, Células bacterianas completas	
Sidero lípido	Flavo lípido	<i>Flavobacterium</i> sp.	2 moléculas de Cadaverina	Ácido Cítrico

Los mismos pueden ser agregados al suelo por la adición directa de los biosurfactantes, por la siembra de los microorganismos productores o por promover a la comunidad microbiana autóctona al mejorar las condiciones para su producción en el suelo (Banat y col., 2000; Rahman y col., 2007; Van Hamme y Urban, 2009).

La aplicación de estos requiere tomar en cuenta ciertas consideraciones como el efecto y toxicidad en el resto de la comunidad microbiana, así como en las plantas y los animales, aunque la mayoría de los estudios han indicado que los biosurfactantes son menos o no tóxicos y no desmejoran la biodegradación de los contaminantes como lo puede hacer un surfactante sintético (Makkar y Rockne, 2003). Sin embargo, el uso de biosurfactantes puede afectar a la comunidad dado a que podría actuar como un competidor preferencial sobre los contaminantes orgánicos que se desean degradar (Banat y col., 2000; Christofi e Ivshina, 2002; Van Hamme y Urban, 2009). Por otra parte, varios biosurfactantes presentan actividad microbiana, aunque no todas las especies presentan igual sensibilidad, no obstante podría reducir la población responsable de la biorremediación (Lang y Wagner, 1993; Banat y col., 2000; Christofi e Ivshina, 2002; Van Hamme y Urban, 2009).

#### **4.1. Antecedentes en el uso de Biosurfactantes en la Biorremediación de suelos.**

Los biosurfactantes tienen un alto empleo en aplicaciones industriales, donde destaca su uso en la biorremediación. Churchill y col (1995), Desai y Banat (1997), Pacwa-Płociniczak y colaboradores (2011) reportan que la adición de biosurfactantes mejora la biodisponibilidad de hidrocarburos significativamente, resultando en una mejora en la tasa de crecimiento y degradación de los contaminantes por la comunidad bacteriana responsable de la degradación de hidrocarburos. Asimismo Desai y Banat (1997), Christofi e Ivshina (2002; 2005), Urum y Pekdemir (2004), Pacwa-Płociniczak y colaboradores (2011) destacan el potencial de los mismos para el lavado y movilización permitiendo la recuperación de hidrocarburos derramados en suelos.

Rahman y colaboradores (2002) evaluaron en pruebas *ex situ* la tasa de degradación de hidrocarburos con ramnolípidos demostrando que la misma aumenta al agregar nutrientes, un consorcio de bacterias degradadoras de hidrocarburos y por la aireación.

Araujo y colaboradores (2008) evaluaron el efecto de los biosurfactantes, con un cultivo mixto, en la recuperación de aguas contaminadas con crudo liviano, alcanzando una eficiencia máxima del 81% en la remoción de hidrocarburos totales con la presencia de los compuestos tenso – activos.

Desai y Banat (1997), Banat y colaboradores (2000), Christofi e Ivshina (2002), Urum y Pekdemir (2004), Pacwa-Płociniczak y colaboradores (2011) comparan el uso de surfactantes sintéticos y surfactantes origen biológico, al obtener resultados similares promueven el uso de los biosurfactantes como el método más efectivo en relación costo – beneficio, con la ventaja de ser menos tóxicos y persistentes en el ambiente.

Organismos productores de biosurfactantes han sido aislados de diversos ambientes, entre los que se encuentran suelos y agua con derrames con petróleo (Soberón-Chávez y Maier, 2011). Sulbarán y colaboradores (2005) observaron la producción de biosurfactantes tipo ramnolípido por parte de *P. aeruginosa* en estudios con emulsiones de petróleo pesado. Anandaraj y Thivakaran (2010) aislaron cinco microorganismos con el potencial de producir biosurfactantes a partir de una muestra de suelo con impacto por derrame, entre los que se encontró un aislado de *Pseudomonas* sp. con el potencial antes mencionado.

Haferburg y colaboradores (1986), Lang y Wagner (1993) reportan que varios biosurfactantes, como la surfactina, la viscosina y los ramnolípidos, presentan actividad antimicrobiana, al afectar la permeabilidad de la membrana o al producir la lisis de las células de las otras especies y así favorecer la colonización y desarrollo de la cepa productora sobre la comunidad. Asimismo, dentro de la actividad antibacteriana las bacterias Gram positivas son más sensibles que las bacterias Gram negativas a la presencia de los compuestos tenso – activos (Lang y col., 1989; Van Hamme y Urban, 2009).

Van Hamme y Urban (2009) indican que al favorecer la solubilización de los compuestos tóxicos en presencia del biosurfactante puede también afectar de forma negativa a la comunidad menos tolerante a los contaminantes.

## 5. Hipótesis

De acuerdo a trabajos previos sobre las comunidades bacterianas en suelos impactados por crudo, el presente estudio enmarcado en el proyecto Misión Ciencia “**Desarrollo, validación y transferencia de tecnologías para el saneamiento de fosas de hidrocarburos**” se basa en la siguiente hipótesis:

“La estructura funcional de la comunidad bacteriana de un suelo impactado por la presencia de hidrocarburos se verá alterada en comparación a una comunidad no impactada, a la vez que se propicia el desarrollo de los grupos funcionales tolerantes y

capaces de degradar los contaminantes, de esta manera se espera encontrar aislados con la capacidad de degradar sustratos complejos, crecer sobre hidrocarburos y producir biosurfactantes”.

Sobre esta hipótesis se plantearon los objetivos que se detallan a continuación.

### **III. OBJETIVOS**

#### **1. Objetivo General**

- Caracterizar funcionalmente la comunidad bacteriana heterotrófica cultivable, aislada del suelo de la zona de descarga de una fosa petrolera (Bare-9), con énfasis en el potencial para ser utilizada en procesos de biorremediación, según su capacidad para producir biosurfactantes.

#### **2. Objetivos Específicos**

1. Estimar la abundancia de la comunidad microbiana asociada a la fosa petrolera Bare-9.
2. Aislar y purificar las cepas bacterianas provenientes de muestras de la fosa petrolera Bare-9.
3. Construir un cepario de aislados bacterianos.
4. Caracterizar macro y micromorfológicamente las cepas aisladas de la comunidad bacteriana.
5. Caracterizar bioquímicamente la comunidad bacteriana heterotrófica sometiendo a las cepas a distintos sustratos carbonados que forman la materia orgánica en el suelo, haciendo énfasis en la capacidad de crecer sobre crudo y en la producción de biosurfactantes.
6. Determinar la estructura funcional de la comunidad bacteriana en base a las respuestas frente a los sustratos probados.
7. Comparar la comunidad bacteriana de la fosa y la comunidad bacteriana del suelo no impactado, cercano a la fosa.
8. Seleccionar los grupos funcionales con capacidad de producir biosurfactantes.
9. Realizar bioensayos para estimar la capacidad de las cepas seleccionadas para degradar hidrocarburos y moléculas modelo.
10. Evaluar la producción de biosurfactantes por parte de las cepas bacterianas.
11. Identificar características biocatalizadoras con potencial biotecnológico para la remediación de suelos contaminados con crudo extra pesado.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

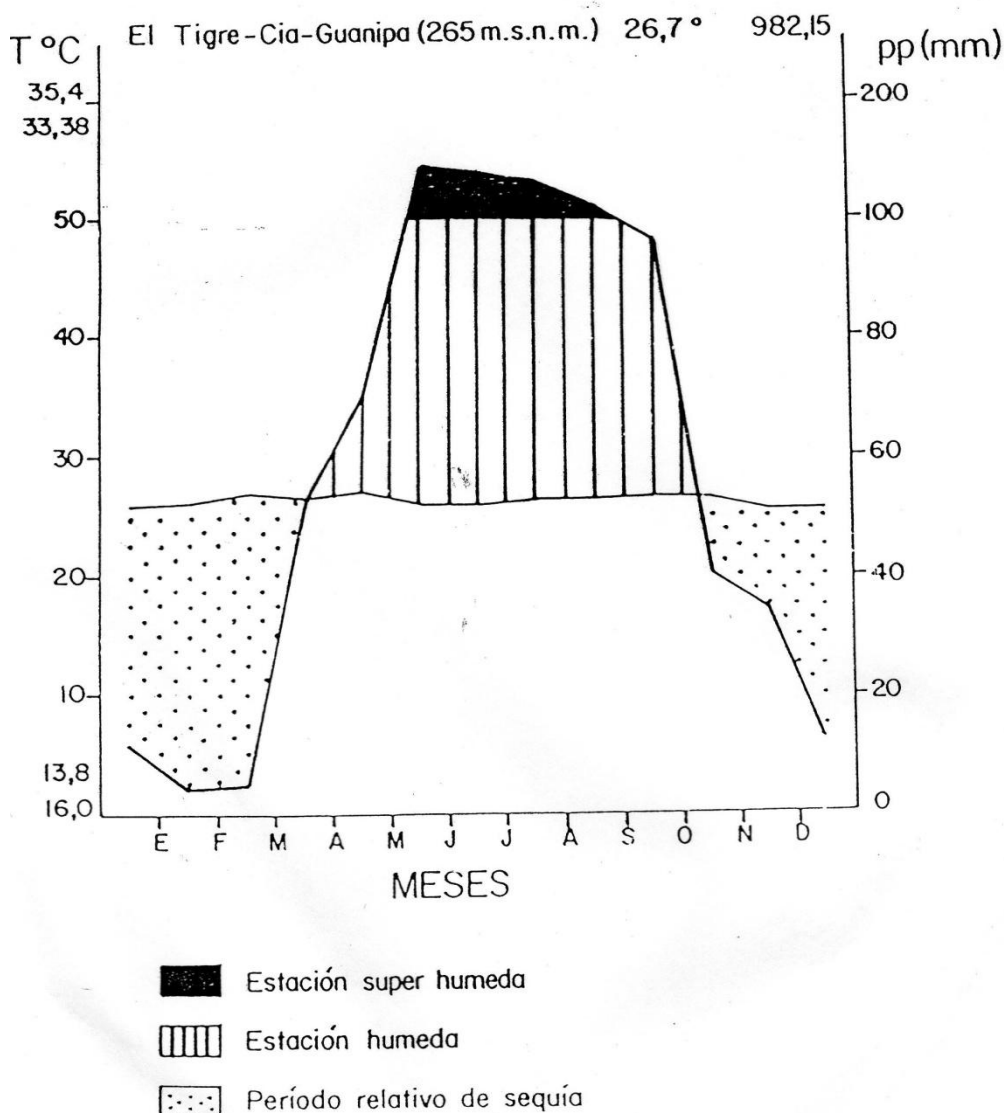
### **1. Métodos de Campo**

#### **1.1. Caracterización de la Zona de Estudio**

Selección de la Fosa: La fosa Bare-9 fue seleccionada dentro del estudio en el proyecto Misión Ciencia titulado “Desarrollo y Validación de Nuevas Tecnologías para el Saneamiento Ambiental de Pasivos Generados por la Actividad Petrolera”, dentro del subproyecto “Caracterización del Medio Físico Natural en Áreas Impactadas con Hidrocarburos”. Está activa desde hace diez años y contiene crudo extra pesado.

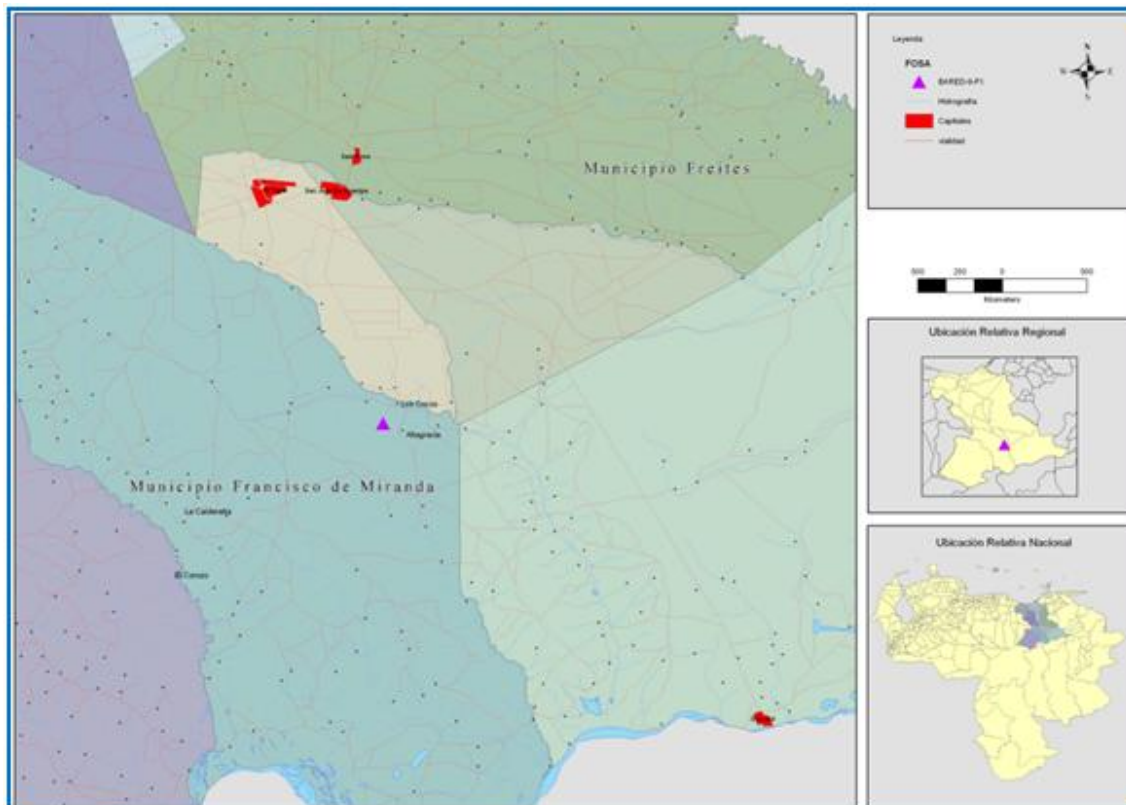
Se encuentra ubicada en el Distrito San Tomé, Estado Anzoátegui, pertenece a la región de la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO). La región está caracterizada por presentar altas temperaturas, con un promedio de 26,7°C, posee clima estacional, con un período de lluvia entre marzo a octubre y un período de sequía entre octubre y marzo, como se observa en el climadiagrama de la región (figura 5).

### Climograma de Gausson para la Estación El Tigre-Cia-Guanipa



**Figura 5:** Climadiagrama de la región, con la temperatura y la pluviosidad a lo largo del año (Tomado de LEPA – IZT, 1996).

La fosa está localizada a 8°34'18"N y 64°56'46"W. Posee 35 metros de ancho por 54 metros de largo y 1,4 metros de profundidad, con un volumen de 2646 metros cúbicos.



**Figura 6:** Ubicación geográfica de la fosa Bare-9. En el Distrito San Tomé, Estado Anzoátegui



**Figura 7:** Fotografía de la fosa, cerca del área de muestreo. (Foto del proyecto Misión Ciencia “Desarrollo y Validación de Nuevas Tecnologías para el Saneamiento Ambiental de Pasivos Generados por la Actividad Petrolera”. Tomada por Arturo Barrios)

Área de muestreo: Se realizó en la zona de descarga en el borde de la fosa (35 metros) y en la zona con vegetación paralela al largo de la fosa (54 metros).



**Figura 8:** Imágenes del área de muestreo. (A) La zona de descarga: A la izquierda imagen de la cuadrata B9I y a la derecha imagen de la cuadrata B9D. (B) Foto del área con vegetación. (Fotos del proyecto Misión Ciencia “Desarrollo y Validación de Nuevas Tecnologías para el Saneamiento Ambiental de Pasivos Generados por la Actividad Petrolera”. Tomadas por Arturo Barrios)

Características: El área de descarga presenta escasa vegetación, sin fauna aparente y presenta carretera cercana al sureste de la fosa, el suelo es de tipo franco-arenoso, la superficie del suelo presenta manchas de derrame petrolizadas. La zona con vegetación presenta abundante flora, principalmente pastos y arbustos además de árboles, la fauna está formada principalmente por insectos, el suelo es de tipo arenoso. El muestreo fue hecho en agosto que corresponde con la estación mas húmeda de la región (figura 5).

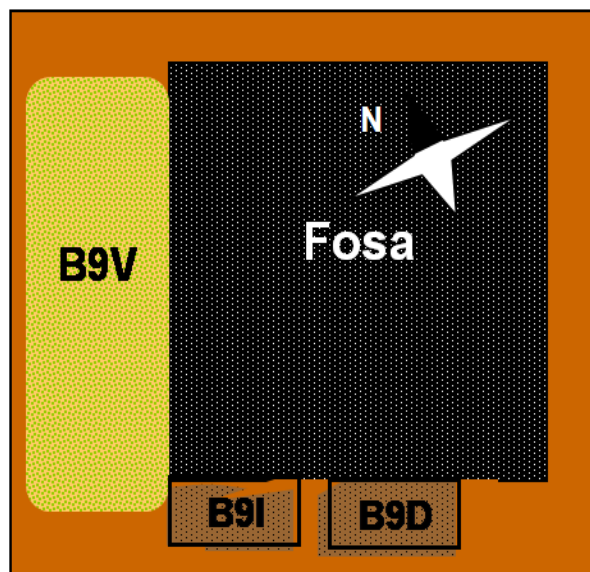
## 1.2. Toma de Muestras de suelo

Diseño Muestreal y Toma de Muestras: Como criterio para la selección del área, se utilizaron las zonas del borde de la fosa con evidencia de derrames, y la zona con

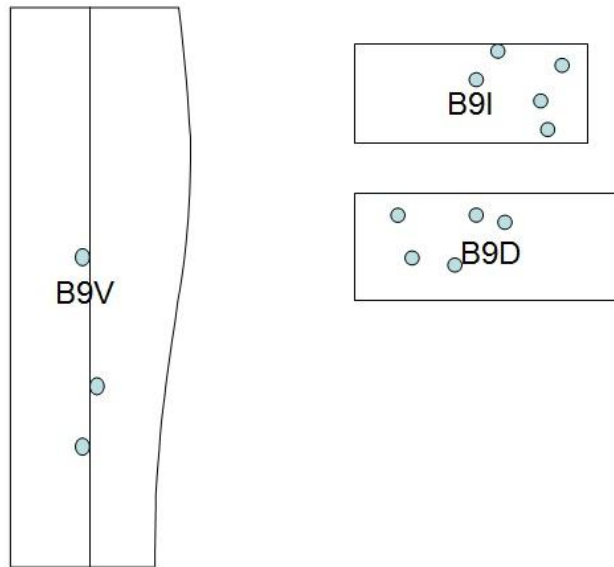


vegetación delimitándose así tres cuadratas, representadas en la figura 9A y denominadas de la siguiente manera:

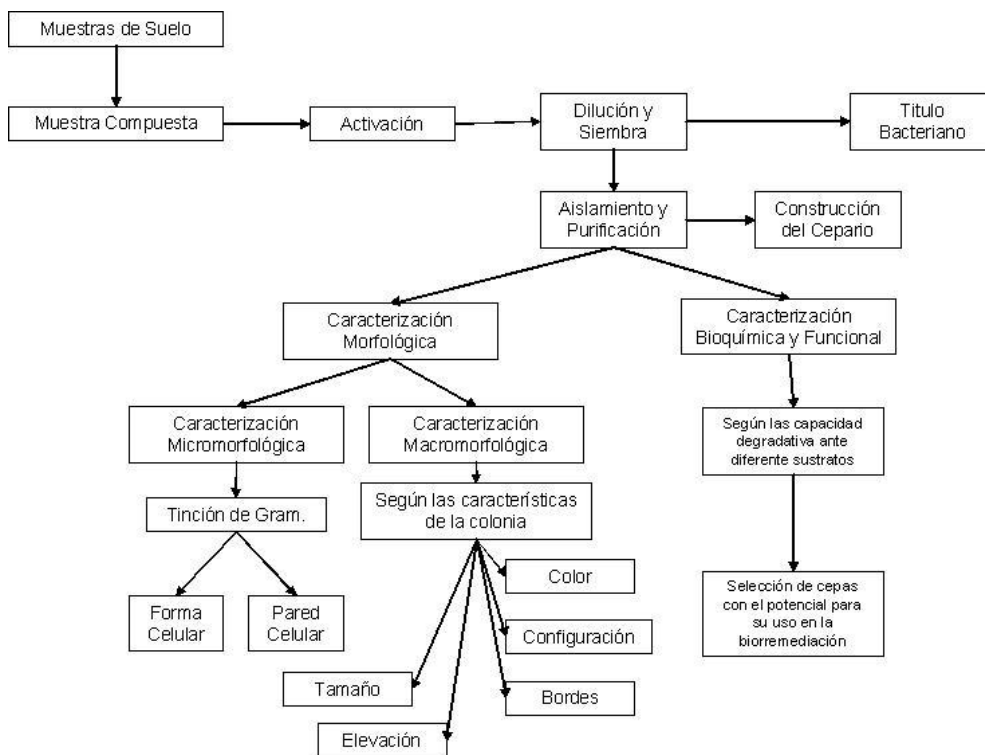
- B9I (6,5 metros de ancho por 2,8 metros largo)
  - B9D (7,57 metros de ancho por 3 metros)
  - B9V (zona con vegetación ubicada a lo largo de la fosa)
- A partir de las zonas delimitadas, con las dimensiones antes mencionadas se seleccionaron cinco puntos aleatorios dentro cada cuadrata y tres en la región con vegetación, representados en la figura 9B.
- La recolección fue por medio de CORE individuales previamente esterilizados de 12 cm de diámetro y 10 – 15 cm de profundidad.
- Las muestras fueron almacenadas en bolsas herméticas, previamente esterilizadas y transportadas al laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET) de la facultad de Ciencias de la U.C.V., donde se inició la parte experimental.



**Figura 9A:** Esquema de la fosa Bare-9 y de la ubicación de los sitios de muestreo. Se identifica la ubicación de las cuadratas B9I y B9D, en la zona de descarga y B9V como la zona adyacente a la fosa con vegetación.



**Figura 9B:** Esquema de los sitios de muestreo y puntos muestreados aleatoriamente. De la zona con vegetación B9V, ubicada a lo largo de la fosa y los tres puntos donde se tomaron las muestras. De la zona impactada, la cuadrata B9I de 6,5 metros de ancho por 2,8 metros largo y la cuadrata B9D de 7,57 metros de ancho por 3 metros, con los cinco puntos donde se tomaron las muestras en cada cuadrata.



**Figura 10:** Actividades realizadas en el laboratorio para la caracterización de la comunidad bacteriana. Se identifican trabajos y parámetros del análisis.

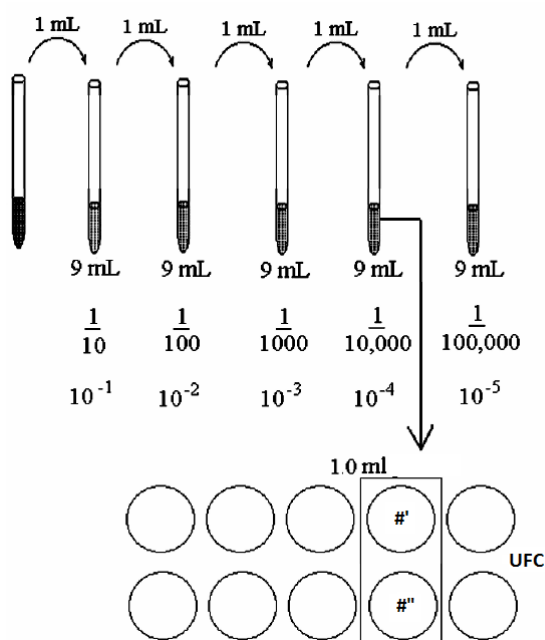
## 2. Métodos de Laboratorio

### 2.1. Caracterización de la Comunidad Bacteriana

Preparación de la muestra compuesta: Se preparó una muestra de 100 g por sitio muestreado, mezclando 20 g de cada core en las cuadratas experimentales (B9I y B9D) y 33,3 g de cada core del sitio con vegetación (B9V). Así, se consideró una muestra representativa para cada cuadrata, por medio de las muestras compuestas, sobre las que se hicieron los siguientes procedimientos microbiológicos.

Activación de las muestras: Las bacterias presentes en la muestra compuesta se activaron en Caldo Nutritivo por triplicado, en una proporción 5 gramos de la muestra en 100 ml. de Caldo Nutritivo, incubando a 37 °C por 24 horas.

Dilución y siembra: Se hicieron diluciones seriadas a las muestras activadas hasta la dilución de  $10^{-9}$  las cuales fueron sembradas por agotamiento en superficie y por inclusión en agar nutritivo (AN). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas y se determinó el título bacteriano mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en placas (Garassini, 1967; BBL, 1974; Araujo, 2004; Paulson, 2008).



**Figura 11:** Esquema de diluciones y siembra. Diluciones seriadas de 1/10; 1 ml de solución concentrada con 9 ml de solución salina; se llegó hasta la dilución de  $10^{-9}$ . La siembra fue por superficie e inclusión en agar nutritivo (Imagen de Paulson, 2008).

Aislamiento y Purificación: Debido a que las comunidades microbianas difieren en números y frecuencia de especies y la caracterización de la comunidad se basa en estudios morfológicos y fisiológicos de los aislados que la conforman, el análisis de la misma debe realizarse basándose en el uso de cultivos puros (Garassini, 1967; Zak y col., 1994; Malaver, 1996; López, 2002).

Para la evaluación de la estructura y diversidad de la comunidad se consideró una muestra compuesta por zona y se utilizaron 25 colonias por cada sitio las cuales fueron seleccionadas aleatoriamente. Los aislados se transfirieron varias veces en placas de agar nutritivo y se incubaron a 37 °C por 24 horas hasta verificar su pureza, por la caracterización macromorfológica y micromorfológica (Garassini, 1967; Parkinson y col., 1971).

Caracterización Macromorfológica y Micromorfológica: En la evaluación y clasificación de estos aislados se estudiaron sus características, tanto morfológicas como fisiológicas, para esto se realizó primero una caracterización macromorfológica, que se realizó mediante la descripción de las características de color, configuración, bordes, tamaño y elevación de las colonias (Garassini, 1967). La caracterización micromorfológica se realizó por el método de tinción de Gram, determinando por la tinción de las cepas el tipo de pared bacteriana y su forma celular (BBL, 1974).

Caracterización Bioquímica: Se refiere a las características fisiológicas correspondientes a las acciones funcionales sobre las sustancias que utilizan en su metabolismo; lo mismo que su relación biológica con el hombre, los animales y las plantas y la propiedad de fermentar los diferentes azúcares (Garassini, 1967).

Se consideraron sustratos que se encuentran en la materia orgánica en el suelo y por producto del derrame, así como características con el potencial biotecnológico. Se determinó mediante la respuesta y crecimiento de las cepas ante diferentes sustratos probados. Se resumen las pruebas en la tabla 2.

**Tabla 2:** Pruebas Bioquímicas.

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Medio Empleado</b>	<b>Identificación Positiva</b>	<b>Referencia</b>
<i>Fermentación de Azúcares simples</i>	Agar Hierro Kliger	Cambio de coloración por Indicador Rojo Fenol	McFaddin, 1978
<i>Degradación de Almidón</i>	Agar Almidón	Reacción con yodo	McFaddin, 1978
<i>Actividad Proteolítica</i>	Gelatina	Licuefacción de la gelatina	McFaddin, 1978
<i>Actividad Lipolítica</i>	Agar Tween 80	Producción de un halo	Slifkin, 2000
<i>Hidrólisis de la Urea</i>	Caldo Urea	Producción de amonio Cambio de coloración por Indicador	McFaddin, 1978
<i>Reducción del Nitrato</i>	Agar Nitratos	La producción de una coloración roja al presentar un revelante	McFaddin, 1978
<i>Mineralización de Fósforo Orgánico</i>	Agar Inositol Hexafosfato	Crecimiento	Peña, 2005
<i>Degradación de Celulosa</i>	Agar Celulosa (0,5%)	Crecimiento	Parkinson y col., 1971
<i>Degradación de Lignina</i>	Agar Lignina (0,5%)	Crecimiento	Parkinson y col., 1971
<i>Degradación de Quitina</i>	Agar ATS suplementado con Quitina al 0,1%	Presencia de un halo	Parkinson y col., 1971
<i>Degradación de Pectina</i>	Agar Pectina (0,5%)	Crecimiento	Antía, 1995
<i>Degradación de Petróleo</i>	Caldo Petróleo (1%)	Crecimiento	Peña, 2005;
<i>Degradación de Acetato</i>	Agar Acetato	Crecimiento	Corneo, 2001
<i>Actividad Hemolítica</i>	Agar Sangre	Producción de un halo de lisis	Youssef y col., 2004

## 2.2. Análisis Funcional

La caracterización funcional está definida por el número y tipo de fuentes de carbono utilizados por una muestra de la comunidad, para lo que se consideró el perfil fenotípico de las poblaciones aisladas previamente que fueron agrupadas en los denominados Grupos Funcionales (Garland y Mills, 1991; Zak y col., 1994; Malaver, 1996; López, 2002; Bastardo, 2005; Zamora, 2008).

Para comparar los aislados como grupos funcionales se creó una matriz de datos a partir de las pruebas bioquímicas antes mencionadas, donde las respuestas positivas (+) fueron transformadas en el número 1 y 0 cuando la respuesta era negativa (-), la matriz resultante es de  $S \times \tau$ , donde  $S$  corresponde al número de aislados y  $\tau$  a las pruebas bioquímicas o funcionales (Antía, 1995; Ricotta, 2005; Härdle y Simar, 2007; Zamora, 2008).

Con la matriz resultante se realizó un análisis multivariado de clúster y se empleó el programa PAST, Versión 2.02, con la técnica de agrupamiento del vecino más cercano a través de la distancia Euclidiana, lo que permitió separar los aislados según las distancias funcionales de las mismas (Ricotta, 2005; Härdle y Simar, 2007; Zamora, 2008).

A partir del análisis del clúster se obtuvo un agrupamiento de las cepas bacterianas en función de las características fenotípicas antes descritas, representadas mediante una gráfica, lo cual permitió caracterizar a los grupos funcionales (GF, número total de grupos formados) y a los grupos de identidad funcional (GIF, grupos funcionales que poseen las mismas características bioquímicas o cuya disimilitud es igual a cero), se obtuvo también la distancia máxima de agrupamiento (DMA, identificado por la disimilitud entre todos los grupos funcionales), así como el índice de diversidad funcional (IDF, relación entre el número total de grupos funcionales y el total de cepas) y el Índice de Importancia (Pi, relación entre el número de cepas dentro de un grupo de identidad funcional GIF y el total de cepas) (Malaver, 1996; Zamora, 2006; Domínguez, 2008; León, 2008; Zamora, 2008).

### **2.3. Caracterización de las Cepas con el Potencial de Interés Biotecnológico**

Para la selección final de las cepas bacterianas con el potencial de interés, se seleccionaron a los grupos funcionales con respuesta positiva a; la actividad hemolítica, debido a que es uno de los indicadores de producción de biosurfactante (Youssef y col., 2004); el crecimiento en caldo petróleo, como indicador de su potencial de tolerancia y capacidad de usar fracciones del crudo como fuente de materia y energía (Peña, 2005); la degradación de acetato y la actividad lipolítica, por la capacidad de introducir y metabolizar el acetato y lípidos para producir biosurfactantes (Hommel y Ratledge, 1993; Corneo, 2001); el crecimiento en lignina, debida a la estructura compleja y rica en grupos fenólicos que es análoga con un gran número de moléculas aromáticas tóxicas (Malaver, 1996; Iyer y Mahadevan, 2002).

Determinación de Producción de Biosurfactantes: Para evitar falsos positivos y falsos negativos, a los grupos funcionales preseleccionados se les discriminó la capacidad de producir biosurfactantes de la siguiente manera:

#### Según su capacidad de producir espuma:

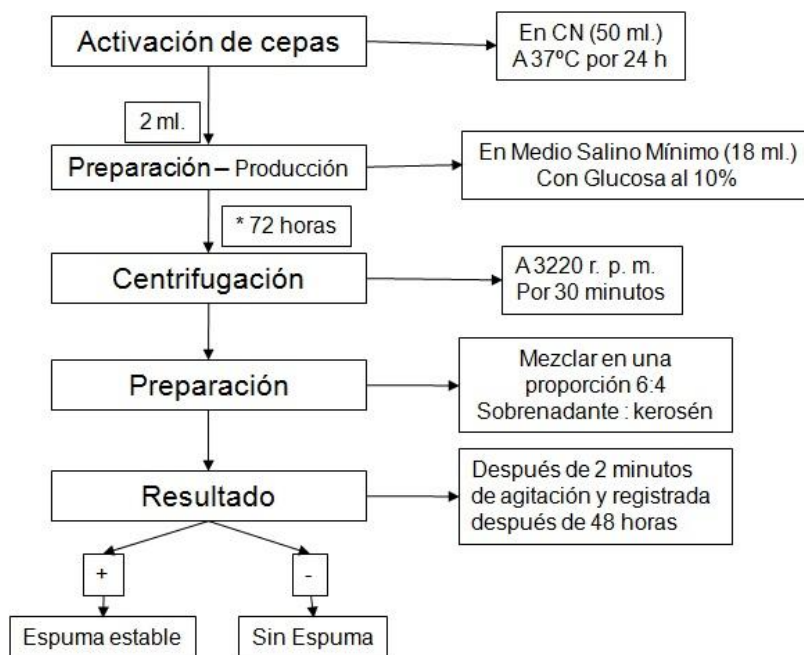
Debido a que la respuesta positiva de los aislados a las actividades bioquímicas antes mencionadas sólo indica que existe el potencial de producir compuestos tenso – activos y de degradar contaminantes, se profundizó el análisis y se seleccionaron aquellas cepas con el potencial de producir biosurfactantes dada la capacidad de formar espuma.

- a) **Preparación de los inóculos:** Los grupos funcionales fueron activados en 50 ml de caldo nutritivo (CN) previamente esterilizado por autoclave e incubadas a 37°C durante 24 horas. Se tomó una alícuota de 2 ml y se mezcló en 18 ml de Medio Salino Mínimo con glucosa al 10% del volumen final como fuente de carbono. Las mismas fueron incubadas a temperatura ambiente con agitación por tres días.
- b) **Clasificación de posibles productoras de biosurfactantes:** Los grupos funcionales fueron discriminados según la capacidad de producir espuma en; (I) no productoras, (II) medianamente productoras y (III) productoras de espuma. Las fiolas con espuma (II y III) fueron centrifugadas a 3220 r. p. m. durante 30 minutos, se guardó el sobrenadante y se le determinó la actividad emulsificante.

#### Según su actividad emulsificante:

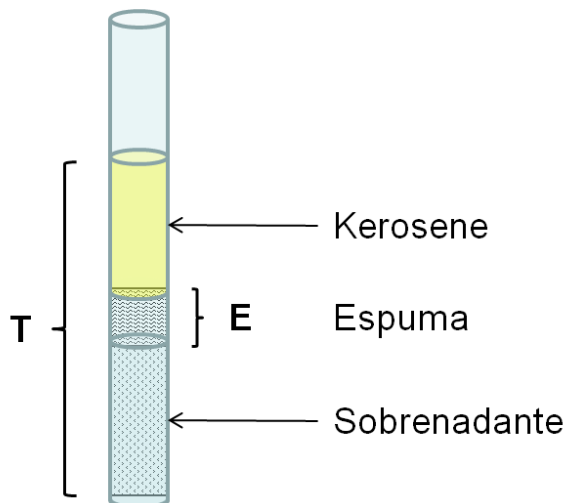
Se discriminaron las cepas productoras de espumas según la formación de una emulsión estable en el tiempo, como un indicador del potencial tenso – activo del compuesto (Cooper y Goldenberg, 1987). Así diferenciar los grupos funcionales que resultaron falsos positivos, evaluar la capacidad de disminuir la tensión superficial, dada la formación y estabilidad de espuma en el tiempo con el kerosén, y fue utilizado como criterio de selección para los bioensayos de las cepas productoras de biosurfactantes.

- c) **Actividad Emulsificante:** La actividad emulsificante se determinó mediante el índice de emulsión ( $E_{24}$ ) al mezclar 4 ml del sobrenadante anterior con 6 ml de kerosén. Se consideró como respuesta positiva la formación de espuma estable entre las dos fases (orgánica con kerosene y acuosa con el sobrenadante) tras 2 minutos de agitación en vortex, se consideró la estabilidad en el tiempo al repetir la evaluación a las 48 horas (Cooper y Goldenberg, 1987; Sulbaran y col., 2005; Chen y col., 2007; León, 2008).



**Figura 12:** Preparación de cepas con potencial de producir biosurfactantes y determinación de su actividad emulsificante.

El índice de emulsión ( $E_{24}$ ) es la altura de la capa de emulsión (E), dividido por la altura total (T) y multiplicado por 100.



**Figura 13:** Esquema del ensayo de actividad emulsificante, utilizando kerosene. Se destacan los parámetros para calcular el índice  $E_{24}$ ; la altura de la capa de emulsión (E) y la altura total (T).

$$E_{24} = \frac{E}{T} \times 100$$

**Ecuación 1:** El índice de emulsión ( $E_{24}$ )



Potencial para Degradar Moléculas Modelo: A todas las cepas con el potencial de producir biosurfactantes se les evaluó el potencial de degradar moléculas modelo. Se utilizaron las siguientes moléculas Fenantreno, 9-Metil-Antraceno, Naftaleno, Pireno, Etil-Naftaleno, Diantreno, Naphthol, Pyrogallol y DBT, como única fuente de carbono sobre agar Bushnell-Haas con el protocolo de Kiyohara y col (1982): se utilizó la técnica de sublimación de los sustratos con la placa invertida para suministrar las moléculas, se incubó por dos semanas a 30°C y se evaluó el resultado por la formación de un halo oscuro alrededor de las colonias.

Bioensayos de producción de biosurfactantes: Se utilizó como criterio de selección la actividad emulsificante con un índice de emulsificación mayor al 40% y con un tiempo de duración mayor a las 48 horas, a estos grupos funcionales se les realizaron los bioensayos para evaluar la producción de biosurfactantes en YPG, PPGAS y otras fuentes de carbono, como glicerina y kerosene.

**Producción de biosurfactantes**: Los aislados fueron cultivados por duplicado por cada tiempo en 100 ml de medio YPG (León, 2008), PPGAS (Zhang y Miller, 1992) y en medio salino mineral SWF con glicerina y kerosene como fuentes de carbono (Deziel y col., 1996), a temperatura ambiente con agitación a 150 r. p. m. por siete días (Sulbaran y col., 2005; Chen y col., 2007; León, 2008). Se midió el índice de emulsión ( $E_{24}$ ) del sobrenadante a las 24 horas, a los 3 y a los 7 días (Rodriguez y col., 2006; León, 2008).

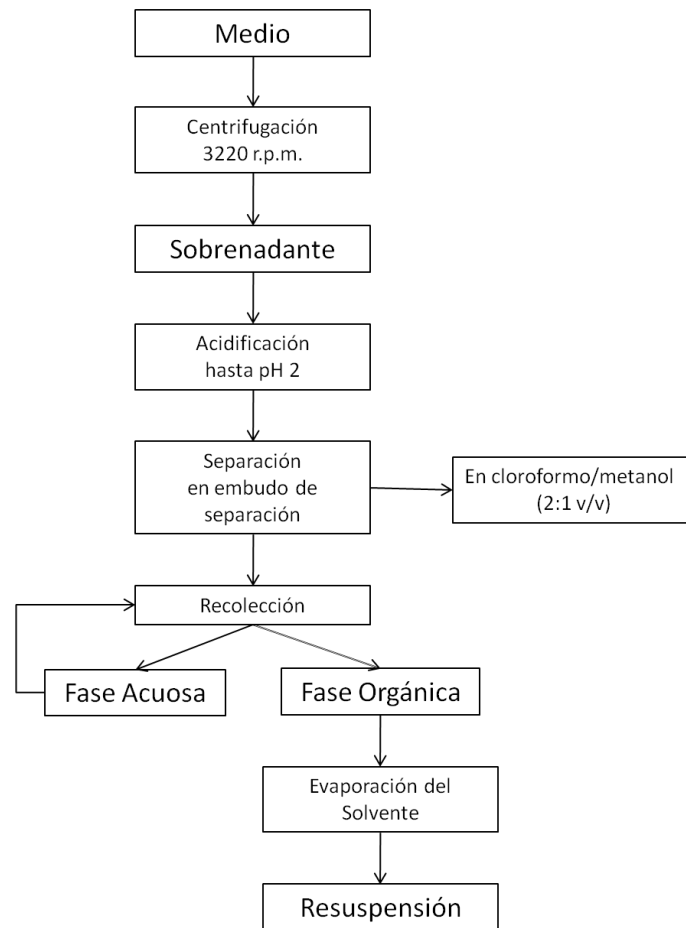
**Tabla 3:** Medios utilizados en la producción de biosurfactantes. (Medio YPG según León (2008), medio PPGAS según Zhang y Miller (1992) y el medio SWF según Deziel y col. (1996))

YPG		PPGAS		SWF	
Extracto de levadura	1%	NH <sub>4</sub> Cl	0,02M	CaCl <sub>2</sub>	0,01g/L
Peptona	2%	KCl	0,02M	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4g/L
Glucosa	2%	Tris-HCl	0,02M	NaNO <sub>3</sub>	2g/L
		Glucosa	0,5%	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9 g/L
		Proteosa – Peptona	1%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 g/L
		MgSO <sub>4</sub>	0,0016M	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10mg/L
				Solución II	2ml por litro
				MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,5g/L
				(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,6g/L

Evaluación de la producción y caracterización de biosurfactantes: Se determinó el tipo de biosurfactante según las características de los aislados bacterianos a aquellos aislados que cumplían el criterio de selección antes mencionado ( $E_{24} > 40\%$ ).

Para el caso de los ramnolípidos, de *Pseudomonas aeruginosa*, se realizaron diluciones y se determinó la concentración del compuesto por medio la determinación de ramnosa. También se determinó la tensión superficial y su concentración micelar crítica (CMC).

- a) Purificación del ramnolípido: El biosurfactante fue purificado según el método de Zhang y Miller (1992) modificado; la limpieza de células y recuperación del sobrenadante fue por centrifugación a 3220 r. p. m. Los sobrenadantes fueron acidificados con HCL hasta obtener un pH igual a 2. Los biosurfactantes fueron extraídos con un volumen de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v), dos veces y recuperando la fase orgánica. Los extractos orgánicos fueron evaporados y resuspendidos en 6 ml de bicarbonato a 0,05 M.

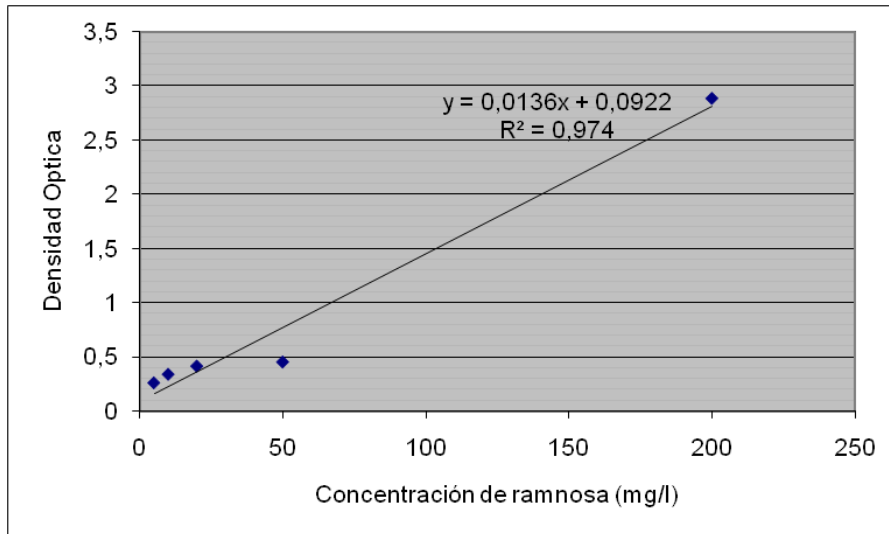


**Figura 14:** Esquema de purificación de biosurfactantes, a partir del medio de cultivo hasta el compuesto puro.

b) Determinación de Ramnosa: Se utilizó el método con orcinol de Deziel y colaboradores (1996) para determinar la concentración de ramnosa y la concentración del ramnolípido, expresada como equivalentes de ramnosa, por medio de una curva de regresión de ramnosa.

- Se hicieron diluciones sucesivas con factor de dilución de  $\frac{1}{2}$ . Se consideró desde la muestra pura hasta la dilución 1/1024. El volumen total fue de 6 ml, para poder utilizar 3 ml en las mediciones siguientes.
- Por cada punto de la curva y de las diluciones se tomaron 0,2 ml, los cuales fueron tratados con 100 mg de orcinol y 1,8 ml de ácido sulfúrico al 53%, formando una mezcla amarilla con un volumen final de 2 ml. Esta mezcla que fue hervida por 20 minutos en campana y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se determinó la densidad óptica a los  $\lambda=421$  nm. La regresión resultó con un  $R^2$  de 0,97 y la ecuación resultó la siguiente:

D.O. = 0,0136 [R] + 0,0922, donde [R] es la concentración de ramnosa y D.O. es la densidad óptica obtenida.



**Figura 15:** Curva de regresión de ramnosa. Ecuación para la regresión de DO a concentración de ramnosa en mg/l, para determinar la concentración de ramnolípidos por la concentración de equivalentes en ramnosa.

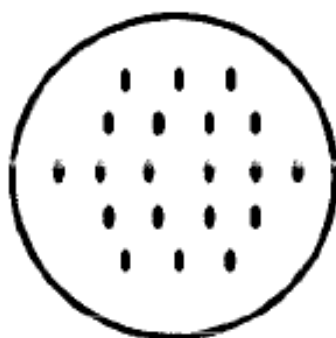
- c) Determinación de la Tensión Superficial: Se determinó la tensión superficial de cada dilución de la muestra del biosurfactante por medio del método de la gota colgante (Camejo, 2005), utilizando el Tensiómetro de gota del laboratorio de Espectroscopia Láser de la escuela de química de la UCV. Se utilizaron las mismas muestras en la determinación de ramnolípidos vista como ramnosa equivalente, desde la muestra pura hasta la dilución 1/1024 y se realizó una curva de Tensión Superficial vs concentración de ramnosa.

Determinación de la toxicidad de los biosurfactantes: Se determinó el efecto de los biosurfactantes en la biota a diferentes concentraciones utilizando el ensayo de Sobrero y Ronco (2004). Como indicador de germinación y desarrollo se utilizaron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) acorde el manual EPA OPPTS 850.4200 (USEPA, 1996).

Las pruebas de fitotoxicidad fueron realizadas por triplicado con el sobrenadante libre de células, la toxicidad fue medida en términos de la inhibición de la germinación y de la elongación del hipocotilo y de la radícula de la raíz de semillas de tomate, de la

variedad Rio Grande (E.E.U.U.), provenientes del Semillero Nacional, con una viabilidad del 99%.

Para la determinación de la toxicidad se evaluó el desarrollo y germinación de 20 semillas de tomate en cada capsula de Petri; las mismas fueron colocadas sobre papel de filtro como se ejemplifica en la figura 16, empapadas con la dilución de la muestra a evaluar y recubiertas con otro papel de filtro humedecido con agua para conservar la humedad; el papel de filtro fue empapado con 4 ml de la muestra y 5 ml en las muestras con 1% v/v y 3% v/v por efecto de cálculo; las diluciones evaluadas fueron al 1%, 3%, 10%, 30%, 50% y 100% v/v del sobrenadante y el control formado por agua, los volúmenes considerados se expresan en la tabla 4.



**Figura 16:** Esquema de distribución de las semillas sobre el papel de filtro dentro de la capsula de Petri (Imagen de Sobrero y Ronco (2004)).

**Tabla 4:** Tabla de volúmenes para las diluciones evaluadas.

<b>Dilución</b> (% v/v)	<b>Sobrenadante</b> (ml)	<b>Agua</b> (ml)	<b>Volumen final</b> (ml)
<b>0% (Control)</b>	0 ml	4 ml	4 ml
<b>1% v/v</b>	0,05 ml	4,95 ml	5 ml
<b>3% v/v</b>	0,15 ml	4,85 ml	5 ml
<b>10% v/v</b>	0,4 ml	3,6 ml	4 ml
<b>30% v/v</b>	1,2 ml	2,8 ml	4 ml
<b>50% v/v</b>	2 ml	2 ml	4 ml
<b>100% v/v</b>	4 ml	0 ml	4 ml

A partir del desarrollo de las semillas se determinó el efecto de toxicidad mediante el Porcentaje relativo de Germinación de Semilla (% RSG), el Porcentaje Relativo del Crecimiento de la raíz (% RRG) y el Porcentaje del Índice de Germinación (% IG) (Courtney y Mullen, 2009), así como el Índice de Toxicidad (IT) (Pernía y col 2010), con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ RSG} = \frac{\# \text{ Semillas Bajo Tratamiento Germinadas} \times 100}{\# \text{ Semillas Control Germinadas}}$$

**Ecuación 2:** Porcentaje relativo de Germinación de Semilla (RSG)

$$\% \text{ RRG} = \frac{\text{Longitud Promedio de la raíz (Semilla bajo Tratamiento)} \times 100}{\text{Longitud Promedio de la raíz (Semilla Control)}}$$

**Ecuación 3** Porcentaje Relativo del Crecimiento de la raíz (RRG)

$$\% \text{ IG} = \frac{\text{RSG} \times \text{RRG}}{100}$$

**Ecuación 4:** Porcentaje del Índice de Germinación (IG)

$$IT = 100 - \left( \frac{SM}{SC} \left( \frac{\frac{IRM}{IRC} + \frac{IHM}{IHC}}{2} \right) 100 \right)$$

Donde:

SM: Número de semillas germinadas de la muestra.

SC: Número de semillas germinadas del control

IRM: Longitud de la radícula de la muestra

IRC: Longitud de la radícula control

IHM: Longitud del hipocotilo de la muestra

IHC: Longitud del hipocotilo control

**Ecuación 5:** Índice de Toxicidad

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. La abundancia de la comunidad bacteriana

En la tabla 5 se observa que la mayor abundancia fue del orden de  $10^{14}$  UFC/g de suelo y se registró en la zona con vegetación (B9V), seguido de una abundancia intermedia del orden de  $10^{11}$  UFC/g de suelo en la zona de descarga B9I y finalmente la menor densidad bacteriana se determinó en la zona B9D con valores del orden de  $10^9$  UFC/g de suelo. Valores de abundancia del orden de  $10^{10}$  UFC/g se encuentran cuando la comunidad bacteriana está asociada a raíces de plantas (Hallmann y Berg, 2006), sin embargo estos valores son superiores a los esperados en suelo ( $\approx 10^9$  UFC/gr) (Atlas y Bartha, 2002, Casanova, 2005).

Salas (2010) realizó la caracterización de la comunidad bacteriana y fúngica en tres zonas sin derrame circundantes a la fosa Bare 9 y reporta abundancias que corresponden con estos valores de altas densidades. Estas elevadas abundancias pueden ser atribuidas al incremento de la carga en materia orgánica por los hidrocarburos, la cual favorece a las poblaciones con capacidad de degradar los hidrocarburos y de tolerar las condiciones de toxicidad (Tezuka, 1969; Horowitz y Atlas, 1977; Song y Bartha, 1990; Atlas y Bartha, 2002).

**Tabla 5:** Densidad Bacteriana de las zonas de descarga B9I y B9D y de la zona con vegetación B9V.

	Zona	B9I	B9D	B9V
Densidad (UFC/gr.)	SUPERFICIE	$5,52 \cdot 10^{11} + 2,23 \cdot 10^{11}$ (b)	$2,8 \cdot 10^9 + 0,7 \cdot 10^9$ (c)	$1,6 \cdot 10^{14} + 0,6 \cdot 10^{14}$ (a)
	INCLUSION	$7 \cdot 10^{10} + 1,8 \cdot 10^{10}$ (b)	$1,5 \cdot 10^{10} + 0,2 \cdot 10^{10}$ (c)	$5,2 \cdot 10^{12} + 1,4 \cdot 10^{12}$ (a)

### 2. Caracterización macro y micromorfológica de la comunidad.

Para la caracterización de la comunidad se seleccionaron aleatoriamente 25 de colonias por cada zona, según propiedades como el color, configuración, borde, elevación y tamaño de las colonias y se verificó que el cultivo estuviera puro a través de la caracterización micromorfológica, al observar la forma celular y el tipo de pared celular de las cepas aisladas. Los resultados están expresados en la tabla 6a para la zona B9I, 6b para la zona B9D y 6c para la zona B9V.

En las tres zonas evaluadas predominaron colonias con el morfotipo de color blanco, la zona B9D presentó la mayor variedad de morfotipos, seguido de la zona B9V

y la menor variedad de morfotipos la presentó la zona B9I. Se espera que la diversidad de morfotipos corresponda a la diversidad bacteriana.

**Tabla 6a:** Morfotipos de las colonias aisladas en la zona B9I:

Aislado	Color	Aspecto	Configuración	Borde	Elevación	Tamaño
B9I1	Blanco	Sólido	Complejo	Peludo	Montuoso	Mediano
B9I2	Blanco	Sólido	Complejo	Peludo	Montuoso	Mediano
B9I3	Blanco	Sólido	Complejo	Peludo	Montuoso	Mediano
B9I4	Blanco	Sólido	Complejo	Peludo	Montuoso	Pequeño
B9I5	Blanco	Sólido	Complejo	Peludo	Montuoso	Pequeño
B9I6	Crema	Claro	Redondo	Liso	En relieve	Mediano
B9I7	Blanco	Traslúcido	Irregular	Lobulado	En relieve	Pequeño
B9I8	Blanco	Traslúcido	Irregular	Lobulado	En relieve	Pequeño
B9I9	Blanco	Traslúcido	Irregular	Peludo	En relieve	Pequeño
B9I10	Blanco	Traslúcido	Irregular	Lanudo	En relieve	Pequeño
B9I11	Blanco	Traslúcido	Irregular	Liso	En relieve	Pequeño
B9I12	Blanco	Traslúcido	Irregular	Lanudo	En relieve	Pequeño
B9I13	Blanco	Traslúcido	Irregular	Peludo	En relieve	Pequeño
B9I14	Blanco	Traslúcido	Irregular	Liso	En relieve	Mediano
B9I15	Crema	Claro	Irregular	Peludo	En relieve	Grande
B9I16	Crema	Amarillo	Redondo	Liso	Concavo	Mediano
B9I17	Crema	Claro	Irregular	Liso	En relieve	Mediano
B9I18	Crema	Traslúcido	Concentrico	Ondulado	Umbonado	Pequeño
B9I19	Blanco	Traslúcido	Irregular	Lobulado	Umbonado	Pequeño
B9I20	Azul	Tornasol	Irregular	Irregular	En relieve	Pequeño
B9I21	Azul	Claro	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9I22	Crema	Claro	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9I23	Crema	Tornasol	Redondo	Lobulado	Umbonado	Mediano
B9I24	Azul	Amarillento	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9I25	Azul	Tornasol	Redondo	Lobulado	Umbonado	Pequeño
B9I26	Azul	Claro	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9I27	Amarillo	Claro	Redondo	Peludo	En relieve	Pequeño
B9I28	Crema	Amarillento	Redondo	Peludo	En relieve	Pequeño

**Tabla 6b:** Morfotipos de las colonias aisladas en la zona B9D:

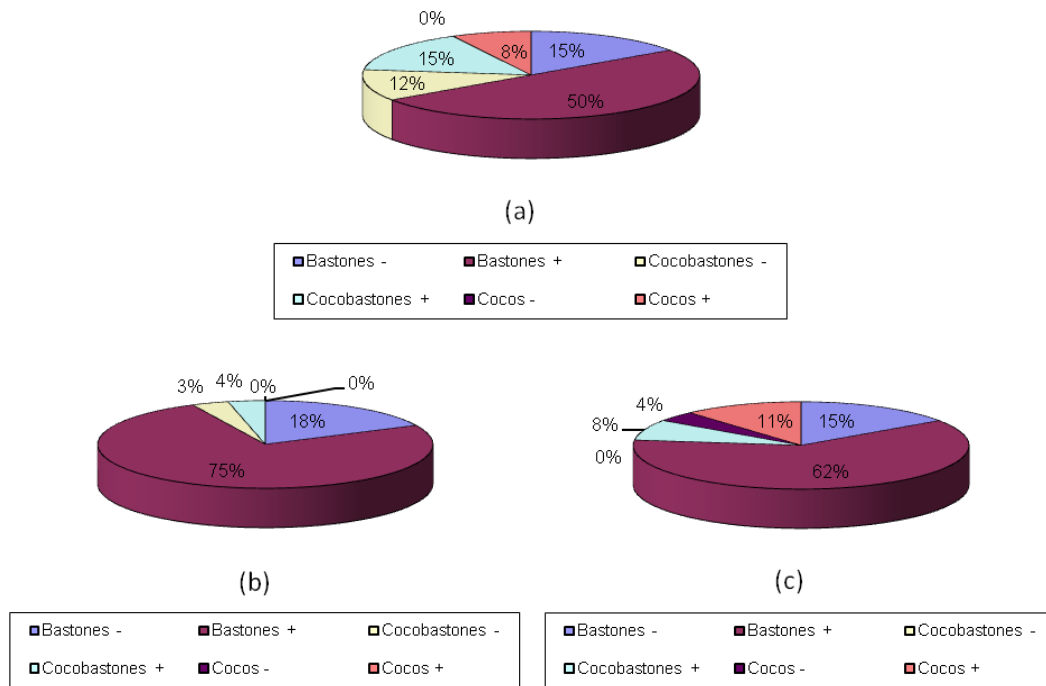
Aislado	Color	Aspecto	Configuración	Borde	Elevación	Tamaño
B9D1	Amarillo	Traslúcido	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9D2	Amarillo	Brillante	Concentrico	Liso	En relieve	Pequeño
B9D3	Amarillo	Tornasol	Redondo	Liso	En relieve	Mediano
B9D4	Azul	Traslúcido	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9D5	Amarillo	Traslúcido	Irregular	Lobulado	Umbonado	Mediano
B9D6	Amarillo	Traslúcido	Concentrico	Liso	En relieve	Mediano
B9D7	Azul	Amarillento	Concentrico	Liso	Umbonado	Mediano
B9D8	Blanco	Traslúcido	Irregular	Lobulado	En relieve	Mediano
B9D9	Amarillo	Traslúcido	Concentrico	Liso	Umbonado	Mediano
B9D10	Blanco	Tornasol	Redondo	Peludo	Concavo	Pequeño
B9D11	Amarillo	Tornasol	Concentrico	Liso	Umbonado	Pequeño
B9D12	Azul	Traslúcido	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9D13	Blanco	Sólido	Redondo	Liso	Concavo	Pequeño
B9D14	Blanco	Claro	Concentrico	Liso	Montuoso	Mediano
B9D15	Blanco	Traslúcido	Redondo	Liso	Concavo	Pequeño
B9D16	Amarillo	Brillante	Redondo	Liso	Concavo	Pequeño
B9D17	Blanco	Sólido	Redondo	Liso	En relieve	Pequeño
B9D18	Blanco	Claro	Redondo	Lobulado	En relieve	Pequeño
B9D19	Blanco	Mate	Complejo	Lobulado	Montuoso	Pequeño
B9D20	Blanco	Sólido	Redondo	Lobulado	En relieve	Pequeño
B9D21	Amarillo	Mate	Redondo	Liso	Concavo	Pequeño
B9D22	Blanco	Mate	Redondo	Liso	Concavo	Pequeño
B9D23	Blanco	Sólido	Irregular	Lobulado	En relieve	Pequeño
B9D24	Blanco	Sólido	Redondo	Liso	Umbonado	Mediano
B9D25	Amarillo	Tornasol	Concentrico	Liso	En relieve	Mediano



**Tabla 6c:** Morfotipos de las colonias aisladas en la zona B9V:

Aislado	Color	Aspecto	Configuración	Borde	Elevación	Tamaño
B9V1	Blanco	Traslúcido	Redondo	Peludo	Concavo	Pequeño
B9V2	Azul	Traslúcido	Redondo	Lobulado	Umbonado	Pequeño
B9V3	Crema	Claro	Redondo	Lobulado	Umbonado	Pequeño
B9V4	Blanco	Traslúcido	Redondo	Peludo	Umbonado	Pequeño
B9V5	Blanco	Traslúcido	Irregular	Peludo	En Relieve	Pequeño
B9V6	Blanco	Traslúcido	Irregular	Peludo	En Relieve	Pequeño
B9V7	Blanco	Traslúcido	Redondo	Liso	En Relieve	Pequeño
B9V8	Crema	Traslúcido	Redondo	Lobulado	En Relieve	Mediano
B9V9	Blanco	Mate	Redondo	Liso	En Relieve	Pequeño
B9V10	Blanco	Brillante	Redondo	Lobulado	En Relieve	Pequeño
B9V11	Crema	Traslúcido	Concentrico	Liso	En Relieve	Mediano
B9V12	Crema	Claro	Irregular	Liso	En Relieve	Pequeño
B9V13	Crema	Beige	Redondo	Liso	Concavo	Pequeño
B9V14	Blanco	Mate	Concentrico	Olas	Concavo	Mediano
B9V15	Blanco	Mate	Irregular	Peludo	En Relieve	Mediano
B9V16	Blanco	Brillante	Concentrico	Liso	Umbonado	Pequeño
B9V17	Blanco	Brillante	Irregular	Lobulado	En Relieve	Mediano
B9V18	Blanco	Traslúcido	Redondo	Liso	En Relieve	Pequeño
B9V19	Crema	Traslúcido	Redondo	Peludo	En Relieve	Pequeño
B9V20	Crema	Amarillento	Redondo	Liso	En Relieve	Pequeño
B9V21	Amarillo	Crema	Concentrico	Lobulado	En Relieve	Pequeño
B9V22	Azul	Tornasol	Redondo	Peludo	En Relieve	Pequeño
B9V23	Crema	Amarillento	Redondo	Liso	En Relieve	Pequeño
B9V24	Blanco	Traslúcido	Redondo	Lobulado	En Relieve	Pequeño
B9V25	Amarillo	Blanco	Redondo	Liso	Concavo	Mediano

La caracterización micromorfológica (figura 16) mostró que la forma celular predominante fueron los bastones Gram positivos, con valores de 50% en la zona B9I, de 74% en B9D y 62% en B9V, seguido de los bastones Gram negativos, con un porcentaje de 15% en las zonas B9I y B9V y de 18% en la zona B9D. La mayor diversidad de formas celulares se presentó en la zona de descarga B9I, donde se observaron tanto cocobastones positivos como negativos y en menor proporción cocos positivos, seguido en diversidad de formas celulares por la zona con vegetación (B9V), donde se observaron cocos positivos y negativos y cocobastones positivos. Asimismo en la zona de descarga B9I se encontró un consorcio bacteriano formado por formas celulares tipo coco junto con cocobastones ambas Gram positivas, en la zona B9D se encontraron tres consorcios bacterianos, dos formados por bastones Gram negativos junto con Gram positivos y un tercero formado por bastones Gram positivos y cocobastones Gram negativos, por último la zona con vegetación (B9V) se incluye sólo un consorcio, de bastones Gram negativos y Gram positivos.



**Figura 17:** Gráficos de Porcentaje (%) de cepas según tipo celular en la Zona de Descarga y la Zona con Vegetación de la Fosa, (a) **Zona de descarga B9I**, se incluye un consorcio, (b) **Zona de descarga B9D**, se incluye tres consorcios (c) **Zona identificada como B9V**, se incluye un consorcio.

Los resultados muestran que en las tres comunidades predominan los bastones Gram positivos (Figura 17), lo cual coincide con lo reportado por Salas (2010) para esta misma zona adyacente a la fosa Bare 9. Sin embargo, diferentes estudios reportan que en suelos de sabana y en suelos impactados por hidrocarburos predominan los bastones Gram negativos, debido a la característica de la membrana externa que recubre a este tipo de forma celular, la cual actúa como tamiz y es de baja permeabilidad a moléculas hidrófobas (Sikkema y col., 1995; Atlas y Bartha, 2002; Casanova 2005; Peña, 2005; León, 2008; Domínguez, 2008).

Las diversidad de formas celulares entre los distintos sitios puede deberse a las diferencias al uso y condición que afectan cada zona como la vegetación en la zona B9V, el acceso a la carretera y el consiguiente mayor volumen de descarga por la zona B9D que en la zona B9I mas el hecho de que la zona con vegetación estaba próxima con la zona B9I.

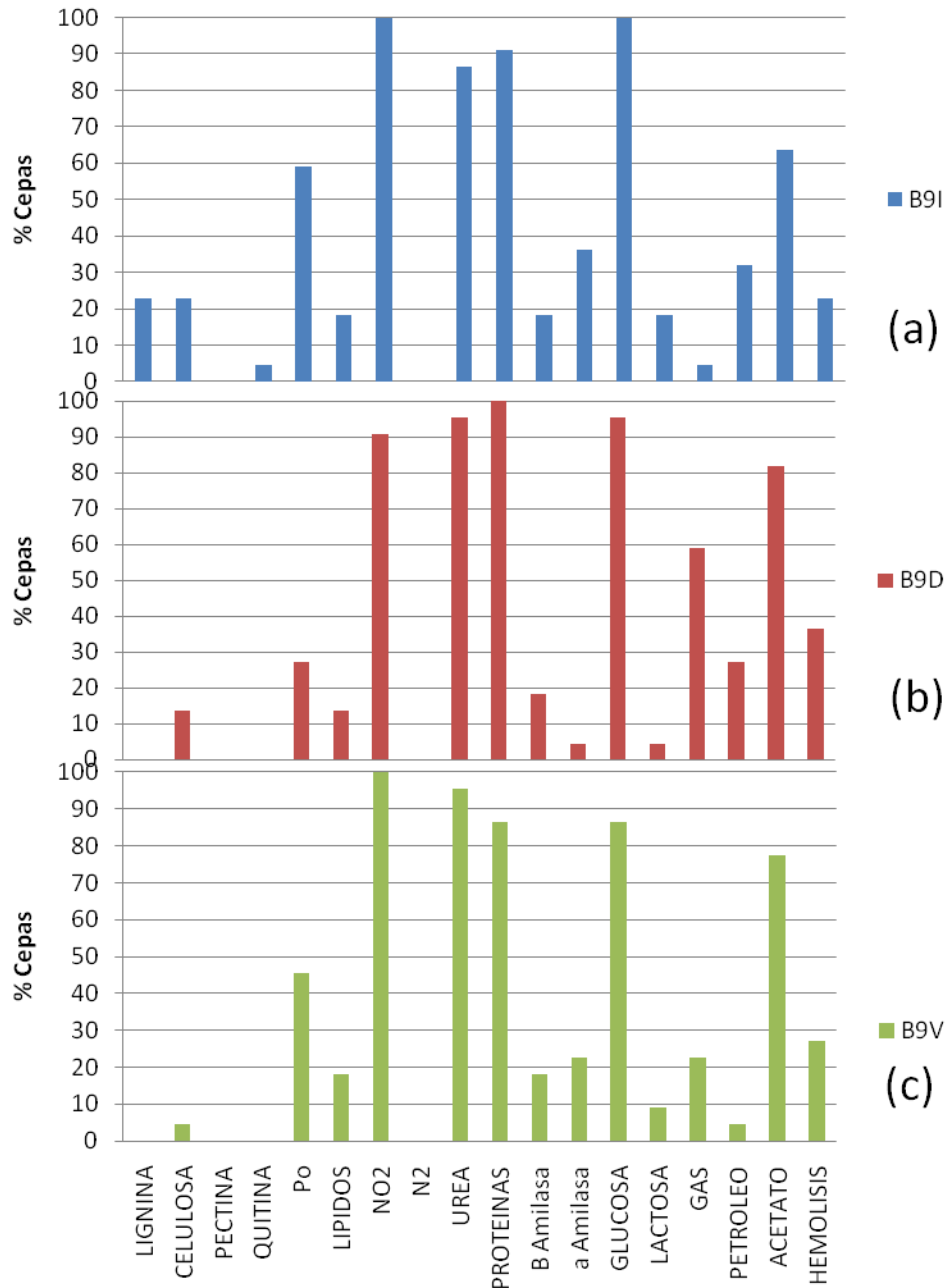
El predominio de bastones Gram positivos puede ser atribuido a diversos factores tales como el período de la toma de muestras que correspondió al mes de agosto, época de lluvia en esa región, más la carga de materia orgánica aportada por los hidrocarburos y a la presión selectiva de estos, se favorecieron las poblaciones de

bacterias con predominio de bastones Gram positivos capaces de ser tolerantes a estas condiciones y con la habilidad de metabolizar sustratos que no son utilizados por miembros de la comunidad microbiana en suelos no impactados (Zogg y col., 1997; Zelles y col., 1995; Zelles, 1999; Atlas y Bartha, 2002; Zamora, 2006).

### **3. Caracterización Bioquímica de la Comunidad Bacteriana.**

Entre los efectos que generan la problemática de los desechos de las fosas y ante las nuevas condiciones de materia orgánica y compuestos tóxicos, está la de reducir la diversidad de la comunidad microbiana del suelo y en particular se destaca la comunidad bacteriana (Alexander, 1980; Rosenberg y Ron, 1995; Rivera-Cruz y col., 2002; Bundy y col., 2002). Esta es una de las principales responsables en el reciclado de minerales y en la biodegradación de la materia orgánica e inorgánica y los contaminantes que son depositados en el suelo (Alexander, 1980; Leahy y Colwell, 1990; Crawford, 1995; Atlas y Bartha, 2002).

En este sentido los aislados bacterianos se sometieron a diferentes pruebas bioquímicas para evaluar la capacidad y diversidad metabólica de los diferentes aislados frente a diferentes sustratos. La respuesta de la comunidad se expresó como porcentaje respecto al total de aislados en cada zona y se clasificó como baja (0% - 20%), media (20% - 50%) o alta (50% - 100%) (Domínguez, 2008). Los resultados están representados en la figura 18.



**Figura 18:** Caracterización Bioquímica de las tres comunidades (a): **Porcentaje (%) de la comunidad bacteriana de la Zona de Descarga B9I.** (b): **Porcentaje (%) de la comunidad bacteriana de la Zona de Descarga B9D.** (c): **Porcentaje (%) de la comunidad bacteriana de la Zona de Descarga B9V.**

En la Figura 18, se destaca en las tres comunidades el metabolismo de azúcares simples, como glucosa, con valores superiores al 80%, mientras que la lactosa alcanzó valores menores al 20%.

En cuanto al uso de complejos nitrogenados como nitratos, urea y proteínas, las tres comunidades fueron coincidentes con porcentajes superiores al 80% en cada zona.

Lo que implica una participación activa por parte de la comunidad bacteriana en los procesos de mineralización y fijación del nitrógeno. Actividades que son de importancia en la comunidad debido a que permiten principalmente la asimilación del nitrógeno y posterior uso en la formación de compuestos nitrogenados como proteínas, bases nitrogenadas y otros componentes celulares (Madigan y col., 2003; Paul, 2007).

La capacidad de mineralizar sustratos como el fósforo orgánico presentó valores superiores al 40% sobresaliendo en las comunidades de la zona B9I y B9V.

De acuerdo a la actividad bioquímica sobre sustratos complejos, las zona B9V y la zona B9D coinciden en la carencia de respuestas sobre compuestos como la lignina (0%), la quitina (0%) y la pectina (0%) y una baja actividad sobre la celulosa con 13% en la zona B9D y 4% en la zona B9V. Esto diferencia a la zona B9I con una respuesta intermedia en la lignina (22%), la celulosa (22%) y baja en la quitina (4%) y la pectina (0%).

Las pruebas de crecimiento en caldo petróleo, en acetato y la actividad hemolítica así como de la capacidad de degradar lípidos fueron consideradas para la selección de las bacterias de interés. Se destaca la zona B9I con una actividad intermedia sobre el petróleo de 31% mas un 23% en actividad hemolítica y actividad lipolítica con 18%. Le sigue la zona B9D con una actividad media sobre el petróleo con 27% y 36% en actividad hemolítica y baja actividad lipolítica (13%). La zona con vegetación (B9V) sólo presentó una actividad intermedia en la actividad hemolítica con 27% y baja sobre los lípidos (18%) y petróleo (4%).

Los resultados en la respuesta bioquímica de la comunidad revelan el potencial de la comunidad bacteriana de degradar materia orgánica en diferentes niveles de complejidad y donde sobresale la participación de la misma en la mineralización y fijación del nitrógeno.

Resalta la capacidad de reducción de nitratos con un 90% en la comunidad B9D y 100% en las comunidades B9I y B9V. Esta facultad le permite a las bacterias utilizar al nitratos en condiciones anaeróbicas como un aceptor de electrones alternativo al oxígeno (Madigan y col., 2003; Paul, 2007). Por esta misma razón, las bacterias con potencial biotecnológico que tengan esta condición son de mayor interés, debido a que pueden ser cultivadas en condiciones anaeróbicas al suministrar el nitrato necesario, lo que ahorra el costo y equipamiento en bombeo y oxigenación en reactores biológicos

(Madigan y col., 2003). Asimismo, Guerra-Santos y col. (1984) y Desai y Banat (1997) reportan que la producción de biosurfactantes tipo ramnolípido por parte de *Pseudomonas aeruginosa* es superior cuando se utiliza nitratos como fuente de nitrógeno que cuando se utiliza amonio.

Se observa igualmente que en las comunidades de las zonas de descarga (B9I y B9D) es donde se encuentra casi exclusivamente la actividad y tolerancia sobre el crudo. Por otra parte los resultados de pruebas como el uso del acetato como fuente de carbono y la actividad hemolítica fueron más equitativas en las comunidades bacterianas de las tres zonas estudiadas.

Resalta que en las tres comunidades se observó muy poca coincidencia en los aislados con respuesta en crecimiento en caldo petróleo con la actividad lipolítica o el crecimiento en lignina, que por la similitud de estos sustratos con fracciones del crudo se han encontrado una fuerte relación entre la capacidad de degradar hidrocarburos y la actividad bioquímica sobre los lípidos, dada la fracción de saturados (Hommel y Ratledge, 1993; Margesin, 2005), y con la lignina, debida a la estructura compleja y rica en grupos fenólicos que es análoga con un gran número de moléculas aromáticas tóxicas (Malaver, 1996; Iyer y Mahadevan, 2002),

La ausencia de respuesta en la degradación de sustratos complejos sugiere que la misma sería realizada por la participación complementaria del resto de la comunidad microbiana donde se incluiría a la comunidad fúngica y a la de los actinomicetos (Alexander, 1980).

Otro factor a considerar es que los resultados no incluyen la comunidad bacteriana no cultivable, que debido a las limitaciones de las técnicas convencionales la mayor parte de microorganismos del suelo no pueden ser caracterizados y esto podría subestimar el potencial de la comunidad (Zelles, 1999; Torsvik y Ovreas, 2002; Escalante-Lozada y col., 2004).

La comunidad bacteriana de la zona B9I se destaca como la más diversa debido a que es la que expresa un mayor abanico de respuestas bioquímicas, mientras que las comunidades B9D y B9V presentan un menor potencial bioquímico y se destacan por coincidir en la carencia de respuesta ante algunos sustratos.

#### 4. Análisis Funcional

Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron transformadas a una matriz de datos según las respuestas (positivas y negativas como 1 y 0 respectivamente), para agrupar y comparar los aislados según las características funcionales mediante el análisis de clúster.

El dendograma resultante permite agrupar la comunidad según la disimilitud de su perfil fisiológico, con el beneficio de observar la complejidad de la comunidad por la distancia máxima de agrupamiento (DMA), visto como el grado de diferencia entre los aislados. De igual manera el dendograma permite ubicar los grupos funcionales (GF), los cuales reflejan al conjunto de organismos que muestran una respuesta similar en la utilización de recursos. Estos grupos podrían estar formados por un solo aislado o por varios y en este caso conformarían los grupos de identidad funcional (GIF), que se caracterizan por estar reunidos por su grado de diferencia igual a cero (0) y cumplir las mismas funciones en la comunidad. La formación de GIF refleja la redundancia de funciones entre diferentes microorganismos y plantea la homogeneidad de la comunidad.

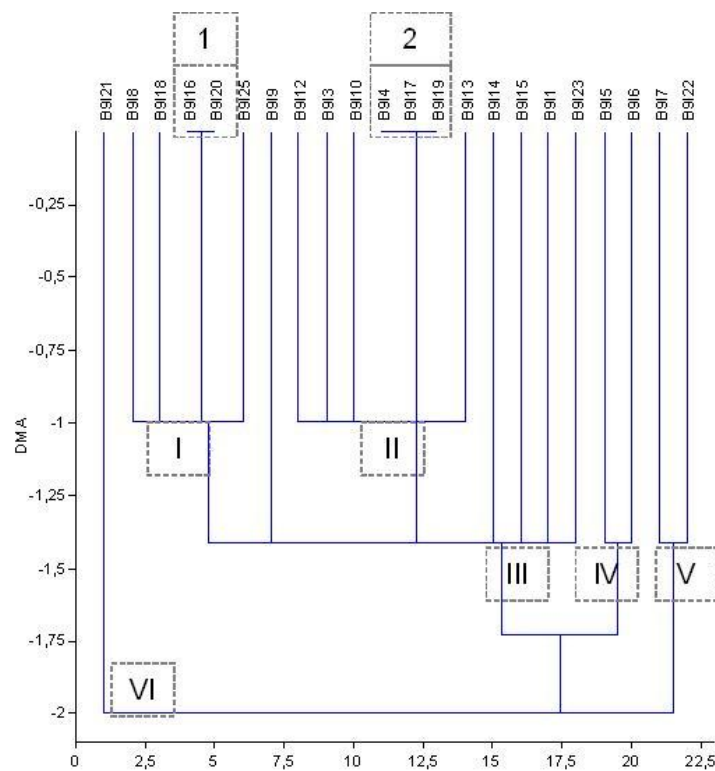
El análisis permite asignarle un peso o valor de importancia ( $P_i$ ) a cada uno de los grupos funcionales que se conforman, se calcula por el cociente entre el número de aislados que conforman el GIF entre el número total de aislados.

A su vez, la división del número de grupos funcionales entre el número total de aislados permite calcular el índice de diversidad funcional (IDF), que evidencia cuan diversa es la comunidad basado en el perfil fisiológico.

Clúster de la zona B9I: Del dendograma de la comunidad B9I (Figura 19) se toma la siguiente información; un número total de 22 aislados, la formación de 19 grupos funcionales y 2 grupos de identidad funcional (GIF), conformados por tres aislados (GIF1) y dos aislados (GIF2), cuyas características se reflejan en la tabla 7.

- a) La Distancia Máxima de Agrupamiento (DMA) donde convergen todos los aislados es 2.
- b) El grupo funcional más disímil correspondió al aislado B9I21 y se caracteriza por ser diferente por ser la única cepa de la comunidad degradadora de petróleo con actividad lipolítica además de no poseer proteolítica.

- c) Los grupos funcionales más parecidos convergen en el nodo I y II que están separados por el grupo funcional B9I9, se reúnen a la distancia de 1.
- d) A su vez los nodos I y II convergen a la distancia de 1,4 junto con otros cinco grupos funcionales para formar el nodo III. A esta misma distancia se agrupan los nodos IV y V, los cuales poseen 2 GF cada uno.
- e) Por último, el nodo III se reúne con el nodo IV a la distancia 1,7 y a su vez se reúnen con los demás grupos funcionales a la DMA. Las características bioquímicas de los grupos funcionales que conforman cada nodo se resumen en la tabla 8.



**Figura 19:** Clúster de la comunidad B9I. Con una DMA de 2 con diecinueve grupos funcionales y dos grupos de identidad funcional (GIF)

**Tabla 7:** Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad B9I, su Índice de Importancia (Pi) y Características de los aislados de cada GIF

GIF #	Cepas	Índice de Importancia (Pi)	Características
1	B9I4, B9I17, B9I19	0,136	NO <sub>2</sub> +, GEL+, α-ALM+, UREA+
2	B9I16, B9I20	0,09	Po+, NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+



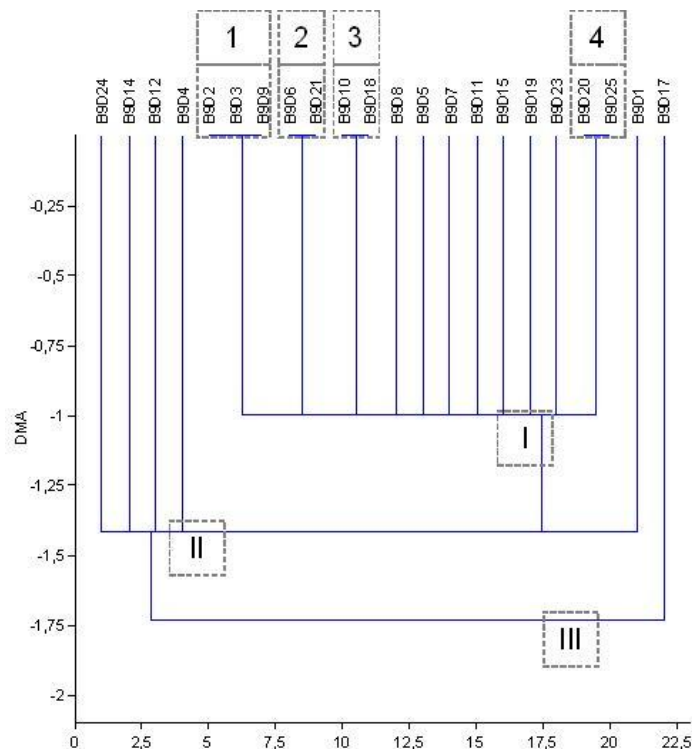
**Tabla 8:** Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad B9I. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas

Nodo	DA	Características
I	1	NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+,
II	1	NO <sub>2</sub> +, GEL+, a Amilasa+, UREA+, GLC+,
III	1,4	NO <sub>2</sub> +, ACETATO+, GLC+,
IV	1,4	CEL+, Po+, NO <sub>2</sub> +, ACETATO+, B Amilasa+, UREA+, GLC+, LAC+, PETROLEO+,
V	1,4	LIG+, CEL+, Po+, LIPIDOS+, NO <sub>2</sub> +, GEL+, UREA+, GLC+,
VI	2	LIG+, CEL+, Po+, LIP+, NO <sub>2</sub> +, GEL+, UREA+, GLC+, LAC+, GAS+

Se repitió el mismo análisis para las demás comunidades, cada uno reflejó lo siguiente:

Clúster de la zona B9D: Reflejado en la figura 20, con un total de 22 aislados.

- Se formaron 17 grupos funcionales con 4 grupos de identidad funcional (GIF), el índice de importancia es de 0,045 y 0,068, las características bioquímicas de los aislados de estos GIF se resumen en la tabla 9.
- La Distancia Máxima de Agrupamiento es 1,75.
- Se identificaron 3 nodos principales que son caracterizados en la tabla 10.



**Figura 20:** Clúster de la comunidad B9D. Con una DMA de 1,75 con diecisiete grupos funcionales y cuatro grupos de identidad funcional (GIF).

**Tabla 9:** Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad B9D, su Índice de Importancia (Pi) y Características de los aislados de cada GIF

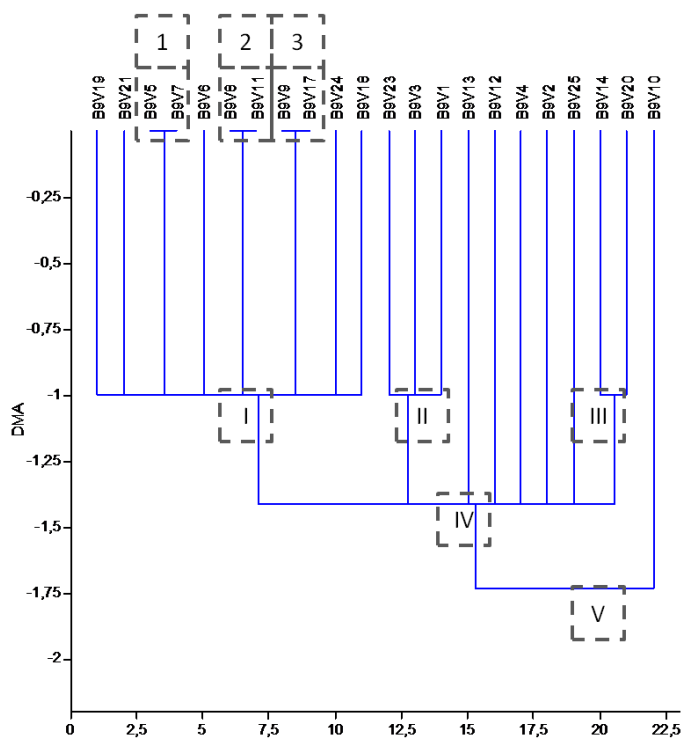
GIF #	Cepas	Índice de Importancia (Pi)	Características
1	B9D2, B9D3, B9D9	0,068	Po+, NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+
2	B9D6, B9D21	0,068	NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+
3	B9D10, B9D18	0,045	NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+
4	B9D20, B9D25	0,045	LIPIDOS+, NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+

**Tabla 10:** Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad B9D. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas

Nodo	DA	Características
I	1	NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+, GAS+
II	1,4	NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+
III	1,4	CEL+, Po+, NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+, GAS+
IV	1,75	GEL+, ACETATO+, GLC+, PETROLEO+

Clúster de la zona B9V: Reflejado en la figura 21, con un total de 22 aislados

- Se formaron 19 grupos funcionales con 3 grupos de identidad funcional (GIF) con un índice de importancia de 0,045 cada uno.
- La Distancia Máxima de Agrupamiento es 1,75.
- Se identificaron 5 nodos principales. Las características bioquímicas de los aislados de cada nodo se reflejan en la tabla 12.



**Figura 21:** Clúster de la comunidad B9V. Con una DMA de 1,75 con diecinueve grupos funcionales y tres grupos de identidad funcional (GIF)

**Tabla 11** Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad B9V, su Índice de Importancia (Pi) y Características de los aislados de cada GIF

GIF #	Cepas	Índice de Importancia (Pi)	Características
1	B9V5, B9V7	0,045	NO2+, GEL+, ACETATO+, $\alpha$ -ALM+, UREA+
2	B9V8, B9V11	0,045	NO2+, ACETATO+, UREA+
3	B9V9, B9V17	0,045	NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+

**Tabla 12:** Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad B9V. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas

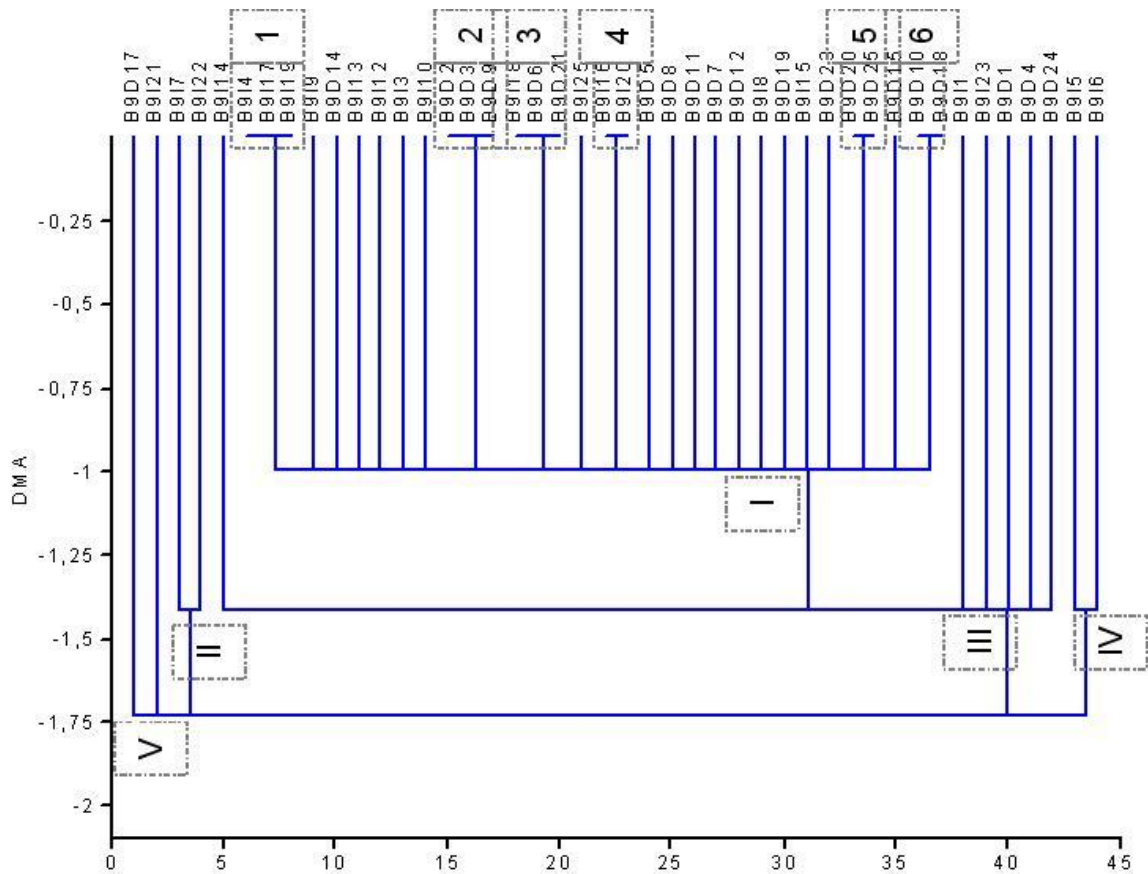
Nodo	DA	Características
I	1	NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+
II	1	Po+, NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+, GAS+,
III	1	Po+, NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+, LAC+,
IV	1,4	NO2+, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+
V	1,75	Po+, NO2+, GEL+, ACETATO+, B A milasa+

#### Comparación de las Comunidades Bacterianas de las Zonas de Estudio.

Con criterio de estar impactados por derrame petrolero se reunieron las comunidades B9I y B9D antes de considerar las tres comunidades juntas. Cuando se aplicó el método considerando sólo a B9I y B9D se obtuvo el dendograma de la figura 22 donde se observa lo siguiente:

Clúster de la zona de descarga (B9I y B9D): Se consideraron los 44 aislados de ambas zonas.

- a) Se formaron 35 grupos funcionales con seis grupos de identidad funcional (GIF), los índices de importancia son de 0,045 y 0,068, las características bioquímicas de los aislados de estos GIF se resumen en la tabla 13.
- b) La Distancia Máxima de Agrupamiento es 1,75.
- c) Se identificaron 5 nodos principales, las características de los aislados que están incluidos en estos nodos se resumen en la tabla 14.



**Figura 22:** Clúster de la comunidad B9I y B9D en conjunto. Con una DMA de 1,75 con treinta cinco (35) grupos funcionales y seis grupos de identidad funcional (GIF)

**Tabla 13:** Características de los Grupos de Identidad Funcional (GIF) de la comunidad (B9I y B9D). Índice de Importancia (Pi) de los GIF y Características de cada GIF.

GIF #	Cepas	Índice de Importancia (Pi)	Características
1	B9I4, B9I17, B9I19	0,068	NO <sub>2</sub> +, GEL+, α-ALM+, UREA+
2	B9D2, B9D3, B9D9	0,068	Po+, NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+
3	B9I18 B9D6, B9D21	0,068	NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+
4	B9I16, B9I20	0,045	Po+, NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+
5	B9D20, B9D25	0,045	LIPIDOS+, NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+
6	B9D10, B9D18	0,045	NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+

**Tabla 14:** Características Bioquímicas de los grupos funcionales que convergen en los diversos nodos del Clúster de la comunidad (B9I y B9D). Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas.

Nodo	DA	Características
I	1	NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+
II	1,4	LIG+, CEL+, Po+, Lípidos, NO <sub>2</sub> +, GEL+, UREA+, GLC+
III	1,4	NO <sub>2</sub> +, GEL+, ACETATO+, UREA+, GLC+
IV	1,4	CEL+, Po+, NO <sub>2</sub> +, ACETATO+, B Amilasa+, UREA+, GLC+, LAC+, PETROLEO+
V	1,75	GEL+, ACETATO+, GLC+

Al reunir las dos comunidades disminuye el grado de disimilitud con respecto al análisis de las comunidades individuales. Se destacan los aislados B9I21 y B9D17 por ser los más disimiles en la comunidad, B9I21 en ser uno de los dos aislados en su comunidad con actividad no proteolítica y la única capaz de crecer en caldo petróleo con actividad lipolítica, mientras que B9D17 se diferencia por ser de las pocas degradadoras de petróleo, con actividad lipolítica y sin capacidad de reducir nitratos a nitritos.

En vista de las actividades de descarga en el borde de la fosa y a la poca distancia entre las dos zonas evaluadas, se asumió que la comunidad B9D y B9I sean similares. Sin embargo, como se observa en la figura 22, son comunidades diferentes que no coinciden y mantienen sus funciones separadas, aunque el número de grupos funcionales con menor grado de disimilitud que se reúnen a la distancia de 1 pasan de 20 (9 por la comunidad B9I y 11 por la comunidad B9D) a presentar 23 en el nodo I. Además, el GIF3 reúne aislados de las dos comunidades por su capacidad de reducir nitratos a nitritos, su capacidad proteolítica y ureásica, además de ser capaces de utilizar el acetato como fuente de carbono. Esto indica que el grado de disimilitud, al considerar las dos comunidades juntas, es menor que por separado aunque se mantienen las funciones separadas.

A pesar de estar bajo las mismas condiciones y ser sometidas al mismo estrés y contaminante, las características de crecimiento en petróleo, acetato y la producción de hemólisis no resaltó para unir a las dos comunidades.

Se realizó un análisis de agrupamiento considerando a las tres zonas como una sola comunidad, se obtuvo el dendograma de la figura 23, encontrando equivalencias funcionales entre cepas aisladas de las diferentes zonas así como las siguientes observaciones y coincidencias:

Clúster de la zona de descarga (B9I y B9D) con la zona con vegetación: Con los 66 aislados.

- a) Se formaron 49 grupos funcionales con nueve grupos de identidad funcional (GIF), las características bioquímicas de los aislados de los GIF se encuentran en la tabla 15. Los valores del índice de importancia van desde 0,03 hasta 0,075.
- b) La Distancia Máxima de Agrupamiento es 1,75.

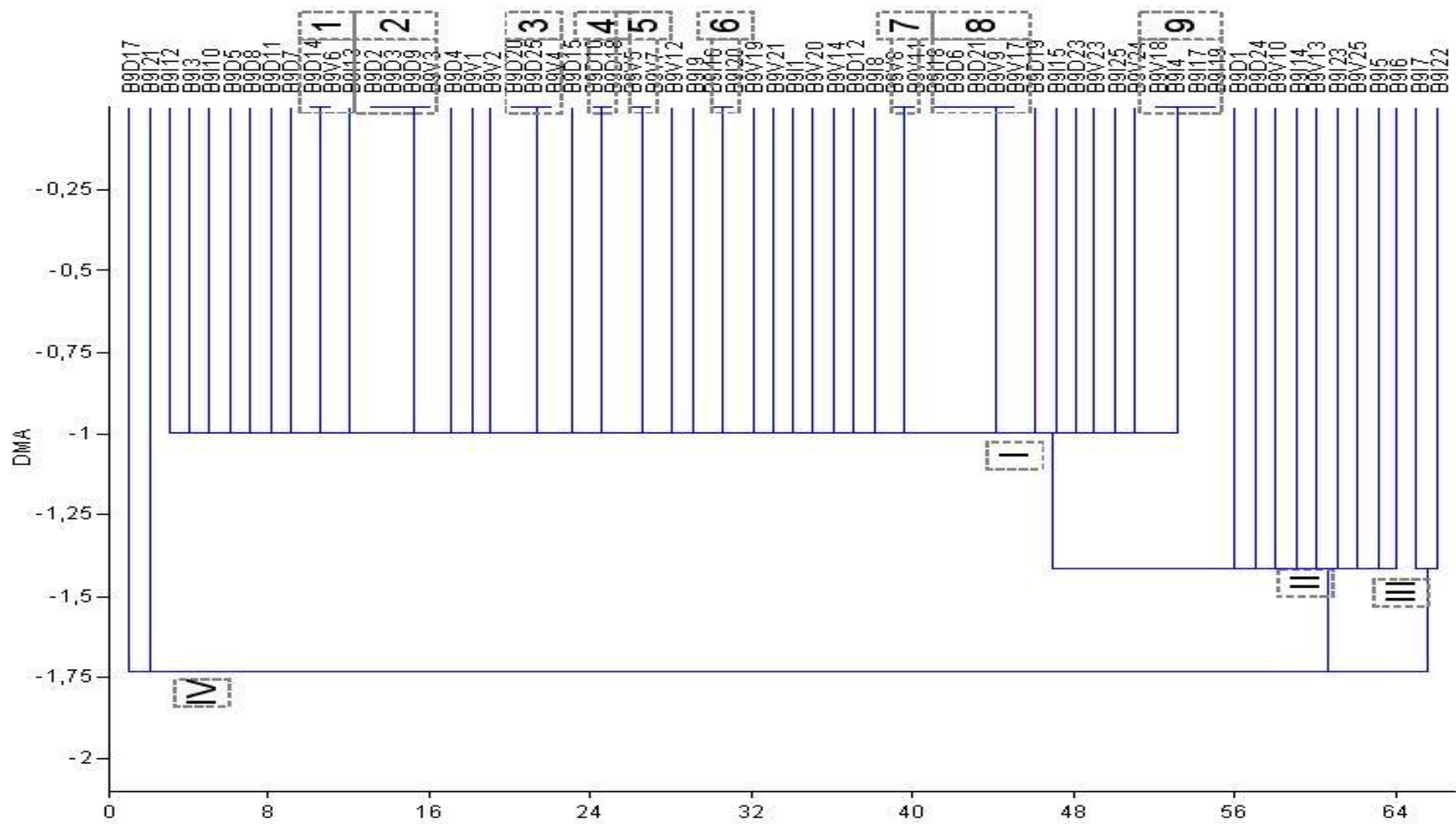
- c) Se reconocieron 4 nodos principales. Las características bioquímicas de los aislados en estos nodos se presentan en la tabla 16.

**Tabla 15:** Características de los Grupos de Identidad Funcional al agrupar las tres comunidades

GIF #	Cepas	Índice de Importancia (Pi)	Características
1	B9D14 B9V6	0,03	Po+, NO2+, PROT+, ACETATO+, $\alpha$ -ALM+, UREA+
2	B9D2, B9D3, B9D9 B9V3,	0,06	Po+, NO2+, PROT+, ACETATO+, UREA+
3	B9D20, B9D25 B9V4	0,045	LIPIDOS+, NO2+, PROT+, ACETATO+, UREA+
4	B9D10, B9D18	0,03	NO2+, PROT+, ACETATO+, UREA+
5	B9V5, B9V7	0,03	NO2+, PROT+, ACETATO+, $\alpha$ -ALM+, UREA+
6	B9I16, B9I20	0,03	Po+, NO2+, PROT+, ACETATO+, UREA+
7	B9V8, B9V11	0,03	NO2+, ACETATO+, UREA+
8	B9I18 B9D6, B9D21 B9V9, B9V17	0,075	NO2+, PROT+, ACETATO+, UREA+
9	B9I4, B9I17, B9I19 B9V18	0,06	NO2+, PROT+, $\alpha$ -ALM+, UREA+

**Tabla 16:** Características de los nodos que agrupan los grupos funcionales al reunir las tres comunidades. Distancia de agrupamiento (DA) y características bioquímicas en común. Las características en los nodos III y IV están presentes en todas las cepas que agrupan y características en los nodos I y II están presentes son las principales de todas las cepas que agrupan

Nodo	DA	Características
I	1	NO2+, PROT+, ACETATO+, UREA+, GLC+
II	1,4	CEL+, Po+, NO2+, PROT+, ACETATO+, UREA+, GLC+
III	1,4	LIG+, CEL+, Po+, Lip+, NO2+, PROT+, UREA+, GLC+
IV	1,75	PROT+, ACETATO+, GLC+



**Figura 23:** Análisis de Clúster. Dendrograma comparando las tres comunidades.

Según reportan estudios, las comunidades bacterianas están sujetas a los cambios físicos y químicos en el ambiente, entre los que se encuentran los producidos por la contaminación por hidrocarburos. Estos disminuyen la diversidad de la comunidad bacteriana, al favorecer aquellos grupos bacterianos capaces de tolerar las nuevas condiciones ambientales (Alexander, 1980; Antía, 1995; Rosenberg y Ron, 1995; López, 2002; Rivera-Cruz y col., 2002; Bundy y col., 2002, Casanova, 2005; Peña, 2005, Bozo y col., 2007). Por las características y cambios físico – químicos en cada zona se asumió que la comunidad B9I y la de B9D se agruparían por separado de la comunidad B9V, sin embargo el grado de disimilitud no fue tal y se agruparon en el nodo I aislados de las tres zonas, lo que indica que las funciones de las tres comunidades son similares. En este nodo se agrupan entre el 86% de los aislados de la comunidad B9D y B9V y el 68% de los aislados de la comunidad B9I; esta última se destaca por tener mayor diversidad de funciones y distribuir el restante 34% de los aislados de la comunidad en los nodos de mayor distancia de amalgamiento, entre 1,4 y 1,75.

Se destacan cinco GIF (GIF1, GIF2, GIF3, GIF8 y GIF9) que reúnen aislados de la comunidad B9V con aislados de las zonas impactadas (B9I y/o B9D). En particular destaca el GIF8, que reúne a las tres comunidades y se caracterizó por presentar respuesta positiva ante la urea, actividad proteolítica, capacidad de reducir nitratos a nitritos y uso del acetato como fuente de carbono.

A partir de los análisis de clúster antes descritos se obtuvieron el número de grupos funcionales, la distancia máxima de agrupamiento y el índice de diversidad funcional, estos valores están resumidos en la tabla 17.

**Tabla 17:** Resumen de la información derivada de los análisis de de clúster de las comunidades de las zonas aisladas y consideradas en conjunto. **# de Cepas;** Número de cepas o aislados evaluados. **# GIF;** Número de Grupos de Identidad Funcional. **DMA;** Distancia Máxima de Agrupamiento. **IDF;** Índice de Diversidad Funcional.

SITIO	# de aislados bacterianos	# de GIF	DMA	IDF
B9I	22	2	2	0,86
B9D	22	4	1,75	0,77
B9V	22	3	1,75	0,86
TOTAL	66	9	1,75	0,74



La tabla 17 resume aspectos derivados de los diferentes dendogramas de importancia para el análisis funcional de las comunidades bacterianas. Destacan la comunidad B9I por presentar la mayor DMA y el mayor IDF con el menor número de GIF, le sigue la comunidad B9V con el mismo valor de IDF y mayor número de GIF, seguida de la comunidad B9D con el menor IDF y mayor número de GIF en las comunidades aisladas. Por último, al reunir las tres comunidades, se tiene el menor IDF y el mayor número de GIF.

Las comunidades vistas de forma separada parecen muy distintas entre sí, sin embargo al ser agrupadas, el grado de disimilitud es menor, presentando aislados de diferentes comunidades y bajo condiciones diferentes agrupadas juntas en el mismo nodo y conformando GIF.

Los GIF indican la redundancia de funciones en la comunidad, tales como la capacidad de reducir nitratos a nitritos, actividad proteolítica, capacidad de degradar urea y utilizar como única fuente de carbono al acetato. También garantizan el funcionamiento del sistema dado que implica la degradación y mineralización de compuestos del nitrógeno en la comunidad, permitiendo su uso para la producción de compuestos nitrogenados como proteínas y ácidos nucleicos, así mismo la reducción de nitratos a nitritos actúa como aceptor de electrones en condiciones anaeróbicas y el uso del acetato como única fuente de carbono permite la entrada de carbono en el metabolismo de los organismos por diferentes rutas como el Ciclo de Krebs, el ciclo del Glioxilato principalmente (McFaddin, 1978; Alexander, 1980; Madigan y col., 2003).

Como reporta Antía (1995), esta redundancia funcional le confiere a la comunidad una estabilidad sobre estas funciones al mantener grupos bacterianos con la capacidad de tolerar cambios en el ambiente y seguir con la degradación de la materia orgánica, además garantiza un sistema degradador basado en la principal fuente de carbono que puede actuar sobre otro sustrato.

## **5. Selección de los grupos funcionales con potencial de producción de Biosurfactantes**

Los biosurfactantes son compuestos anfipáticos tenso – activos con capacidad dispersante de moléculas hidrófobas, altamente utilizadas en la biorremediación. La capacidad de producción por parte de las bacterias de la comunidad le confiere un potencial biotecnológico, por esta razón este trabajo realizó la selección de grupos

funcionales con este potencial. Se utilizó como criterio de selección la respuesta positiva por parte de los aislados a la actividad hemolítica, utilización de acetato como única fuente de carbono además del crecimiento en caldo petróleo, también se consideró la degradación de la lignina y actividad lipolítica. Los grupos funcionales seleccionados fueron a su vez discriminados y caracterizados por bioensayos donde se obtuvieron los siguientes resultados.

Se seleccionaron treinta cinco (35) grupos funcionales bajo este criterio, a los cuales se les determinó el potencial de producción de compuestos tenso – activos según la capacidad de producir espuma, cuando los inóculos fueron crecidos en medio salino suplementado con glucosa como única fuente de carbono. La clasificación permitió diferenciar a estos aislados en no productores, medianamente productores y productores de espuma, de esta manera fueron seleccionados siete aislados (B9D8, B9I3, B9I6, B9I7, B9I9, B9I10 y B9I14). A estos aislados se les determinó el potencial de degradar moléculas modelo y se utilizó el índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) para evaluar su actividad emulsificante.

Se utilizaron como sustratos las siguientes moléculas modelo; fenantreno, 9-metil-antraceno, naftaleno, pireno, etil-naftaleno, diantreno, naftol, pirogalol y DBT. Todos los aislados resultaron negativos; sin embargo cuatro de estos aislados seleccionados (B9D8, B9I3, B9I6 y B9I10) presentaron respuesta positiva a crecimiento en caldo petróleo. Ante esto es posible que el método utilizando agar Bushnell-Haas (BH) no fuera el más apropiado para evaluar el potencial de degradar moléculas modelo junto con el potencial de producir compuestos tenso – activos, como lo sería un medio líquido y especializado en la producción de biosurfactantes suplementado con la molécula de interés.

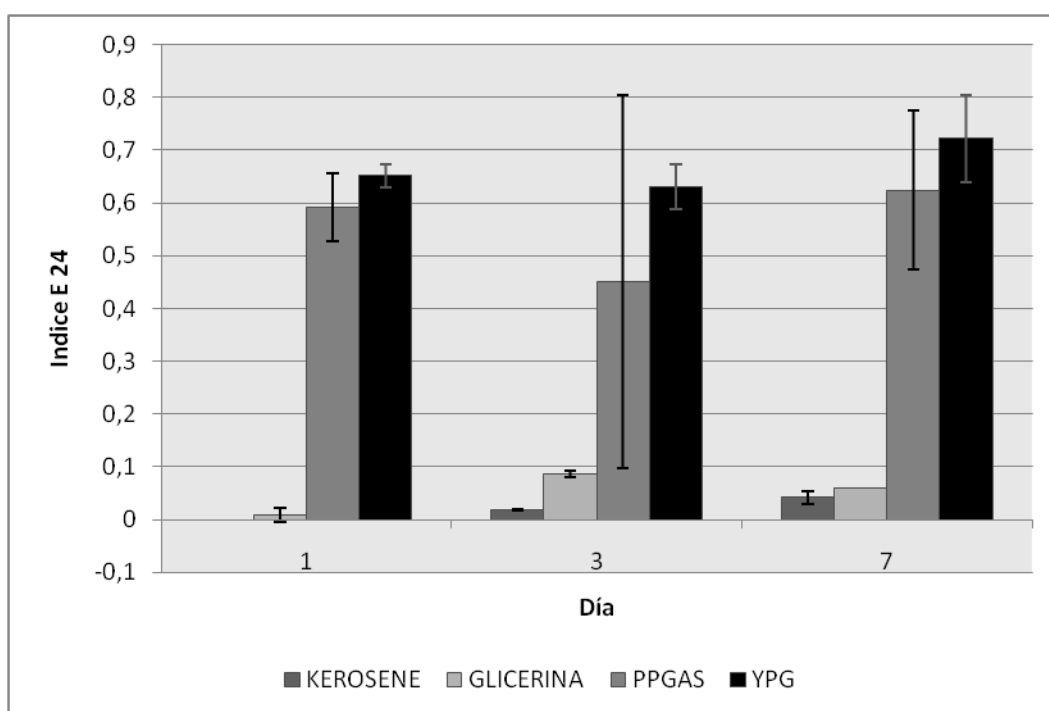
Así, bajo las condiciones de un medio acuoso se estimaría la relación y el potencial en que un contaminante puede ser tomado del medio extracelular e introducido al intracelular para ser metabolizado por los microorganismos, el uso de compuestos tenso – activos al incrementar el acceso, superficie y movilidad de los contaminantes en el medio acuoso para el ataque microbiano y la tasa de biodegradación.

De estos siete GF con el potencial de producir el compuesto tensoactivo se seleccionó al aislado B9I9 debido a que presentó la mayor actividad emulsificante y estabilidad en el tiempo, con un índice de emulsión ( $E_{24}$ ) de 42,9%, que se mantuvo a

las 48 horas hasta 10,44%. Aislado al que se le evaluó la producción y características del biosurfactante.

La cepa B9I9 se le identificó como una *Pseudomonas aeuroginosa* la cual es una de las especies de *Pseudomonas* que produce un único tipo de compuesto tenso – activo, el cual es denominado ramnolípido y su producción está asociada a este género. Se caracteriza por ser un tipo de glicolípido, posee ramnosa como cabeza polar atado a una o dos cadenas alifáticas las cuales forman la parte hidrofílica de la molécula (Maier, 2003).

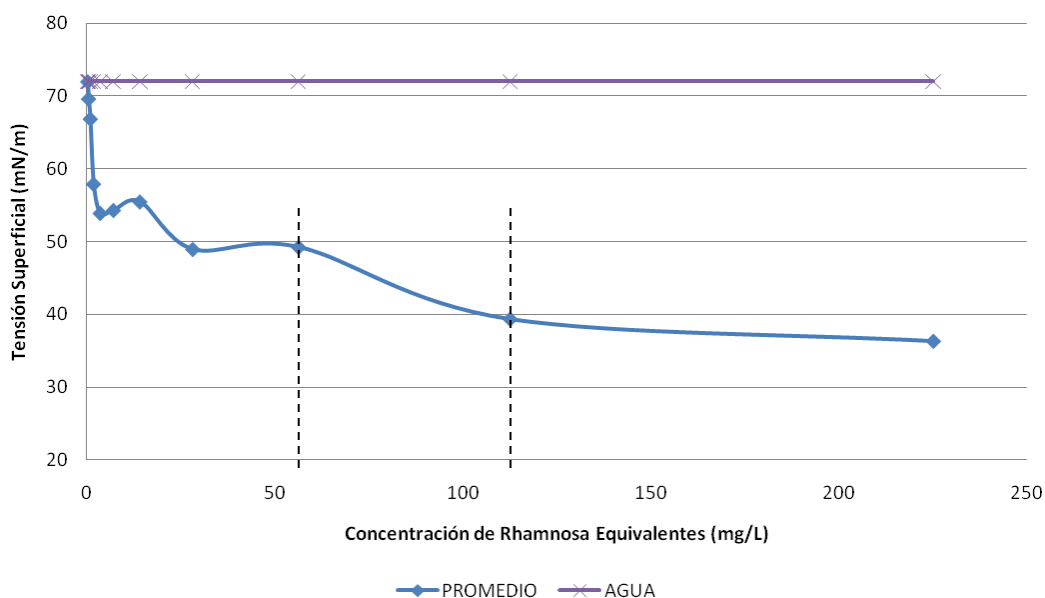
Se evaluó la producción del biosurfactante medida a través del índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) como la producción de actividad emulsificante en diferentes medios y diferentes fuentes de carbono por siete días. Se utilizaron los medios YPG, PPGAS y salino con glicerina y salino con kerosene como fuente de carbono.



**Figura 24:** Producción de Biosurfactante medida por el índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) en medio suplementado con kerosene, glicerina y glucosa en YPG y PPGAS

Como se observa en la figura 24, la fuente de carbono óptimo para la producción del biosurfactante fue la glucosa, a través del medio YPG seguido del medio PPGAS. En menor proporción se observa el uso de la glicerina como fuente de carbono y por último el kerosene.

Este resultado permitió seleccionar el medio YPG como el apropiado para la producción del biosurfactante y posterior purificación a fin de evaluar las características del compuesto tenso – activo. Determinadas como el cambio de la tensión superficial en función de la concentración y la concentración micelar crítica (CMC).



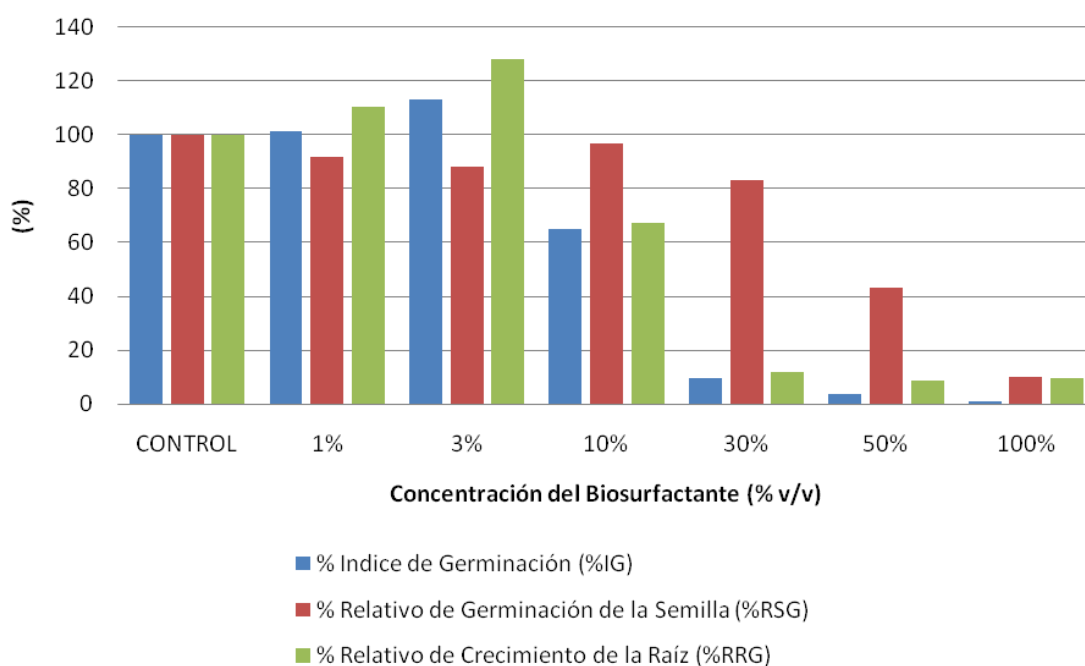
**Figura 25:** Cambio de la Tensión Superficial en función de la concentración de ramnolípidos determinados por ramnosa equivalentes. Entre las barra verticales se señala el intervalo de valores donde estaría la CMC.

Se observa en la figura 25 que el compuesto evaluado alcanza valores de tensión superficial de 35 mN/m y la concentración micelar crítica (CMC) se alcanza a una concentración entre los 112 mg/L y 56 mg/L, valores cercano a los reportados para ramnolípidos (Zhang y Miller, 1992; Deziel y col., 1996; Christofi e Ivshina, 2002; Urum y Pekdemir, 2004).

Mulligan (2005) reporta la aplicabilidad ambiental de los ramnolípidos según la capacidad de mejorar la biodegradación de hidrocarburos, al facilitar la solubilización e interacción de estos compuestos con la comunidad microbiana, con la característica de que los ramnolípidos a concentraciones por encima del CMC facilita la mineralización de hidrocarburos suspendidos, mientras que a concentraciones por debajo del CMC facilita la movilización de los compuestos hidrofóbicos. Al considerar esto se pueden efectuar procedimientos de bajo costo con la capacidad de mejorar la degradación o el lavado y recuperación de los hidrocarburos en el suelo, sin afectar la biota.

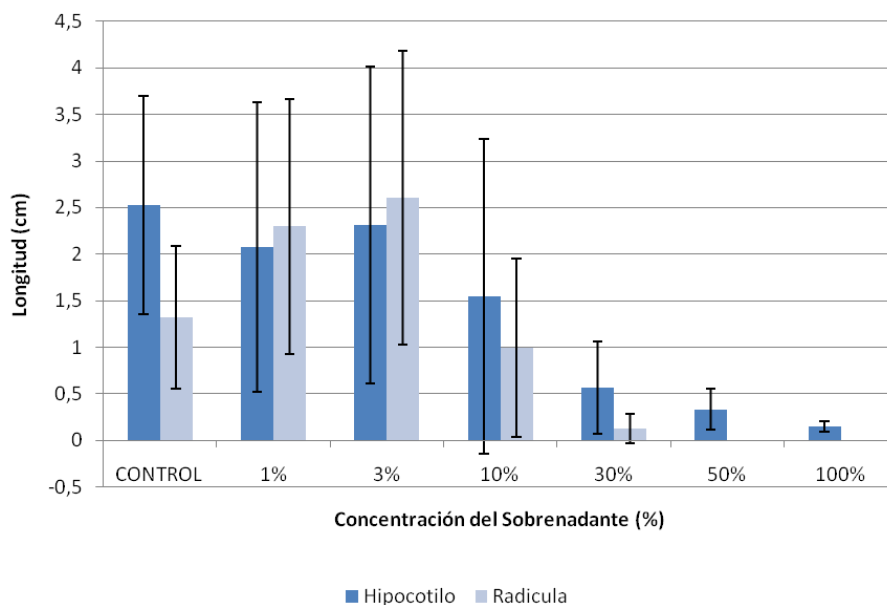
Se evaluó el efecto tóxico en el ambiente utilizando el sobrenadante libre de células, con el compuesto tenso – activo, con semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como indicador de la fitotoxicidad. Se encontró que a concentraciones por debajo del 10% del sobrenadante la germinación no se ve afectada y por encima de este porcentaje si tiene un efecto inhibitor en el desarrollo de la plántula.

Como se puede observar en la figura 26, se compararon los efectos del sobrenadante a diferentes concentraciones sobre el Porcentaje Relativo de germinación (% RSG), el Porcentaje Relativo del Crecimiento de la raíz (% RRG) y el Porcentaje del Índice de Germinación (% IG), en la figura se observa como el sobrenadante favorece el crecimiento de la raíz (a 1% y a 3%) mientras que a concentraciones mayores del 10% se reduce el desarrollo de la raíz. La germinación de semillas se mantuvo estable hasta la concentración del 30% del sobrenadante con valores superiores al 80% de germinación.

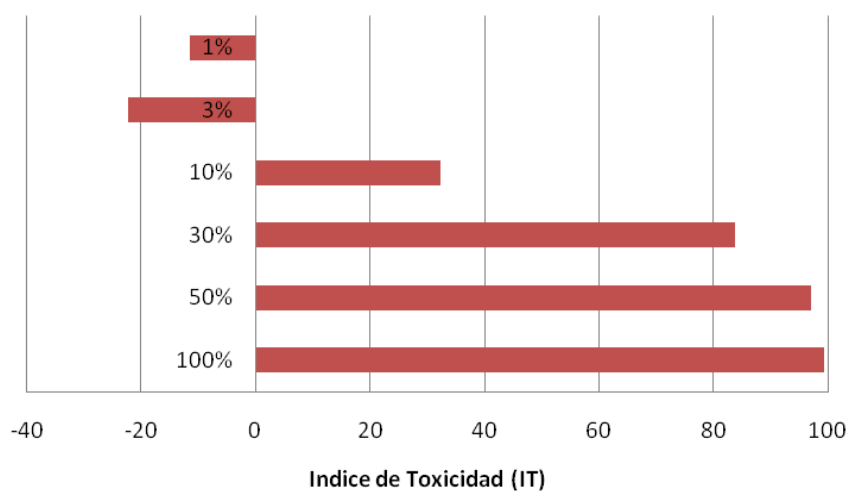


**Figura 26:** Efectos en la germinación de semillas de tomate en función de las concentraciones del Biosurfactante. % IG, Índice de Germinación, % RSG, Porcentaje Relativo de germinación de la Semilla, % RRG, Porcentaje Relativo del Crecimiento de la raíz.

Cuando se evalúa el desarrollo de la raíz (figura 27) se observa como el efecto positivo en el crecimiento afecta principalmente el desarrollo de la radícula y como el efecto inhibitor a mayores concentraciones tiene un mayor efecto sobre hipocotilo.



**Figura 27:** Desarrollo de la plántula. Efectos en el crecimiento sobre la radícula y el hipocotilo de la raíz.



**Figura 28:** Índice de Toxicidad. Utilizando semillas de tomate como indicador de toxicidad y el sobrenadante a diferentes concentraciones.

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto tóxico del medio fermentado junto con los ramnolípidos. Christofi e Ivshina (2005) resaltan los beneficios del uso de los biosurfactantes por ser potencialmente menos tóxicos y mas biodegradables que los surfactantes sintéticos. Sin embargo, los resultados obtenidos al utilizar el índice de toxicidad (figura 28) mostraron efectos negativos en el desarrollo de la plántula a concentraciones superiores al 10%.

Esto pudiera ser producto de un fenómeno conocido como ósmosis, donde el agua se moviliza a través de las membranas por difusión pasiva hasta donde la concentración de los solutos es mayor (Taiz y Zeiger, 2002), asimismo el ramnolípido, junto con los demás productos de la fermentación y del resto del medio YPG, extraería o impediría la entrada del agua a las raíces, con lo que se afecta el desarrollo de las mismas (Flasz y col., 1998; Taiz y Zeiger, 2002).

Flasz y col. (1998) en un estudio comparativo de la toxicidad entre un surfactante sintético (Marlon A-350) y ramnolípidos, encontraron que el medio YPG así como el biosurfactante presentaban una aparente baja toxicidad o efectos inhibitorios, sin capacidad mutagénica, cuando estaban concentrados. Se consideró que este efecto negativo era producto de la presión osmótica sobre los organismos indicadores. Mientras que el compuesto Marlon A-350 presentaba propiedades mutagénicas y una mayor toxicidad a diferentes concentraciones, así como daños en órganos internos y vísceras y la muerte en ratones experimentales.

Santa Anna y col. (2002) encontraron que el CL50, o la concentración a la que se alcanzaba el 50% de efecto letal en los organismos de prueba (*Daphnia similis*), se alcanzaba a concentraciones de ramnolípidos de 13,0 mg/L cuando se probaba el medio libre de células y 13,8 mg/L cuando el medio no está libre de células. Para este caso la CMC se alcanzaba a los 19 mg/L. Resultado que muestra que el ramnolípido con el medio es más tóxico que el biosurfactante puro, según lo descrito por Lang y Wagner (1993) quienes no encontraron efectos de toxicidad a los 200 mg/L, utilizando como indicador a *Daphnia magna*. En este caso Santa Anna y col. (2002) resaltan la presencia de otros factores de toxicidad en el medio como proteasas, lipasas, pirocianinas, entre otros.

Abdel-Mawgoud y colaboradores (2011) indican que la producción de ramnolípidos está relacionada con los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, a través de la activación de genes y rutas metabólicas en común, por lo que se investigan alternativas para su producción como con especímenes no patógenos o por la inserción de genes responsables de la producción de los ramnolípidos a bacterias de uso industrial.

Además, Christofi e Ivshina (2002) promovieron la producción de los biosurfactantes en sistemas naturales como el método más efectivo en relación costo – beneficio, al obtener incrementos en la biodegradación de contaminantes orgánicos al mejorar la biodisponibilidad de los mismos, pero resaltan la necesidad de entender los factores que afectan la activación de genes en sistemas naturales.

En función de estos resultados, es necesario resaltar que de ser aplicados los ramnolípidos, estos compuestos deben de ser purificados del medio donde se fermentó antes de ser utilizados, así evitar la liberación de los factores de virulencia de la bacteria y prevenir el daño al ambiente.

Asimismo, se apliquen estudios de ecotoxicidad y evaluar el efecto de los compuestos tenso – activos en la comunidad bacteriana, tanto en las otras especies que pueden ser sensibles y participen en la biorremediación, como entre las variedades de *P. aeruginosa*, como reporta Shin y col. (2004) quienes observaron que por encima de los 240 mg/L de ramnolípidos poblaciones de esta misma especie pueden verse afectadas por el biosurfactante. Así como, la misma especie y otros miembros de la comunidad se pueden perjudicar por el contaminante resuspendido en las micelas (Christofi e Ivshina, 2002; Shin y col., 2004; Van Hamme y Urban, 2009).



## VI. CONCLUSIONES

El uso del análisis funcional permitió caracterizar la comunidad así como la identificación de grupos funcionales con potencial biotecnológico en la biorremediación, demostrando ser una herramienta apropiada dentro del proyecto de Misión Ciencia para el estudio de comunidades microbianas y en la selección de cepas de interés para la recuperación y saneamiento del ambiente.

La similitud de los grupos funcionales y la diversidad funcional en las tres zonas estudiadas sugiere que el derrame de crudo no afectó significativamente la diversidad bacteriana.

La presencia de cepas con capacidad de producir biosurfactantes en las dos zonas impactadas (B9I y B9D) indica adaptación de la comunidad a la presencia de hidrocarburos.

Los valores del IDF, así como la capacidad de producir biosurfactantes refleja la capacidad de resiliencia de la comunidad bacteriana ante los contaminantes tipo hidrocarburo, como la tolerancia a cambios fisicoquímicos en el ambiente que pudiesen reducir la diversidad de las comunidades y garantiza el funcionamiento del sistema al conservar funciones claves.

## VII. RECOMENDACIONES

La similitud de la comunidad B9V con la comunidad impactada puede sugerir que esta comunidad no está libre de impacto, aunque el suelo en la zona con vegetación no evidencie derrame petrolero. Para interpretar esto mejor sería recomendable hacer un estudio de concentración fracciones orgánicas al suelo o metales pesados, así como de otras características del suelo y determinar si en efecto el suelo está impactado y cuáles pueden ser las variables del ambiente que afectan a la comunidad.

Se recomienda evaluar la capacidad en los otros aislados seleccionados con el potencial de producir compuestos tenso-activos. Considerando la capacidad de producirlos con diferentes sustratos, tales como hidrocarburos disponibles en el suelo y utilizar un medio salino mas apto en la producción de biosurfactantes.

Igualmente estimar el potencial del biosurfactante en resuspender y lavar suelos impactados con crudo y determinar la concentración óptima, en relación costo-beneficio, sin afectar la biota del ambiente.

Hacer estudios de eco toxicidad que incluyan a otras especies como animales, por ejemplo *Daphnia* sp., a otros microorganismos como algas y otras bacterias e inclusive antibiogramas.

Ampliar el estudio al caracterizar la comunidad fúngica en la zona de impacto por derrame, a fin de evaluar la sinergia entre hongos y bacterias en la remediación de suelos impactados por derrames petroleros.

## VIII. REFERENCIAS

- Abdel-Mawgoud, A., Hausmann, R., Lépine, F., Müller, M. y Déziel, E. (2011) Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. PP: 13 – 55. En G. Soberón-Chávez (Ed.) *Biosurfactants From Genes to Applications. (Microbiology Monographs, Volume 20)*. Springer. Berlín – Alemania.
- Adams Schroeder, R., Domínguez Rodríguez, V. y García Hernández, L. (1999) Potencial de la Biorremediación de Suelo y Agua Impactados por Petróleo en el Trópico Mexicano. *TERRA*. 17 (2): 159 – 174.
- Admassu W. y Korus R. A. (1995) Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. Pags: 13 – 34. En R. Crawford, D. Crawford (eds.). *Bioremediation: Principles and Applications (Biotechnology Research)*. Cambridge University Press. New York. Estados Unidos.
- Alexander, M. (1980) Introducción a la Microbiología de Suelo. AGT Editor, S. A. México.
- Alvarez, P. J., e Illman, W. A. (2006) Bioremediation And Natural Attenuation: Process Fundamentals And Mathematical Models (Environmental Science And Technology: A Wiley-Interscience Series Of Texts And Monographs). Wiley-Interscience.
- Anandaraj, B. y Thivakaran, P. (2010) ISOLATION AND PRODUCTION OF BIOSURFACTANT PRODUCING ORGANISM FROM OIL SPILLED SOIL. *J Biosci Tech*, Vol 1 (3). 120 – 126.
- Antía, A. (1995). Estudio Ecologico de las Comunidades de las comunidades microbianas heterotróficas de un suelo en condiciones naturales y sometido a manejo agrícola. Tesis Doctoral. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela)
- Araujo I, N. Angulo, C. Cárdenas, M. Méndez, M. Morante, y M. Machado. (2004). Biorremediación De Suelos Con Consorcio Bacteriano, Compostaje y Fertilización. *Boletín Del Centro De Investigación Biológicas* 38 (3): 186-202.
- Araujo, I, Gomez A., Barrera, M. Angulo, N., Morillo, G., Cárdenas, C. y Herrera, L. (2008). Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *INTERCIENCIA*. Vol.33, no.4. 245-250.
- Arellano, T. (2008). Manejo Integral de Fosas de Hidrocarburos Generadas por la Actividad Petrolera Venezolana. Tesis De Maestría. Universidad Nacional Experimental Politecnica de la Fuerza Armada Nacional– Maestría en Gerencia Ambiental (Venezuela)
- Atlas, R. (1975) Effects Of Temperature And Crude Oil Composition On Petroleum Biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 396-403
- Atlas, R., y Bartha, R. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4ta. Edición. Editorial Addison Wesley. España.

- Banat I. M., Makkar R. S. y Cameotra S. S. (2000). Potencial comercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53: 495 – 508.
- Bastardo, H. (2005). Algunos aspectos del proceso de descomposición y la microbiología ambiental. *Acta Biol. Venez.* 25: 91 – 97.
- BBL (1974). Manual de procedimientos de laboratorio y de productos. Becton Dickinson de Mexico, S.A. de C.V. Mexico.
- Bozo, L., Fernández, M., López, M., Reyes, R., Suárez, P., (2007) Biomarcadores de la contaminación química en comunidades microbianas. *Interciencia.* 32: pp. 8 – 13.
- Brigmon R., Camper D. y Stutzenberger F. (2002). Bioremediation of Compounds Hazardous to health and the environment: An Overview. En Ved Pal Signh y Stapleton Raymond. *Biotransformations: Bioremediation Technology for Health And Environmental Protection.* Elsevier B.V.
- Bubela, B. (1989) Geobiology and Microbiologically Enhanced Oil Recovery. En E. C. Donaldson, G.V. Chilingarian y T. F. Yen (Eds.) *Microbial Enhanced Oil Recovery.* PP. 75 – 97. Elsevier. Nueva York. Estados Unidos.
- Bundy J. G., Paton G.I. y Campbell C. D. (2002). Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *J. App. Microbiol.* 92. 276 – 288.
- Camejo, D. (2005). Diseño y ensamblaje de un equipo para la medida de tensión interfacial dinámica en soluciones de alta densidad óptica a diferentes temperaturas. Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Casanova, E. (2005) Introducción a la Ciencia del Suelo. Consejo de desarrollo Científico y Humanístico. Universidad central de Venezuela. Caracas – Venezuela.
- Chakrabarty, A. N., Adhya, S. y Pramanik, M. K. (1970). The hydrolysis of Tween 80 by vibrios and aeromonads. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 397 – 402.
- Chávez G., Arenas G., Parra I., Luzardo M., Bravo B., Ysambert F. y Márquez N. (2009). Estudio de las variables fisicoquímicas en el proceso de micelización de mezclas de surfactantes no-iónicos polietoxilados en la interfase agua/aire. Parte I: efecto de la salinidad. *CIENCIA.* 17 (3): 235 – 244.
- Chen Ch-Y., Baker S. y Darton R. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactans from natural sources. *J. Microb. Methods.* 70, 503-510.
- Christofi N., e Ivshina I. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. A review. *J Appl Microb* 93: 915–929

- Christofi N., e Ivshina I. (2005). Microbial Surfactants And Their Use In Soil Remediation. Pp. 311-329. En M. Fingerman y R. Nagabhushanam (Eds.) *Bioremediation Of Aquatic And Terrestrial Ecosystems*. Science Publishers, Inc. E.E.U.U.
- Churchill, S. A., Griffin, R. A., Jones, L. P. y Churchill, P. F. (1995). Biodegradation rate enhancement of hydrocarbons by an oleophilic fertilizer and a rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Environmental Quality*, 24, 19—28.
- Colleran, E. (1997). Uses of Bacteria in Bioremediation. Pp. 3-22. En Sheehan D. (Ed.) *Bioremediation Protocols*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Cooper, D. G., y Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 224– 229.
- Corneo, O. (2001). Simulación a Escala de Laboratorio de la Técnica de Biorremediación en Ripios de Perforación Base Aceite (Diesel). Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ingeniería (Venezuela).
- Courtney, R. y Mullen, G. (2009). Use of germination and seedling performance bioassays for assessing revegetation strategies on bauxite residue. *Water Air Soil Pollut.*, 197: 15-22.
- Crawford, R. (1995). Preface. Pags: 1 – 12. En R. Crawford, D. Crawford (eds.). *Bioremediation: Principles and Applications (Biotechnology Research)*. Cambridge University Press. New York. Estados Unidos.
- Cultimed. 2003. Manual Básico De Microbiología. Panreac Química S. A. España
- Das, K. y Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*. 98: 1339 – 1345.
- Desai, J. y Banat, I. (1997). Microbial Production of Surfactant and Their Comercial Potencial. *Am. Soc. Microbiol.* 61, 47-64
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., y Bisailon, J. (1996) Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1908-1912
- Domínguez, D. (2008). Caracterización Funcional De La Comunidad Fúngica Asociada A Dos Ripios De Perforación Base Agua. Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Dott W., Feidicker D. y Kamper P. (1999) Comparison of autochthonous bacteria and commercially available cultures with respect to their effectiveness in fuel oil degradation. *J. Ind. Microbiol.* 4: 365-374.

- Duarte, G. F., A. S. Rosado, L. Seldin, W. de Araujo, y J. D. van Elsas. (2001). Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene (*dsz*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1052– 1062.
- Escalante-Lozada A., Gosset-Lagarda G., Martínez-Jiménez A., y Bolívar-Zapata F. (2004). Diversidad Bacteriana del Suelo: Método de Estudio no Dependientes del Cultivo Microbiano e Implicaciones Biotecnológicas. *Agrociencia.* 38: 583-592.
- Flasz, A., Rocha, C.A., Mosquera, B., Sajo, C. (1998). A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *Medical Science Research*, 26, 181-185.
- Frers, C. (2010). Perdemos el suelo y no le damos importancia. *EcoPortal*. [Online]. Disponible En La World Wide Web: <[http://www.ecoportel.net/Contenido/Temas\\_Especiales/Suelos/perdemos\\_el\\_suelo\\_y\\_no\\_le\\_damos\\_importancia](http://www.ecoportel.net/Contenido/Temas_Especiales/Suelos/perdemos_el_suelo_y_no_le_damos_importancia)>. (Consulta 2 de julio de 2010).
- Garassini, L. (1967). Microbiología Agraria. UCV – Facultad de Agronomía. Maracay – Venezuela.
- Garbisu, C., Amézaga, I. y Alkorta, I. (2002). Biorremediación y Ecología. *Ecosistemas* 11 (3) [Online]. Disponible En La World Wide Web: <[Http//Www.Aeet.Org/Ecosistemas/023/Opinion1.Htm](http://Www.Aeet.Org/Ecosistemas/023/Opinion1.Htm)>.
- Garland, J.L. y Milis, A.L. (1991). Clasification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology.* 57:2351-2359
- Georgiou, G. Lin, S-C y Sharma, M. M. (1992) Surface-Active Compounds from Microorganisms. *Bio/Technology* 10, 60 – 65
- Goodfriend, W. (1998). Microbial community patterns of potential substrates utilization: a comparison of salt marsh, sand dune, and seawater-irrigated agronomic systems. *Soil Biology y Biochemistry.* 30: 1169- 1176
- Greene, E., Kay, J., Jaber, K., Stehmeier, L. y Voordouw, G. (2000). Composition of Soil Microbial Communities Enriched on a Mixture of Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12): 5282 – 5289.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O. y Fiechter, A. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source. *Am. Soc. for Mic.* 48 (2). 301 – 305.
- Haferbug, D., Hommel, R. Claus, R. y Kleber, H.P. (1986). Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv. Biochm Engin/Biotech.* (33). 53 – 93.
- Hallmann J. y Berg G. (2006) Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. PP 15 – 32. En: Schulz B, Boyle S, Sieber T (eds) *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin.

- Härdle, W. y Simar, L. (2007). *Applied Multivariate Statistical Analysis*. Springer. ISBN: 3540722432.
- Hommel, R. K. y Ratledge, C. (1993). Biosynthetic Mechanisms of Low Molecular Weight Surfactants and Their Precursor Molecules. PP: 3 – 64. En: Korasic N. (Ed) *Biosurfactants: Production, Properties, Applications Surfactant Science Series*, vol. 48. Marcel Dekker. New York, E.E.U.U.
- Horowitz, A. y Atlas, R. M. (1977a). Continuous open flow-through system as a model for oil degradation in the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 647-53.
- Ijah, U. J. J. (1998). Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*. 18 (5): 293 – 299.
- Infante C. y Vásquez P. (1999) Explotación Petrolera y Ambiente. *Acta Científica Venezolana I*: 71-74.
- Infante, C. (2001) Biorrestauración De Áreas Impactadas Por Crudo Por Medio De INTEBIOS® y BIORIZE®. *INCI*. [Online]. Vol.26, No.10. PP.504 – 507. [Citado 11 Abril 2009]. Disponible En La World Wide Web: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442001001000014&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442001001000014&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0378-1844.
- Infante C. (2005). Contaminación de Suelos y Recuperación Ecológica en Venezuela. *Acta Biol. Venez.* 25 (1-2): 43 – 49.
- Iyer, A. P. y Mahadevan, A. (2002). Lignin degradation by bacteria. PP: 311 – 330. En V. P. Singh y R. Stapleton (Eds.) *Biotransformations: Bioremediation Technology For Health And Environmental Protection*. Elsevier B. V.
- Krebs, Ch. (1985). *Ecología. Estudio de la Distribución y la Abundancia*. Segunda Edición. HARLA. México.
- Kiyohara, H., Nagao, K. y Yana, K. (1982). Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 454 – 457.
- Lang, S. Katsiwela, E. y Wagner, F. (1989) Antimicrobial Effects of Biosurfactants. *EUR J LIPID SCI TECH Lipid / Fett*. 91: 363–366.
- Lang, S. y Wagner, F. (1993). Biological Activities of Biosurfactants. PP: 251 -268. En: Korasic N. (Ed) *Biosurfactants: Production, Properties, Applications Surfactant Science Series*, vol. 48. Marcel Dekker. New York, E.E.U.U.
- Leahy, J. G. y Colwell, R. R. 1990. Microbial Degradation Of Hydrocarbons In The Environment. *Microbiol. Rev.* 54:305-315
- León, Y. (2008). Caracterización Funcional y Molecular De Una Comunidad Bacteriana Asociada A Ripios Base Agua Impregnado En Crudo Pesado Con Énfasis En El Potencial De Producción De

Biosurfactantes. Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela)

- LEPA – IZT. Laboratorio de Ecología de Plantas Acuáticas – Instituto de Zoología Tropical (1996). Diagnostico Ambiental de las Cuencas de los ríos El Caris, Guanipa, Güepe, Oritupano, Merias, Patacon, Tonoro, Morichal La Pica y Morichal La Puente, Ubicadas en el Área Operacional del Distrito ANACO CORPOVEN, S. A. en los Estados Anzoátegui y Monagas. Informe Final. Laboratorio de Ecología de Plantas Acuáticas – Instituto de Zoología Tropical. Facultad de Ciencias. Universidad central de Venezuela. Caracas – Venezuela.
- López, H. M. (2002). Sucesión de la Comunidad Bacteriana en Suelos Salinos Enmendados con Paja de Maíz y Glucosa. Tesis de Maestría. Universidad de Colima – Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. (México).
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J (2003) Brock Biología de los Microorganismos. 10ma Edición. Benjamin Cummings
- Madrid, M. y Cataldi, A. (2002) Caracterización De Fosas Petroleras y Sitios Contaminados Por Crudo A Través De Métodos Geofísicos y Sensores Geoquímicos In Situ. *XI Congreso Venezolano De Geofísica*. Caracas – Venezuela.
- Maier, R. (2003) Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. Pp 101 – 122. En Allen I. Laskin, Joan W. Bennett, Geoffrey M. Gadd (Eds.) *Advances in Applied Microbiology*. Volume 52. Academic Press. California – E.E.U.U.
- Makkar, R.S. y Rockne, K.J. (2003) Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Tox. & Chem.* 22 (10): 2280 – 2292.
- Malaver, N. (1996). Aspectos ecologicos de la asociación microorganismos – raíz en *eichhornia crassipes* (Mart.) Solm-Laub (Pontederiaceae) expuesta a un efluente modificado. Tesis Doctoral. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Margesin, R. (2005). Determination of Enzyme Activities in Contaminated Soil. PP: 309 – 320. En R. Margesin y F. Schinner (Eds). *Manual for Soil Analysis – Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Springer. Berlín – Alemania.
- McFaddin, J. (1978). Pruebas Bioquímicas Para La Identificación De Bacterias De Importancia Clínica. Ediciones Panamericana. Argentina.
- Miller C. A. y Neogi P. (2008). Interfacial Phenomena. Equilibrium and Dynamic Effects (Surfactant Science Series. Volumen 139). 2º Edición. CRC Press. Boca Raton – E.E.U.U.



- Miller, R. M. y Zhang, Y. (1997) Measurement of Biosurfactant-Enhanced Solubilization and Biodegradation of Hydrocarbons. PP: 59 – 66. En D. Sheehan (Ed.). *Bioremediation Protocols*. New Jersey – E.E.U.U.
- Muller-Hurtig, R., Wagner, F., Blaszczyk, R. y Kosaric, N. (1993) Biosurfactants for environmental control. PP. 447-469. En: Korasic N. (Ed) *Biosurfactants: Production, Properties, Applications Surfactant Science Series*, vol. 48. Marcel Dekker. New York, E.E.U.U.
- Mulligan CN. (2005) Environmental applications of biosurfactants. *Environ Pollut*. 133: 183 – 198.
- Okoh, A.I., y Trejo-Hernandez, M.R. (2006) Remediation Of Petroleum Hydrocarbon Polluted Systems: Exploiting The Bioremediation Strategies. *African J. Biotechnol*. 5 (25), 2520-2525
- Olivieri, R. Bacchin P., Robertiello, N. Degen L. y Tonolo A. (1976). Microbial Degradation of Oil Spills Enhanced by Slow-Release Fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol*. 31 (5): 629 – 634.
- Oren, A. (2004). Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*. 359: 623 – 638.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. y Cameotra, S.S. (2011) Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci*. 12, 633-654.
- Parkinson, D., Gray, T.R.G. y Williams, S.T. (1971). Methods for Studying the ecology of Soil Microorganisms. IBP Handbook No 19. Blackwell Scientific Publications. Oxford – Inglaterra.
- Párraga, M. (2005; abril 2006) VEN-49: 1 billón en pasivos ambientales. En *Biodiversity Reporting Award 2006*. De *El Universal*. Caracas - Venezuela. [Artículo en línea] Disponible desde Internet en: <  
<http://biodiversityreporting.org/article.sub?docId=20053yc=VenezuelaycRef=Venezuelayyear=2006ydate=November%202005>>.
- Paul, E. R. (2007). Soil Microbiology and Biochemistry. 3ª Edición. Elsevier Academic Press. E.E.U.U.
- Paulson, D.S. (2008). Biostatistics and Microbiology. Springer Science + Business Media, LLC. Nueva York – E.E.U.U.
- PDVSA (2005) PDVSA en Cifras. [Online]. [Citado 20 Abril 2009]. Disponible en Internet: <  
[Http://Www.Pdvs.Com](http://Www.Pdvs.Com)>
- Peña, N. (2005). Evaluación Geoquímica y Microbiológica de Localidades Empleadas en el Bio-Tratamiento de Desechos con Hidrocarburos. Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Pernía, B., Freitas, M., Rojas-Tortolero, D. y Naranjo-Briceño, L. (2010). Efecto tóxico de la emulsificación de asfaltenos provenientes de distintos crudos extrapesados venezolanos sobre la

- planta bioindicadora *Lactuca sativa*. Revista de Estudios Transdisciplinarios (RET). (En evaluación).
- Rahman, K.S.M., Banat, I.M., Thahira, J., Thayumanavan, T. y Lakshmanaperumalsamy, P. (2002). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Biores. Technol.* 81: 25 – 32.
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Lord R. y Street, G. (2007). Bioremediation of Petroleum Sludge using Bacterial Consortium with Biosurfactant. PP 391-408. En Singh S. y Tripathi R (Eds.). *Environmental Bioremediation Technologies*. Springer.
- Raiger, L. J. y López N. I. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*. 8 (3). 146 – 161.
- Ricotta, C. (2005) A note on functional diversity measures. *Basic Appl. Ecol.* 6: 479 – 486.
- Rivera-Cruz M. del C., Ferrera-Cerrato R., Volke Haller V., Rodriguez Vásquez R. y Fernandez Linares L. (2002) Adaptación y Selección de Microorganismos Autoctonos en Medios de Cultivos Enriquecidos con Petróleo Crudo. *Terra*. 20: 423-434
- Rodrigues L. Teixeira J., Oliveira R. y van der Mei H. (2006). Response surface optimization of the médium componentes for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochem.* 41, 1-10.
- Rosenberg, E., y Ron, E. (1995). Bioremediation of petroleum contamination. Pags. 100 – 124. En R. Crawford, D. Crawford (eds.). *Bioremediation: Principles and Applications (Biotechnology Research)*. Cambridge University Press. New York. Estados Unidos.
- Saadoun, I. y Al-Ghzawi, Z. (2005). Bioremediation Of Petroleum Contamination. En M. Fingerman y Nagabhushanam (Eds.) R. *Bioremediation Of Aquatic And Terrestrial Ecosystems* (Pp. 311-329). Science Publishers, Inc.
- Salas, M. (2010). CARACTERIZACIÓN DE UNA COMUNIDAD MICROBIANA EN SUELOS AFECTADOS POR LA ACTIVIDAD PETROLERA EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DE LA FOSA BARED-9, UBICADA EN EL EDO. ANZOÁTEGUI. Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Santa Anna, L.M., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Pereira Jr., N. y Freire, D.M.G. (2002). Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz. J. Chem. Eng.* 19 (2): 159–166.
- Shields, M. S. y Francesconi, S. C. (1995). Molecular techniques in bioremediation. Pags: 345 – 390. En R. Crawford, D. Crawford (eds.). *Bioremediation: Principles and Applications (Biotechnology Research)*. Cambridge University Press. New York. Estados Unidos.

- Shin KH, Ahn Y, Kim KW. (2004) Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene. *Environ Toxicol Chem* 24: 2768–2774.
- Signh, V. P. y Bhatnagar, K. (2002) Sewage Treatment Systems: Microbiological Aspects. PP: 377 – 401. En V. P. Signh y R. Stapleton (Eds.) *Biotransformations: Bioremediation Technology For Health And Environmental Protection*. Elsevier B.V.
- Sikkema, J., de Bont, J.A. y Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons *Microbiol. Rev.* 59: 201 – 222.
- Slifkin, M. (2000). Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4626 – 4628.
- Soberón-Chávez, G. y Maier, R. M. (2011) Biosurfactants: A General Overview. PP: 1 – 12. En G. Soberón-Chávez (Ed.) *Biosurfactants From Genes to Applications. (Microbiology Monographs, Volume 20)*. Springer. Berlín – Alemania.
- Sobrero, M.C. y Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). PP: 71 – 79. En: G. Castillo (Ed.) *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. Ottawa – Canadá.
- Song H.-G., Pedersen T.A., y Bartha R. (1986) Hydrocarbon mineralization in soil: Relative bacterial and fungal contribution. *Soil Biology and Biochemistry*, 18 (1), pp. 109-111.
- Song, H-G y Bartha, R. (1990). Effects of Jet Fuel Spills on the Microbial Community of Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 646-651
- Song, H-G, Wang, X. y Bartha, R. (1990) Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spills *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 652-656
- Speight, J. G. 1999. The Chemistry and Technology of Petroleum. Marcel Dekker, Inc, New York, N.Y.
- Srinivas T. (2008). Environmental Biotechnology. New Age International Publishers. Nueva Delhi. India. ISBN: 978-81-224-2544-4
- Sulbaran M., Bahsas, A., Velasquez, W. y Otoniel, J. (2005) Caracterización De Biosurfactantes Producidos Por Pseudomonas Fluorescentes Aisladas De Emulsiones De Petróleo Pesado. *Cien.* [Online]. Vol.13, No.2 [Citado 11 Abril 2009], P.228-239. Disponible En La World Wide Web: <[http://www.Serbi.Lu.z.Edu.Ve/Scielo.Php?Script=Sci\\_ArttextyPid=S1315-20762005006000010yLng=EsyNrm=Is0](http://www.Serbi.Lu.z.Edu.Ve/Scielo.Php?Script=Sci_ArttextyPid=S1315-20762005006000010yLng=EsyNrm=Is0)> . Issn 1315-2076.
- SurrIDGE, A.K.J., Wehner, F.C. y Cloete, T.E. (2009). Bioremediation of Polluted Soil. Pags: 103 – 121. En A. Singh, R.C. Kuhad y O. P. Ward (Eds). *Advances in Applied Bioremediation*. Ontario. Canada.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2002) Plant Physiology. 3º Edición. Sinauer Associates. Sunderland – E.E.U.U.

- Tezuka, Y. (1969). Cation-dependent Flocculation in a Flavobacterium Species predominant in Activated Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 17: 222-226
- Torsvik V. y Ovreas L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (3), pp. 240-245.
- Unterman, R. (1995). A history of PCB biodegradation. Pags: 209 – 253. En R. Crawford, D. Crawford (eds.). *Bioremediation: Principles and Applications (Biotechnology Research)*. Cambridge University Press. New York. Estados Unidos.
- Urum, K. y Pekdemir, T. (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*. 57: 1139 – 1150.
- USEPA. (1996) Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200: Seed germination/root elongation toxicity test. Washington, DC: OPPTS.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. y Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 503-549
- Van Hamme, J. D. y Urban J. (2009). Biosurfactant in Biorremediation. Pags: 103 – 121. En A. Singh, R.C. Kuhad y O. P. Ward (Eds). *Advances in Applied Bioremediation*. Ontario. Canada
- Venezuela. 1998. Decreto N° 2.635. Normas para el control de la recuperación de Materiales Peligroso y Manejo de Desechos Peligroso. Gaceta Oficial Extraordinaria 5245. 3 de agosto.
- Venezuela. 1995. Decreto N° 883, con las Normas para la Clasificación y Control de la Calidad de los cuerpos de Agua y Vertido o Efluentes Líquidos. Gaceta Oficial Extraordinaria 5021. 18 de diciembre.
- Waples R.S., y Gaggiotti O. (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* 15:1419–1439.
- Ward, D. M. (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:271–277.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C. y Bateson, M. M. (1998). A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1353 - 1370.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms Relevant To Bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:237-241
- Whang, L.M., Liu, P.W.G., Ma, C.C. y Cheng, S.S. (2008) Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 151: 155–163.

- Wilder CN, Allada G. y Schuster M. (2009) Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect Immun.* 77: 5631 – 5639.
- Wilkinson S., Nicklin S. y Faull J.L. (2002). Biodegradation Of Fuel Oils And Lubricants: Soil And Water Bioremediation Options. PP 69 - 100. En Ved Pal Singh y Stapleton Raymond. *Biotransformations: Bioremediation Technology for Health And Environmental Protection.* Elsevier B.V.
- Youssef, N., Duncan, K., Tagle, D., Savage, K., Knapp, R. y McInerney, M. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microb. Methods.* 56, 339-347.
- Zak J., Willing M. Moorhead D. y Wildman H (1994) Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology y Biochemistry.* 26: 1101 – 1108.
- Zamora, A. (2006). Análisis Funcional De Comunidades Bacterianas Asociadas A Un Proceso De Biorremediación De Muestras De Suelo Contaminado Con Hidrocarburo. Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Zamora, A. (2008). Análisis Funcional De Microorganismos. Un Estimador de Diversidad y estructura Comunitaria. Seminario – Postgrado en Ecología. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Zelles L., Bai Q.Y., Rackwitz R., Chadwick D. y Beese F (1995) Determination of phospholipid- and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structure in soils. *Biol Fertil Soils* 19: 115–123.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29, 111 –129.
- Zhang Y. y Miller R. (1992). Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). *Appl. Environm. Microb.* 58, 3276-3282.
- Zogg G.P., Zak D.R., Ringelberg D.B., MacDonald N.W., Pregitzer K.S. y White D.C. (1997) Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci Soc Am J.* 61:475–481.

## IX. ANEXOS

**Borde de la colonia.** Representa el límite o margen de la colonia.



**Entero:** Continuo en toda su extensión, sin irregularidades.

**Ondulado:** Formando curvas onduladas y regulares poco profundas.

**Lobulado:** Las curvas son más numerosas e irregulares y penetran más profundamente en la colonia.

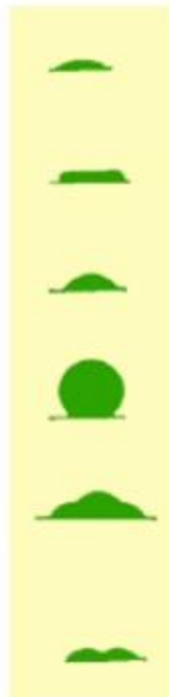
**Erosionado:** Aserrado en forma irregular.

**Enrulado:** Cadenas paralelas formando verdaderos rulos.

**Filamentoso:** El borde se presenta en forma micelial.

**Anexo 1:** Esquemas de tipos de borde de la colonia (Imagen de Garassini (1967)).

**Elevación de la colonia:** Diferencias de nivel entre la superficie del medio y perceptible entre la superficie del medio y de la colonia.



**Difusa:** Sin diferencia de nivel o de límite indefinido, apenas perceptible entre la superficie del medio y de la colonia.

**Ligeramente convexa :** De límite definido.

**Elevada :** Superficie de la colonia paralela al medio de cultivo y en un plano visiblemente superior.

**Convexa:** La superficie es curva y puede presentarse rugosa o papilada.

**Marcadamente convexa:** La colonia tiene el aspecto de una gota de agua, en forma globulosa.

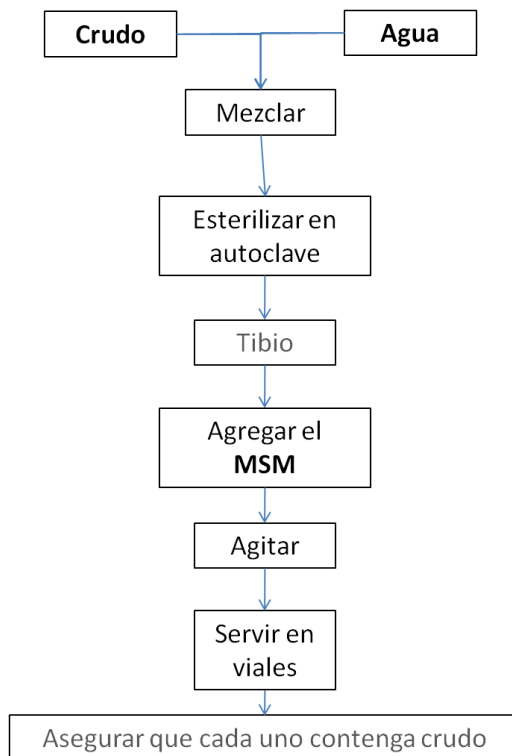
**Elevada en el centro:** El centro de la colonia presenta una segunda elevación sobre la superficie de la colonia.

**Umbilicada:** Presenta una depresión en el centro en forma de cráter; los bordes de la colonia son elevados y cóncavos.

**Anexo 2:** Esquemas de tipos de elevación de la colonia (Imagen de Garassini (1967)).

### Caldo Petr6leo (1%)

Medio Salino M6nimo Doble concentrado	50 ml
Crudo	1 gr
Agua destilada	50 ml
<b>Total</b>	<b>100 ml</b>



**Anexo 3:** Esquema de preparaci6n del Caldo Petr6leo al 1%.

**Anexo 4:** Medio Salino M6nimo (MSM). Preparaci6n normal y para doblemente concentrado.

<b>Medio Salino M6nimo (MSN)</b>			
<b>Soluci6n A</b>		<b>Soluci6n B</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	47 g	HCl (1N)	1 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	115 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,028 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26,4 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,4 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml	ZnCl <sub>2</sub>	0,0135 g
		CaCl <sub>2</sub>	0,147 g
		H <sub>2</sub> O	1000 ml
Esterilizar por filtraci6n		Esterilizar por filtraci6n	
<b>Preparaci6n</b>			
<b>Medio Salino M6nimo</b>			
Para 1 L mezclar 100 ml de la soluci6n A con 10 ml de la soluci6n B y completar hasta llegar al litro con agua destilada esterilizada.			
<b>Medio Salino M6nimo Doble concentrado</b>			
Para 1 L mezclar 200 ml de la soluci6n A con 20 ml de la soluci6n B y completar hasta llegar al litro con agua destilada esterilizada.			