



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**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.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante La Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Milagros Isabel Salas Rivas como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutoras: Dr. Nora Malaver

Dr. Nelda Dezzeo

Caracas, Venezuela

Junio 2010

INDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Petróleo	3
2.2. Fosas Petroleras	4
2.2.1. Plan de saneamiento	4
2.2.2. Distribución y migración de los desechos	5
2.3. Características de la comunidad microbiana en suelos contaminados	8
2.4. Factores que afectan la presencia de los microorganismos en el suelo	8
3. Antecedentes	11
3.1. Aislamiento de cepas en suelos contaminados	11
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	14
6. Metodología	15
6.1. Área de Estudio	15
6.2. Datos de la fosa Bared-9	15
6.2.1. Composición	15
6.3. Diseño experimental	16
6.3.1. Labores de campo	16
6.3.1.1. Recolección de muestras	16
6.3.2. Trabajo de Laboratorio	16
6.3.2.1. Análisis microbiológico	17
6.3.2.1.1. Aislamiento de la comunidad microbiana	18
6.3.2.1.2. Caracterización Macromorfológica	18
6.3.2.1.3. Caracterización Micromorfológica	19
6.3.2.1.4. Caracterización bioquímica	19
6.3.2.1.4.1. Azúcares simples	19
6.3.2.1.4.2. Azúcares complejos	20
6.3.2.1.4.3. Actividad proteolítica	20
6.3.2.1.4.4. Actividad lipolítica	20
6.3.2.1.4.5. Sustratos complejos	21
6.3.2.1.4.6. Fuente de Nitrógeno	21
6.3.2.1.4.7. Utilización de Fósforo	21
6.4. Análisis estadístico de los datos	22
7. Resultados	25
7.1. Parámetros Físicoquímicos	25
7.2. Densidades microbianas	26
7.2.1. Bacterias y hongos	26
7.3. Características Macromorfológicas de la comunidad microbiana	28
7.4. Características Micromorfológicas de la comunidad microbiana	29
7.4.1. Bacterias	29
7.4.2. Hongos	32
7.5. Características Bioquímicas de la comunidad microbiana	37
7.5.1. Bacterias	37
7.5.2. Hongos	41

7.6. Caracterización funcional de la comunidad microbiana	45
7.6.1. Bacterias	45
7.6.2. Hongos	53
7.6.3. Comunidad microbiana (bacterias-hongos)	59
8. Conclusión	63
9. Bibliografía	64
Anexos	75
1. Densidades de las comunidades microbianas (hongos y bacterias)	75
2. Caracterización Macromorfológica	75
2.a. Bacterias	75
2.b. Hongos	80
3. Imágenes del diseño experimental	82
3.a. Labores de Campo	82
3.b. Trabajo de laboratorio	84
3.b.1. Bacterias	84
3.b.2. Hongos	86

INDICE DE FIGURAS

Fig. N°1. Modelo idealizado de la distribución de desechos en una fosa petrolera	5
Fig. N° 2. Procesos críticos en la distribución y transporte de hidrocarburos en el subsuelo. Tomado de Delin y Col. (1998)	6
Fig. N° 3. Zonas geoquímicas en las zonas saturada y no saturada. Modificado de Baedecker y col. (1993)	7
Fig. N° 4. Fosa Bared-9. Fotografía tomada por el Proyecto Misión Ciencia denominado “Desarrollo, validación y transferencia de nuevas tecnologías para el saneamiento ambiental de pasivos generados por la actividad petrolera” (Junio, 2009)	15
Fig. N° 5. Esquema del diseño muestral propuesto en la Fosa BARE-9	16
Fig. N° 6. Diseño de la toma de muestras compuestas en cada parcela	17
Fig. N°7. Esquema metodológico seguido en el diseño experimental	17
Fig. N° 8. Abundancias microbianas (bacterias y hongos) presentes en las muestras de suelo	27
Fig. N° 9. Porcentaje de la caracterización Micromorfológica de las cepas bacterianas aisladas de las diferentes transectas	30
Fig. N° 10. Porcentaje de la caracterización Micromorfológica de las cepas bacterianas presentes en cada una de las parcelas de las diferentes transectas	31
Fig. N° 11. Porcentaje de la caracterización Micromorfológica de las cepas fúngicas presentes en las diferentes transectas	32
Fig. N° 12. Caracterización Micromorfológica de las cepas fúngicas presentes en las tres parcelas de las diferentes transectas	35
Fig. N° 13. Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas presentes en las diferentes transectas de la fosa Bared-9	37
Fig. N° 14 . Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas presentes en las parcelas de las diferentes transectas.	39
Fig. N° 15. Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas fúngicas presentes en las parcelas ubicadas en la fosa Bared-9	41
Fig. N° 16. Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas fúngicas presentes en las parcelas de las transectas	43
Fig. N° 17. Análisis de Clúster de la comunidad bacteriana presente en cada una de las transectas	46
Fig. N° 18. Análisis de Clúster de la comunidad bacteriana presente en las parcelas de las transectas	51
Fig. N° 19. Análisis de clúster de la comunidad fúngica presente en las transectas	53
Fig. N° 20. Análisis de Clúster de la comunidad fúngica presentes en las parcelas de las diferentes transectas	56

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Clases de hidrocarburos presentes en el petróleo	3
Tabla N°2. Caracterización fisicoquímica de las muestras del suelo correspondiente a cada transecta.	25
Tabla N° 3. Correlación lineal de los parámetros fisicoquímicos y las densidades microbianas	26
Tabla N° 4. Grupos funcionales y grupos de identidad funcional correspondiente a la comunidad bacteriana presente en la transecta 1	47
Tabla N° 5. Grupos constituidos por el clúster de las cepas microbianas (hongos y bacterias) con sus características bioquímicas	60
Tabla N° 6. Densidades microbianas presente en cada muestra de suelo	75
Tabla N°7. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T1PI	75
Tabla N°8. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T1PII y T1PIII	76
Tabla N°9. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T2PI y T2PII	77
Tabla N°10. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T2PIII y T3PI	78
Tabla N°11. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presente en T3PII y T3PIII	79
Tabla N°12. Caracterización Macromorfológica de las cepas fúngicas presentes en la transecta 1 y 2	80
Tabla N° 13. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T3PIII	81

RESUMEN

En Venezuela existen unas 12.000 fosas petroleras, donde se han almacenado por décadas desechos de las actividades de explotación y producción de hidrocarburos. El presente estudio se realizó en la fosa Bared-9, ubicada geográficamente a una latitud $8^{\circ} 55'46,2''$ N y longitud $64^{\circ} 7'44,8''$ W (coordenadas UTM 948033 N 379742 E), en el Distrito San Tomé, Estado Anzoátegui -Venezuela. Considerando el papel que juegan los microorganismos en el ciclaje de nutrientes y su potencial para ser utilizados en recuperación de áreas impactadas por la actividad petrolera, se caracterizó la comunidad microbiana (bacteriana y fúngica) en el área de influencia de esta fosa. Para la toma de muestras se levantaron transectas en 3 puntos diferentes alrededor de la fosa y en cada una de estas se ubicaron 3 parcelas de dimensiones: 10 m x 5 m. que representaban áreas con diferente grado de impacto (desde el borde hasta áreas alejadas de la fosa), de cada parcela se tomaron 4 submuestras de suelo, con las cuales se formó una muestra compuesta. Los análisis microbiológicos incluyeron: aislamiento de cepas bacterianas y fúngicas cultivables, caracterización macro, micromorfológica y bioquímica. En las tres parcelas estudiadas predominaron bacterias Gram positivas y en las poblaciones fúngicas fueron las levaduras las que se expresaron en mayor proporción, en el caso de los hongos filamentosos solo se aislaron en las segundas y terceras parcelas. Las comunidades microbianas no mostraron diferencias en su estructura funcional a lo largo del gradiente estudiado, revelando un gran porcentaje de cepas con actividad degradativa frente a sustratos simples (glucosa y lactosa) y complejos, como: celulosa, lignina, pectina, quitina, baja capacidad para desdoblar urea y gran actividad lipolítica, infiriendo la capacidad de estas comunidades microbianas para degradar productos derivados del petróleo, utilizándolos como fuente de carbono y energía. Con los resultados del espectro bioquímico y aplicando análisis multivariado de clúster se determinó la estructura funcional de la comunidad microbiana, permitiendo evidenciar que las poblaciones fúngicas eran más diversas funcionalmente que las poblaciones bacterianas. En los análisis de clúster que integraban ambas poblaciones se formaron Grupos de Identidad Funcional (GIF), infiriendo que en la degradación de diferentes sustratos participan ambas poblaciones de microorganismos, lo cual evidencia que cepas taxonómicamente diferentes, presentan equivalencias funcionales en el ecosistema. El espectro bioquímico mostrado por las comunidades microbianas revela un gran potencial para ser utilizadas en procesos de biorremediación.

Palabras claves: *Fosa Bared-9, Hongos, Bacterias, caracterización bioquímica, caracterización funcional.*

1. INTRODUCCION

En Venezuela existen unas 12.000 fosas petroleras (Madriz y Cataldi, 2002), donde se han almacenado por décadas desechos de las actividades de explotación y producción de hidrocarburos, que representan un alto riesgo operacional, ambiental y humano. Entre estos desechos figuran miles de barriles de petróleo oxidado, junto a aceites, agua de producción, lodos, ripio, metales, solventes, sustancias radiactivas, sedimentos y desechos domésticos, entre otros. Esas fosas constituyen hoy en día el principal pasivo ambiental de nuestra industria petrolera. Según SHA (2001), 96% de las fosas están ubicadas en la zona oriental del país, en áreas de San Tomé, Anaco, Punta de Mata y Maturín.

En ambientes contaminados por la actividad petrolera, predominan comunidades microbianas que poseen propiedades catabólicas y adaptativas que las hacen capaces de utilizar los compuestos contaminantes o sobrevivir en su presencia; sin embargo, bajo condiciones normales, dichas comunidades podrían estar ausentes o en bajas densidades (Kanaly y col. 2000; Ríos-Hernández y col. 2003).

Dependiendo del tipo de hidrocarburo, de la temperatura, la humedad, la textura del suelo y la cantidad vertida, se produce una mayor o menor toxicidad, que afecta la estructura de la comunidad microbiana, disminuyendo la diversidad, la densidad y la actividad de los microorganismos en el suelo (Macnaughton y col. 1999).

La estructura comunitaria microbiana, fundamentada en el potencial bioquímico y probada frente a diferentes sustratos, permite reconocer grupos de microorganismos tales como: proteolíticos, lipolíticos, celulolíticos y lignolíticos con potencial para degradar contaminantes presentes en el ambiente.

En este trabajo, se aisló y caracterizó la comunidad microbiana (bacteriana y fúngica) fundamentada por su potencial bioquímico, de suelos perturbados por la actividad petrolera, y se comparó con la comunidad microbiana presente en suelos no perturbados por dicha actividad. Se determinó la estructura funcional de la comunidad bacteriana y fúngica presentes en dichos suelos, ubicados en el Distrito San Tomé, Estado Anzoátegui. Esta investigación se encuentra enmarcada en el proyecto Misión Ciencias “Desarrollo, validación y transferencia de nuevas tecnologías para el saneamiento ambiental de pasivos generados por la actividad petrolera”; en el subproyecto 1: Caracterización del Medio Físico Natural en Áreas Impactadas con hidrocarburos y subproyecto 4: Restauración ecológica en sectores con pasivos ambientales relacionadas con fosas petroleras y metales pesados.

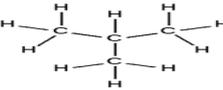
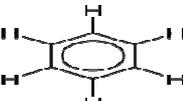
2. MARCO TEORICO

2.1. Petróleo

El petróleo es un producto natural, que resulta de la transformación anaeróbica de la biomasa bajo determinadas condiciones de temperatura y presión. La mayoría de los componentes del petróleo son biodegradables, pero presentan velocidades de biodegradación diferentes (Atlas y Bartha, 2002).

Según Clark y Brown (1977) y Howe-Grant (1996) el petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química de: 84-87% de C, 11-14% de H, 0-8% de S, 0-4% de O y N, y metales como el níquel y el vanadio, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini, 1960), que se pueden dividir en 4 clases, como se puede observar en la Tabla N°1.

Tabla N°1. Clases de hidrocarburos presentes en el petróleo (Speight, 1991).

Hidrocarburo	Clasificación	Fórmula	Compuesto
Alifáticos	n-alcanos, alcanos de cadenas ramificadas e isoprenoides, cicloparafinas o cicloalcanos y hópanos.	C_nH_{2n+2}	 Isobutano
Aromáticos	Monoaromáticos, diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos.	C_6H_6	 Benceno
Resinas	Piridinas, quinoleínas, carbazoles, sulfóxidos y amidas.	C_nH_nN	 Piridina
Asfáltenos	Hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular.	C_nH_nOH	 2,4- Bencenodiol

2.2. Fosas Petroleras

La actividad petrolera produce una gran cantidad de desechos contaminantes que son generalmente acumulados y almacenados en fosas, que son excavaciones en el terreno donde se colocan los desechos, y son consideradas como pasivos ambientales. Esos pasivos ambientales han generado inquietud al Estado Venezolano, debido al impacto que puedan causar en el ambiente y en la salud de la población. Por lo tanto, existe un creciente interés en evaluar las posibilidades de recuperación de las áreas afectadas, y para ello se han estado desarrollando propuestas que permitan contribuir a solventar ese problema.

2.2.1. Plan de saneamiento

En el año 1996 se comenzó a realizar un Plan de saneamiento, clausurando fosas que representaban alto riesgo ambiental, de acuerdo al siguiente proceso:

- Remoción de la capa superficial de hidrocarburos. Estos hidrocarburos pueden ser recuperados y colocados en la línea de producción, empleados en la elaboración de asfalto o dispuestos para tratamiento.
- Extracción de las aguas contaminadas, las cuales pueden ser tratadas o almacenadas en tanques para luego ser dispuestas por reinyección en pozos agotados.
- Tratamiento del lodo, que comprende la recuperación o biodegradación del desecho orgánico hasta niveles permisibles (establecido en el artículo N° 02 del Decreto N° 2.635 sobre

“Normas para el control de recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos”).

2.2.2. Distribución y migración de los desechos

Uno de los principales impacto de la deposición de los desechos en las fosas, es el potencial que poseen los hidrocarburos, las sales y los metales pesados de migrar desde su punto de liberación a diferentes zonas, afectando una extensa área. Un modelo esquemático de este fenómeno se observa en la Fig. N°1 (Madrid y Cataldi, 2002).

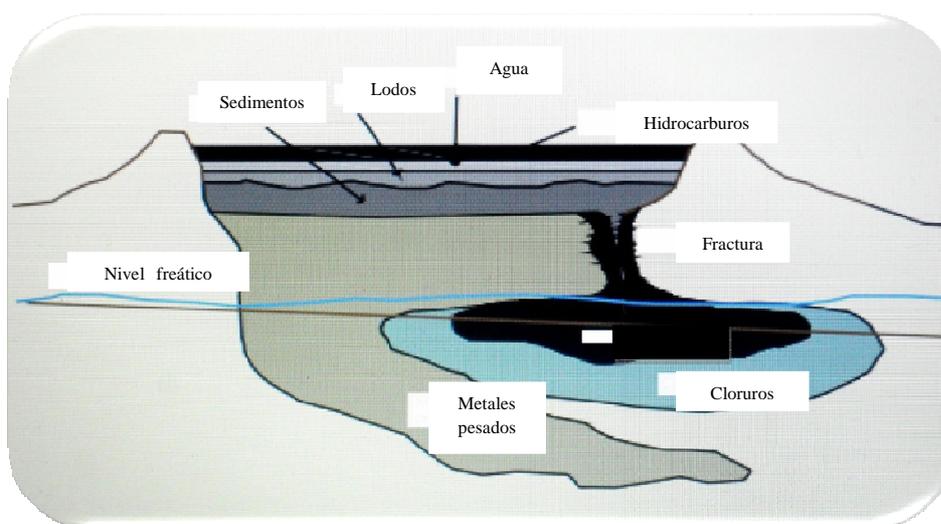


Fig. N°1. Modelo idealizado de la distribución de desechos en una fosa petrolera.

Los productos del petróleo no siempre siguen el gradiente esperado. La dirección, transporte y flujo multifase de los hidrocarburos dependen de procesos geoquímicos y procesos de volatilización, disolución, biodegradación, transporte y absorción (Fig. N°2). En términos físicos,

comprende tres fases: una fase de petróleo, una fase acuosa y una fase de vapor.

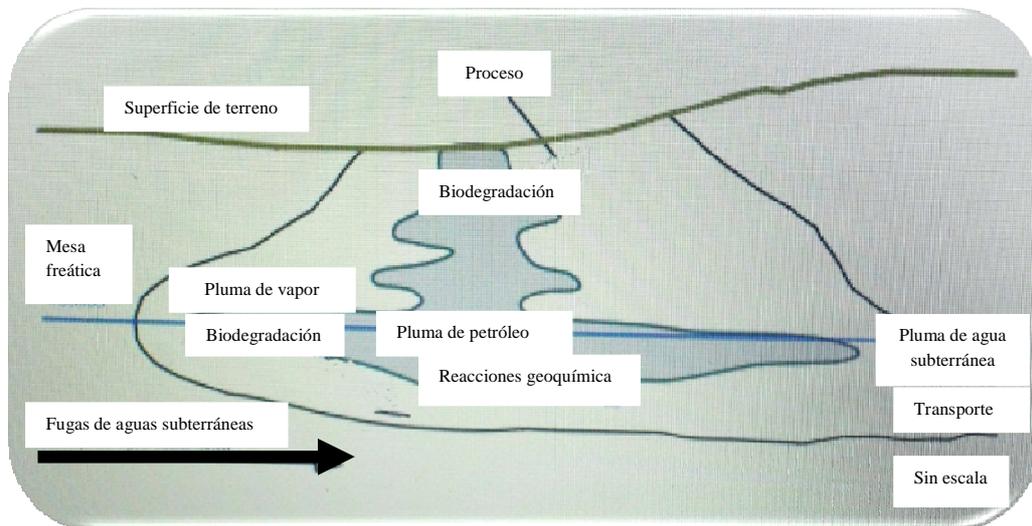


Fig. N2. Procesos críticos en la distribución y transporte de hidrocarburos en el subsuelo. Tomado de Delin y Col. (1998).

- Fase de petróleo:

El movimiento del petróleo está afectado por las propiedades de los sedimentos y su variabilidad. La degradación de los productos de petróleo produce la pérdida selectiva de compuestos solubles y volátiles, a través de disolución y volatilización.

- Fase acuosa:

Se identifican cinco zonas geoquímicas (Fig. N3). Los procesos geoquímicos cambian en el tiempo y es posible que La pluma migre de acuerdo a la velocidad de flujo del agua subterránea y las constantes de absorción de los compuestos (Baedecker y col. 1993).

- Fase de vapor:

Los componentes de petróleo volátil abandonan el subsuelo a través de volatilización, biodegradación y difusión en y a través de la zona no saturada. La distribución de gases (hidrocarburo, oxígeno, CO₂ y metano) en la zona no saturada puede identificarse en las zonas geoquímicas 6, 7 y 8 (Fig. N°3) (Madrid y Cataldi, 2002).

La distribución de gases puede cambiar considerablemente en el tiempo. La fase de vapor producida por la contaminación de hidrocarburos se presenta bajo diferentes condiciones en función de la estación climática, con mayor volatilidad en el período seco (Madrid y Cataldi, 2002).

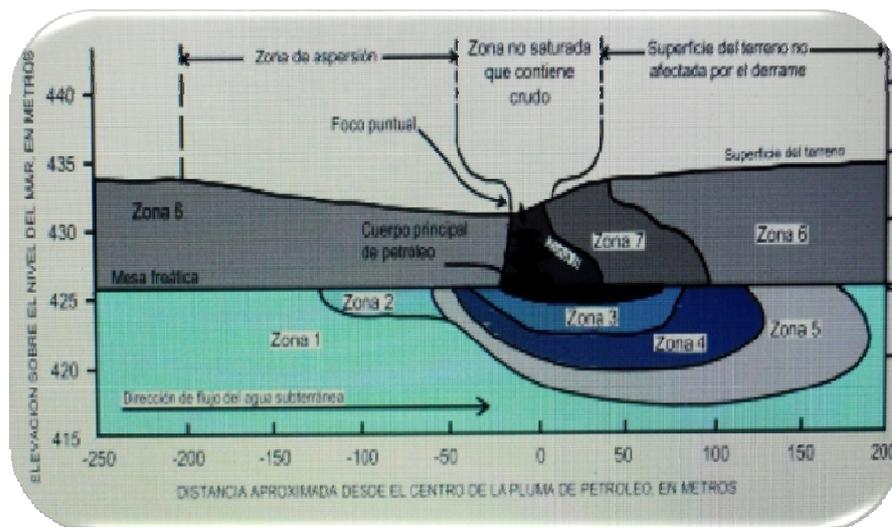


Fig. N° 3. Zonas geoquímicas en las zonas saturada y no saturada. Modificado de Baedecker y col. (1993).

Zona 1. Agua subterránea original no contaminada y oxigenada.

Zona 2. Bajas concentraciones de oxígeno y alta concentración de carbono inorgánico y orgánico disuelto total.

Zona 3. Pluma anóxica de agua subterránea que contiene elevadas concentraciones de hidrocarburo, iones de manganeso, hierro y metano.

Zona 4. Zona de transición de condición anóxica a oxigenada. Contiene baja concentración de hidrocarburos como consecuencia de los procesos de degradación aeróbica.

Zona 5. Consiste de agua oxigenada que contiene concentraciones ligeramente altas de constituyentes disueltos, tales como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX).

Zona 6. Condiciones casi atmosféricas de oxígeno.

Zona 7. Zona de transición. Baja concentración de oxígeno y media de hidrocarburo, y concentraciones más altas de CO₂ y metano.

Zona 8. Zona relativamente anóxica y contiene la máxima concentración de CO₂, metano e hidrocarburo.

2.3. Características de la comunidad microbiana en suelos contaminados

En suelos contaminados por la actividad petrolera se pueden encontrar altas densidades de microorganismos que tienen la capacidad de utilizar los compuestos contaminantes o sobrevivir en su presencia, debido a que poseen propiedades metabólicas y enzimáticas (Hansel y col. 2008). Sin embargo, en suelos no contaminados por la actividad petrolera existen bajas densidades de estos microorganismos (Bossert y Compeau, 1995; Messarch y Nies, 1997).

El conocimiento de la diversidad microbiana es de importancia, tanto para evaluar el impacto que supone una perturbación de estas características, como para determinar las poblaciones microbianas nativas que se encuentran normalmente en el área contaminada, y que pueden estar implicadas en la biodegradación de los hidrocarburos (Martínez-Alonso y Gaju, 2005). Ese conocimiento también es fundamental para evaluar la velocidad con la que degradan los contaminantes, la respuesta a los tóxicos y el efecto del agregado de nutrientes, oxígeno u otros factores que pueden favorecer el crecimiento y metabolismo de los organismos (Swannel y col. 1996; Tabak, y col. 1997; Cerniglia y Shuttleworth, 2002; Roberts, 2002).

2.4. Factores que afectan la presencia de los microorganismos en el suelo

- Temperatura

Afecta la supervivencia, el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos (Madigan y col. 2003; Atlas y Bartha, 2005), y así mismo influye en los cambios estructurales y químicos de los hidrocarburos (Ahumada y Gómez, 2009).

- pH

Afecta la actividad bioquímica de los microorganismos y los procesos enzimáticos, influyendo en la disociación, en la solubilidad de diversas moléculas y en la disponibilidad de nutrientes (Atlas y Bartha, 2005).

Cuando los microorganismos se desarrollan a pH alto, entre 9-14, son denominados alcalinófilos; otros lo hacen a pH bajo, entre 2-5, y son llamados acidófilos. Los microorganismos que crecen a rangos de pH entre 6-8 se llaman neutrófilos (Madigan y col. 2003). Los rangos mencionados pueden variar debido a la adaptabilidad de muchas cepas, aunque la mayoría de las bacterias heterótrofas y hongos se desarrollan óptimamente a valores de pH cercanos a la neutralidad, dentro de un intervalo de 6,5-8,5 (Hambrick y col. 1980; Leahy y Colwell, 1990; Venosa y col. 2001).

- Oxígeno

Este elemento es fundamental para la respiración aeróbica y para cubrir las necesidades energéticas, y funciona como agente oxidante terminal en los organismos denominados aerobios estrictos (Stanier, 1992).

Los organismos que carecen de sistemas respiratorios no pueden utilizar el oxígeno como aceptor terminal de electrones. Tales organismos se

llaman anaerobios, pero existen dos clases de anaerobios: los anaerobios aerotolerantes, que pueden tolerar el oxígeno y crecer en su presencia aún cuando no pueden utilizarlo, como por ejemplo las bacterias ácido lácticas, que poseen un metabolismo productor de energía que es exclusivamente fermentativo, y los anaerobios estrictos que mueren en presencia del oxígeno (Stanier, 1992; Madigan y col. 2003).

- Nutrientes

Durante el desarrollo y supervivencia de los microorganismos, los nutrientes son necesarios para llevar a cabo procesos de biosíntesis y otras funciones celulares. Cada organismo necesita diferentes nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos para cada género, pero en todos los casos requiere de macronutrientes (nitrógeno y fósforo) que se necesitan en grandes cantidades, mientras que otros llamados micronutrientes se proporcionan en menores cantidades y a veces sólo en cantidades trazas (Madigan y col. 2004; Pardo y col. 2004; Farhadian y col. 2008).

Los nutrientes presentes en el ambiente, se asimilan en estados elementales (orgánicos e inorgánicos), donde el estado y la cantidad de estos, son importantes para llevar a cabo un proceso de biodegradación (Eweis y col. 1999; Piskonen y col. 2002).

3. ANTECEDENTES

Las comunidades microbianas (hongos y bacterias) representan uno de los mecanismos primarios para la eliminación de contaminantes presentes en el ambiente, y por ello son de gran interés en diferentes campos. Los microorganismos utilizan los sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía para el crecimiento y multiplicación microbiana provenientes de contaminantes presentes en el medio, como son el petróleo y otros hidrocarburos, (Pozzo, 2000).

La capacidad de los microorganismos para utilizar estos sustratos es afectada por el tipo y la cantidad de sustratos, así como por factores físicos y químicos tales como pH, temperatura, concentración de nutrientes inorgánicos, humedad, textura, aireación, entre otros (Antia, 1995).

3.1. Aislamiento de cepas en suelos contaminados

Entre las cepas bacterianas aisladas de diferentes ambientes contaminados con hidrocarburos tenemos las bacterias *Alcalinivorax*, o *Planococcus*, que usan un número limitado de fuentes de carbono, preferentemente hidrocarburos, y podrían considerarse como especialistas (Dyksterhouse y col. 1995; Engelhardt y col. 2001; Golyshin y col. 2002; Yakimov y col. 1998 y 2003). No obstante, también se han aislado bacterias que no presentan esta marcada especialización, como *Marinobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* o *Geobacillus* y *Bacillus* (Gauthier y col. 1992; Gilewicz y col. 1997; Maugeri y col. 2002; Zhuang y col. 2003).

En el caso del primer reservorio del sistema de tratamiento de residuos en la Refinería del Petróleo “Hermanos Díaz” en Santiago de Cuba, Pérez y col. (2008) aislaron e identificaron 9 cepas bacterianas en suelos contaminados con hidrocarburos, de los cuales 5 eran bastones Gram⁻ y 4 Gram⁺, que pertenecían al género: *Pseudomonas*.

León y col. (2009), aislaron un total de 88 cepas bacterianas cultivables asociadas a ambientes contaminados con hidrocarburos. Encontrando que el 100% de las bacterias eran Gram⁻, y pertenecen a los siguientes géneros: *Enterobacter* (50%), *Pantoea* (14,29%), *Citrobacter* (14,29%), *Klebsiella* (14,29%) y *Comamonas* (7,14%).

En el caso de los hongos, April y col. (2000) identificaron varias especies de los géneros: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium* y *Aspergillus* en suelos contaminados con hidrocarburos. De igual forma, Solórzano y col. (2002) aislaron hongos presentes en suelos con características similares, encontrando los géneros *Paecilomyces* y *Fusarium*, así como *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos dos últimos géneros, en conjunto con *Rhizopus*, fueron también reportados por Okerentugba y col. (2003) en aguas contaminadas con petróleo.

Torres, y col. (1999) aislaron consorcios microbianos, identificando 2 colonias de bacterias Gram⁻, de las cuales una perteneció al género *Pseudomonas* y 11 colonias de hongos. Rivera-Cruz, y col. (2002a) en suelos y aguas aceitosas con derrames recientes de petróleo, aislaron 46 hongos y 34 cepas de bacterias autóctonas, encontrando que los microorganismos que presentaron un crecimiento abundante en las tres fases fueron: 3 cepas de bacterias Gram⁻ y los hongos *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*.

En suelos y sedimentos de un río contaminado por derrames de petróleo, Outdot y col. (1994) aislaron cepas microbianas (bacterianas y

fúngicas), encontrando que la capacidad degradativa de los hidrocarburos por los hongos era baja que en el caso de las bacterias, mientras que Munnecke y Huysmans (1998), aislaron hongos y bacterias presentes en suelos contaminados con hidrocarburos, encontrando que los hongos son más efectivos en la degradación de hidrocarburos, pues poseen una batería enzimática más eficiente con respecto a las bacterias.

Domínguez y Malaver (2008) aislaron cepas bacterianas y fúngicas de suelos contaminados con crudo pesado encontrando que el consorcio hongos-bacterias es más eficiente en la biodegradación de las distintas fracciones presente en el crudo pesado merey, que las cepas bacterianas y fúngicas por separado.

4. HIPOTESIS

El grado de contaminación afecta la comunidad microbiana del suelo, por lo que cambia la estructura funcional a lo largo de un gradiente de contaminación estimado desde el borde de la fosa Bared-9 a zonas menos influenciadas por la actividad petrolera.

5. OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Caracterizar la comunidad microbiana en suelos contaminados con hidrocarburos en el área de influencia de la fosa Bared-9.

Objetivos Específicos

- Determinar las densidades microbianas (bacterianas y fúngicas) a partir de una muestra de suelo contaminada por la actividad petrolera.
- Caracterizar macro y micromorfológicamente las cepas microbianas.
- Determinar el potencial bioquímico de los aislados fúngicos y bacterianos.
- Identificar a nivel de géneros, diferentes aislados fúngicos, utilizando claves taxonómicas.
- Determinar la estructura funcional de la comunidad microbiana (bacterias y hongos).

6. METODOLOGIA

6.1. Área de Estudio

La fosa se encuentra ubicada en el campo operacional Bared-9, distrito San tomé, Municipio Miranda, Estado Anzoátegui, en las coordenadas UTM: N: 348.033 y E: 373.742, asociada a los pozos MFB: 325, 111, 326, 328, 329 y 594.



Fig. N° 4. Fosa Bared-9. Fotografía tomada por el Proyecto Misión Ciencia denominado “Desarrollo, validación y transferencia de nuevas tecnologías para el saneamiento ambiental de pasivos generados por la actividad petrolera” (Junio, 2009).

6.2. Datos de la fosa Bared-9

6.2.1. Composición

Volumen	(m3)
Crudo	1323,00
Agua	1323,00
Sedimento	7560,00
Suelo contaminado	7569,00

Datos suministrados por PDVSA, San tomé.

6.3. Diseño experimental

Se cubrió en 2 etapas:

6.3.1. Labores de campo: recolección, preservación y transporte de las muestras de suelo.

6.3.2. Trabajo de Laboratorio: procesamiento de muestras de suelo y análisis microbiológico de las mismas. La Fig. N°7 presenta un esquema del diseño experimental propuesto.

6.3.1. Labores de campo

6.3.1.1. Recolección de muestras

Para la toma de muestras se trazaron 3 transectas alrededor de la fosa, y en cada transecta se ubicaron tres parcelas (I,II,III) de dimensiones: 10 m. x 5 m. Por cada parcela, se realizó una muestra compuesta, constituida por 4 submuestras que se tomaron con un barreno (Fig. N° 5), a 5 cm de la superficie del suelo, para un total de 9 muestras compuestas.(Fig. N° 6)

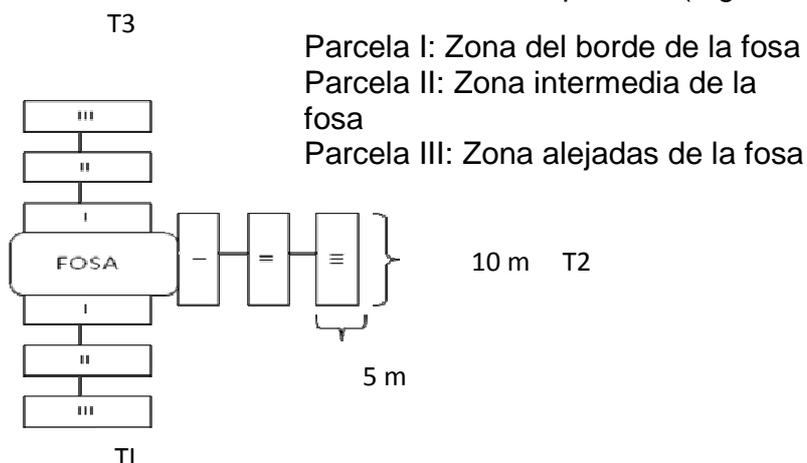


Fig. N°5. Esquema del diseño muestral propuesto en la Fosa BARE-9.

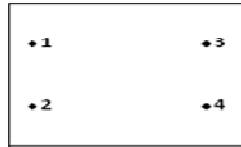


Fig. N°6. Diseño de la toma de muestras compuestas en cada parcela.

Las muestras fueron colectadas por el Laboratorio de Ecología de Suelo, ubicado en el Centro de Ecología, IVIC y coordinado por la Dra. Nelda Dezzeo. Se colocaron en bolsas plásticas y se trasladaron refrigeradas al Laboratorio de Ecología de suelos, y posteriormente suministrada al Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (I.Z.E.T.), para los análisis microbiológicos correspondientes.

6.3.2. Trabajo de Laboratorio

6.3.2.1. Análisis microbiológico

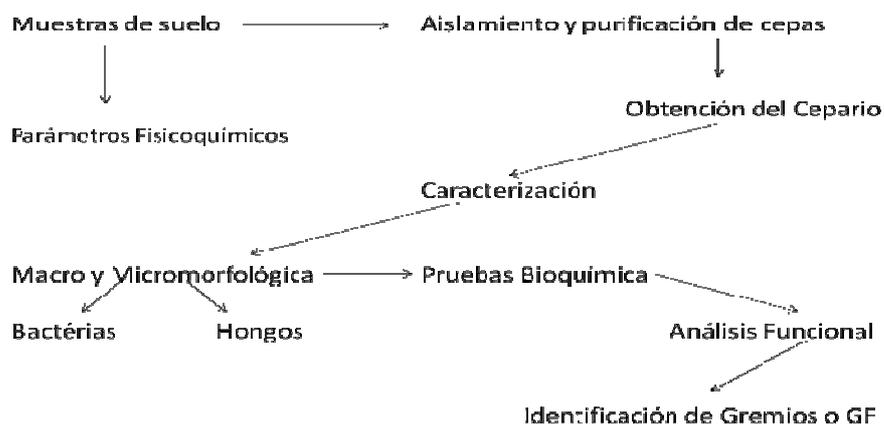


Fig. N°7. Esquema metodológico seguido en el diseño experimental.

6.3.2.1.1. Aislamiento de la comunidad microbiana

De cada muestreo se pesaron 5 g de suelo y se colocaron en fiolas que contenían 100 ml de caldo tripticasa de soya en el caso de bacterias, y para hongos se colocaron en caldo malta, a fin de realizar los análisis microbiológicos según el procedimiento propuesto por Mac Faddin (2003).

Se realizaron diluciones seriadas 1: 10000000000 en solución salina. Cada una de las diluciones se sembró por superficie en placas de Agar Plate Count (PCA) con fungicida para el aislamiento de bacterias y siembra por superficie en placas de Agar Extracto Malta (AM) con antibiótico para el aislamiento de hongos. En el caso de las bacterias, las placas se dejaron incubadas por 48 horas a 37 °C y para hongos, las placas se mantuvieron incubadas a temperatura ambiente por 4 días de crecimiento.

Para la abundancia de hongos y bacterias, se procedió al conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en placas que tuvieran entre 30 a 300 colonias, expresados en UFC/g. de suelo.

6.3.2.1.2. Caracterización Macromorfológica

A fin de obtener cultivos puros, primero se realizó una selección de 20 colonias de bacterias (con una tabla de números aleatorios) y se sembró en placas de PCA. Se aislaron todos los hongos y se sembraron en placas de AM.

Cada cepa fue descrita en términos de su morfología incluyendo borde, forma, elevación y coloración. De esta manera se obtuvo un Cepario de hongos y bacterias en tubos de ensayo.

6.3.2.1.3. Caracterización Micromorfológica

En el caso de las bacterias, se realizó mediante la técnica de tinción Gram. (Manual BBL). Las bacterias sometidas a esta prueba se clasificaron según su forma celular (cocos, bastones y cocobastones) y composición de la pared celular (Gram. positivas y negativas).

En el caso de los hongos, se realizaron microcultivos y mediante la observación con el microscopio de estructuras reproductivas teñidas con azul de algodón se determinó el género al cual pertenecen (Samson, 1995).

6.3.2.1.4. Caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, permite identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que los microorganismos (bacterias y hongos) al crecer incorporan o no (Madigan y col., 2000).

Se realizaron un total de 14 pruebas bioquímicas las cuales están orientadas a evidenciar el potencial que tienen los aislados fúngicos y bacterianos, para degradar materia orgánica. Los sustratos a utilizar fueron los siguientes:

6.3.2.1.4.1. Azúcares simples:

- **Kliger:** Se disolvió 65g de Agar Hierro de Kliger en un litro de Agua destilada. Se esterilizó en autoclave 15' a 121°C. El Agar

se sirvió en tubos de rosca, en forma de pico de flauta a fin de determinar si el catabolismo de los carbohidratos es aeróbico o anaeróbico.

- **Glucosa:** Se disolvió 10g peptona de caseína, 5g de glucosa y 12g Agar Fenol en 1 litro de Agua destilada. Se sirvió en viales y se esterilizo en autoclaves 15' a 121°C.
- **Lactosa:** Se disolvió 10g peptona de caseína, 5g de lactosa y 12g Agar Fenol en 1 litro de Agua destilada. Se sirvió en viales y se esterilizo en autoclaves 15' a 121°C.

6.3.2.1.4.2. Azucares complejos

- **Almidón:** Se prepararon placas estratificadas que contenían Agar nutritivo y Agar almidón (0.5-1g).

6.3.2.1.4.3. Actividad proteolítica

- **Gelatina:** Se empleo para determinar los microorganismos que licuan la gelatina. Se disolvió 145g de gelatina en 1 litro de Agua destilada, y se sirvió en viales. Se esterilizo en autoclave 140' a 115°C y se incubaron a temperatura ambiente 24-48h.

6.3.2.1.4.4. Actividad lipolítica

- **Tween:** Se empleo tween para determinar la actividad lipolítica de las cepas. El medio está compuesto por : 10 ml de Tween 80, 10g de peptona, 15g Agar-Agar, 5g de cloruro de sodio, 2g de cloruro de magnesio hexahidratado, 2g de carbonato ácido de calcio en 1 litro de Agua destilada. Se ajusto el pH del medio a 7,2-7,4 y una vez autoclavado durante 20' a 115°C, se vertió en placas.

6.3.2.1.4.5. Sustratos complejos

- **Utilización de pectina:** Se utilizó pectina al 1% disuelta en 500 ml de medio mínimo mineral y 15g Agar-Agar. El medio se vertió en viales.
- **Quitina:** Para la realización del medio se utilizo 15 Agar-Agar, 30g caldo ATS, 1g quitina al 0.1% y 1 litro de Agua destilada. El medio se vertió en placas.
- **Utilización de Celulosa y Lignina:** Se utilizo un medio cuya única fuente de carbono fue celulosa y lignina en cada caso. El medio se preparo utilizando 500 ml medio mínimo mineral (50 ml de Solución A + 5,0 ml de Solución B), 15g Agar-Agar, 1 litro de Agua destilada y (1-2g) lignina o celulosa según sea el caso, y se vertió en viales.

6.3.2.1.4.6. Fuente de Nitrógeno

- **Urea:** En este medio solo crecen microorganismos capaces de utilizar la urea como única fuente de carbono. Se disolvió 39g de urea en 1 litro de Agua destilada. Luego se esterilizo por filtración y se sirvió en viales.
- **Nitrato:** Se disolvió 14g de nitrato en 1 litro de Agua destilada. Se autoclavo 15' a 121°C y se sirvió en viales.

6.3.2.1.4.7. Utilización de Fósforo

- **Inositol:** (fósforo inorgánico). Se disolvió 15g Agar-Agar en 1 litro de Agua destilada. Se autoclavo 15' a 121°C. Cuando se encuentre la solución a 50°C, se le agrego 35ml de glucosa al 30%, 20 ml de Inositol hexafosfato y 25 ml de solución winogradsky. Se vertió en placas.

- **Fosfato:** (fósforo orgánico). Se disolvió 5g de peptona, 10g de dextrosa, 1g de K_2HPO_4 , 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20g Agar-Agar y 1 litro de Agua destilada. Luego de calentar la mezcla con agitación constante, se procedió a añadir 3,3 ml de Rosa de Bengala al 1% y se autoclavo 15' a 121°C. Se sirvió en placas de Petri.

6.4. Análisis estadístico de los datos

La diversidad funcional de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) se puede estimar por la caracterización del perfil fisiológico, el cual refleja el potencial bioquímico de la porción cultivable de la comunidad microbiana para responder ante diversos sustratos por la presencia de enzimas particulares y a rutas metabólicas (Buyer y Drinkwater, 1997; Bending y col. 2004).

A fin de determinar, el análisis funcional de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) aislado de las diferentes transectas, se realizó un análisis de agrupamiento de las cepas, mediante la técnica multivariada de agrupamiento de datos (clúster).

La técnica multivariada de clúster, utiliza el algoritmo de agrupación simple o vecino más cercano, donde la disimilitud entre grupos es medida a través de la distancia Euclidiana. Este procedimiento permite obtener gráficamente mediante un *dendograma* las coincidencias tanto positivas como negativas (ausencia o presencia de utilización) de cada cepa, y por tanto, provee una estimación de la similitud total entre las cepas que conforman los grupos.

Resulta evidente que dos cepas funcionalmente equivalentes tendrán los mismos valores y se ubicaran en un mismo punto en el hiperespacio, esto resulta en que la distancia entre ellas es cero y podremos considerarlas como superpuestas y funcionalmente idénticas respecto a los sustratos probados; y es equivalente a un grupo funcional (GF) formado por dos o más cepas que realizan igual función en la comunidad. Esto es lo que se denomina Grupo de Identidad Funcional (GIF).

Para cada GIF se puede calcular el índice de importancia de cada cepa dentro de los grupos funcionales (P_i). Este índice de importancia es una expresión que viene dada por el número de cepas agrupadas en un GIF en relación al número total de cepas:

$$P_i = \text{N}^\circ \text{ cepas agrupadas en un GIF} / \text{N}^\circ \text{ total de cepas}$$

Un *dendograma* también se puede ver gráficamente a través de una curva de reclutamiento de GF, las cuales se construyen sobre un eje cartesiano donde se representa en el eje X la distancia de agrupamiento, y en el eje Y el número de grupos funcionales. Mientras más rápido se forman los grupos, menos es la diferencia entre ellos y las funciones que realizan; es decir, menor diversidad funcional en la comunidad.

Finalmente, el análisis funcional concluye con el cálculo del Índice de Diversidad Funcional, el cual permite cuantificar la diversidad de una comunidad desde el punto de vista de su actividad bioquímica degradativa. Resulta de dividir para un *dendograma* dado, el número de grupos o clúster formados entre el número total de aislamientos considerados para realizar el *dendograma*, y como resultado se obtiene un número acotado entre 0 y 1; donde 1 representa el valor máximo de diversidad. El cálculo se realiza de acuerdo con el siguiente algoritmo:

$$IDF = \text{N}^\circ \text{ de GF} / \text{N}^\circ \text{ total de cepas}$$

Esta metodología permite establecer: diferencias espaciales y temporales entre comunidades, destacar la importancia de los Gremios que conforman la comunidad, plantear la equivalencia funcional de especies taxonómicamente alejadas y la utilización de un Índice de Diversidad Funcional que combina los atributos comunitarios de estructura y función.

7. RESULTADOS

7.1. Parámetros Físicoquímicos

Tabla N° 2. Caracterización físicoquímica de las muestras del suelo correspondiente a cada transecta.

Transecta	Aceites_grasas (mg/Kg)	pH	Acidez (cmol c./kg)	Aluminio (cmol c/kg)	Materia_organica (MO) (%)	Raices_finas (g/m ²)	Arena %	Arcilla %
T1PI	7176	4,7	0,26	0,43	2,06	5,61	77,6	19,3
T2PI	104	4,4	0,04	0,33	1,04	86,8	86,6	11,4
T3PI	78	4,4	0,35	0,39	0,56	19,21	74,4	23,4
T1PII	29575	5,1	0,05	0,29	2,06	7,22	75,7	21,8
T2PII	172	4,4	0,13	0,51	3,44	241,5	86,6	11,8
T3PII	39	4,3	0,33	0,39	0,62	17,07	77,4	19,3
T1PIII	286	4,6	0,04	0,32	2,43	196,75	86,2	10,8
T2PIII	200	4,7	0,09	0,39	1,75	395,8	86,6	12,9
T3PIII	644	4,3	0,15	0,32	0,89	23,6	86,1	12,9

Datos suministrados por el Laboratorio de Plantas Acuáticas. UCV

Los resultados obtenidos para las tres transectas, permite caracterizar los suelos como arenosos, con un pH promedio de 4,7 que los ubica como suelos ácidos. Los valores de aceites y grasas fueron bajos, a excepción de la parcela II en la primera transecta la cual arrojó un valor de 29575 mg/kg. Sin embargo, no es un valor que indique contaminación petrolera en el lugar. Por otra parte, en las parcela III donde existía una predominancia de plantas de alto y bajo porte, en dichos suelos se observó presencia de raíces finas.

El análisis de correlación lineal de los parámetros físicoquímicos y densidades microbianas realizadas a cada una de las muestras de suelo (Ver Tabla N° 3). No mostraron correlación significativa entre las muestras de suelo y los distintos parámetros físicoquímicos, excepto la correlación significativa entre los hongos y los valores de aceites y grasas, lo que indica

que la densidad de los hongos se ve afectada por las concentraciones de aceites y grasas.

De igual manera, se muestra en la Tabla N°3 correlación significativa entre las raíces finas con arena y entre el % arena con % arcilla. También este estudio permite señalar que los resultados obtenidos indican que las tres transectas estudiadas son diferentes entre sí.

Tabla N° 3. Correlación lineal de los parámetros fisicoquímicos y las densidades microbianas ($p < 0,05$).

	Aceites_grasas	Bacterias	Hongos	% MO	Arcilla	pH	Raíces	Acidez	Al	Arena	Limo
Aceites_grasas		ns	0,85	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bacterias			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Hongos				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% MO					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Arcilla						ns	ns	ns	ns	0,99	ns
pH							ns	ns	ns	ns	ns
Raíces_finas								ns	ns	0,74	ns
Acidez									ns	ns	ns
Al										ns	ns
Arena											ns
Limo											

7.2. Densidades microbianas

7.2.1. Bacterias y hongos

Se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) a fin de determinar la abundancia relativa de bacterias y hongos presentes en el suelo, expresadas en UFC/ gramo de suelo. En las transectas estudiadas (Ver Fig. N°8), se observó una alta densidad poblacional de bacterias en las parcelas I (bordes de la fosa, con poca cobertura vegetal) y en las parcelas

III (zonas más alejadas de la fosa, con alta cobertura vegetal), mientras que para los hongos se observó una alta densidad en las parcelas II (zonas intermedias, muy perturbadas por el paso de maquinaria, con poca vegetación y suelos relativamente compactados).

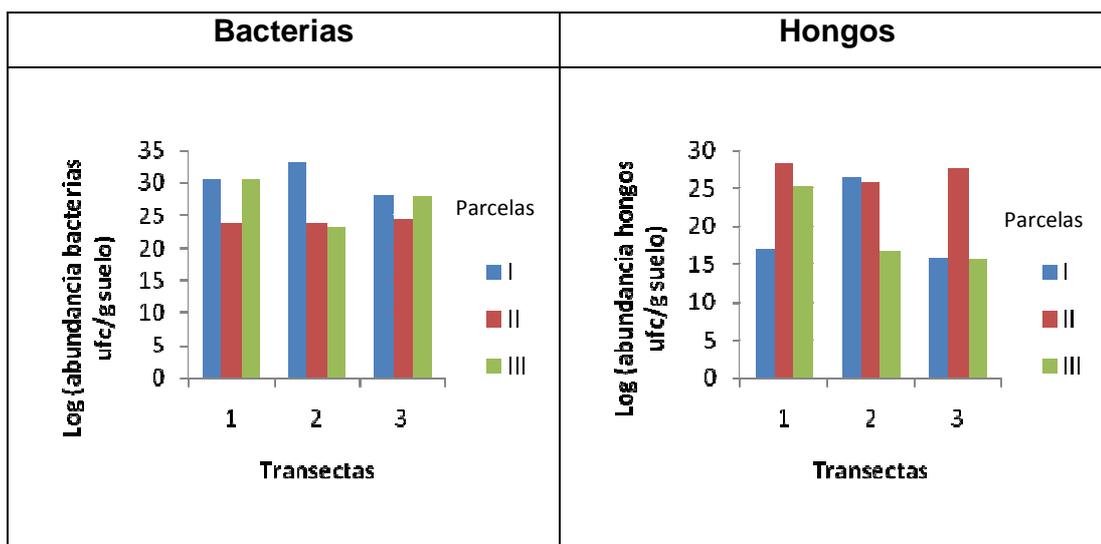


Fig. N° 8. Abundancias microbianas (bacterias y hongos) presentes en las muestras de suelo.

Los resultados observados permiten señalar que la presencia de hidrocarburos y la cobertura vegetal relativamente densa es favorable para el incremento de la densidad bacteriana, mientras que la baja cobertura vegetal y la compactación relativa de los suelos parecen representar un ambiente favorable para el crecimiento fúngico.

Con respecto a lo observado, Outdot y col. (1994) señalaron que las bacterias poseen una mayor capacidad de degradar los hidrocarburos en comparación con los hongos, debido a que presentan una mayor eficiencia por sus propiedades metabólicas y enzimáticas. Estos microorganismos utilizan los compuestos del petróleo como la fuente de carbono y energía necesaria para producir compuestos celulares y productos metabólicos (CO₂, agua, enzimas), así como para su reproducción (Ercoli, 2001). Además, se presume que son oxidadores de hidrocarburos, porque poseen en la

membrana citoplasmática un grupo específico de enzimas oxigenasas (Rosenberg y Ron, 1998; Pardo y col. 2004).

La cobertura vegetal favoreció el crecimiento bacteriano (parcela III), las cuales juegan un rol importante en la descomposición de los sustratos existentes en el suelo y contribuyen a la fertilidad del mismo y al crecimiento de las plantas (Atlas y Bartha, 2001).

La mayor densidad fúngica presente en las parcelas II, pudiera indicar que estas cepas tienen capacidad para mantenerse en aquellos lugares donde el estrés ambiental o la perturbación no favorece el crecimiento y permanencia de las bacterias, pero si a las poblaciones fúngica, como lo indican Atlas y col. (1991).

7.3. Características Macromorfológicas de la comunidad microbiana

Se aislaron un total de 180 cepas bacterianas en las muestras de suelo colectadas en las diferentes parcelas ubicadas en la fosa Bared-9, de las cuales 14 perdieron viabilidad. Por lo que se trabajo con un total de 166 cepas bacterias. Cada cepa fue descrita en términos de su morfología: forma, bordes y coloración. Se observaron los diferentes morfotipos en cada una de las parcelas, que incluyeron desde formas irregulares con bordes azules y elevación cóncava hasta formas regulares con bordes blancos y elevación plana (Anexo 2a).

En relación a las cepas fúngicas, se determinó un total de 48 cepas, que incluyeron levaduras, que son hongos unicelulares cuyas estructuras reproductivas son microscópicas y presentan formas redondeadas y

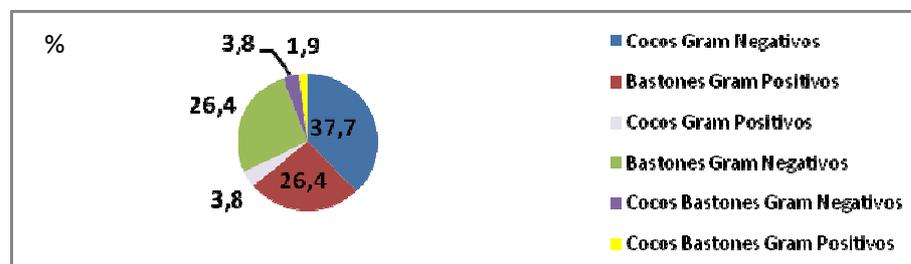
brillantes, y se aislaron hongos filamentosos multicelulares, que presentaron diversos colores, desde blanco algodonoso hasta verde oscuro (Anexo 2b).

7.4. Características Micromorfológicas de la comunidad microbiana

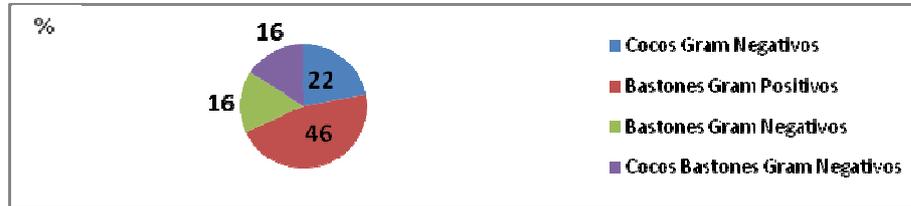
7.4.1. Bacterias

En la transecta 1 de la fosa Bared-9 (Fig. N°9) se pudo observar que predominaron las cepas bacterianas del tipo cocos Gram⁻ con una abundancia de 37,7 %, seguidos de bastones Gram⁺ y Gram⁻ ambos con una representación de 26,4% ; y en menor proporción se presentó cocos bastones Gram⁺, con una proporción de 1,9%. La comunidad bacteriana presente en las muestras de suelo de la transecta 2 se encontró dominada por bastones Gram⁺, (46 % de abundancia), seguido de cocos Gram⁻ (22 %), bastones Gram⁻ y cocos bastones Gram⁻ con 16 %, cada una. Y en la transecta 3 se encuentra dominada por bastones Gram⁺, los cuales presentan una abundancia de 73,2%, seguido de 10,7 % bastones Gram⁻. El resto de las formas celulares, tienen menor abundancia.

TRANSECTA 1.



TRANSECTA 2.



TRANSECTA 3.

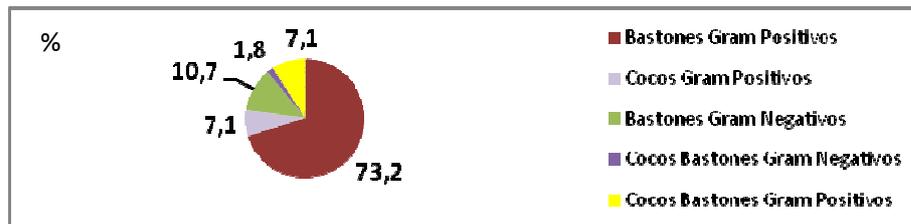
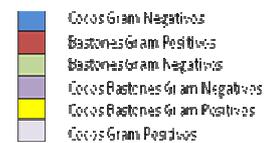
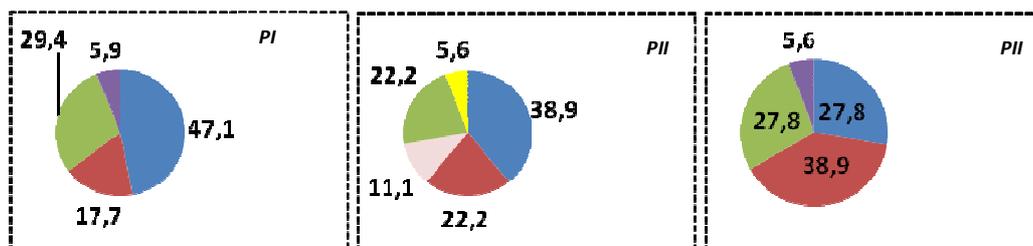


Fig. Nº 9. Porcentaje de la caracterización Micromorfológica de las cepas bacterianas aisladas de las diferentes transectas.

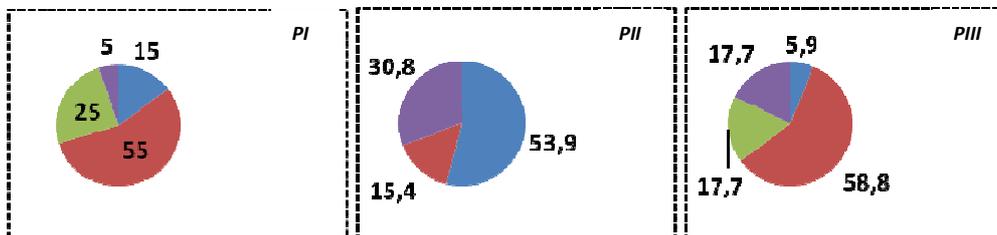
En el caso de estudiar las parcelas por separados de la transecta 1, se pudo observar que las parcelas I, que son suelos perturbados por la actividad petrolera, y parcela II, que son suelos compactados, predominaron cocos Gram⁻ (Atlas y Bartha, 2002) con una proporción de 47,1 y 38,9 %, respectivamente, seguido de bastones Gram⁻ con 29,4 y 22,2%, respectivamente, en el caso de los bastones Gram⁺ fueron más abundante en la parcela III (38,9%).



PARCELAS DE LA TRANSECTA 1.



PARCELAS DE LA TRANSECTA 2.



PARCELAS DE LA TRANSECTA 3.

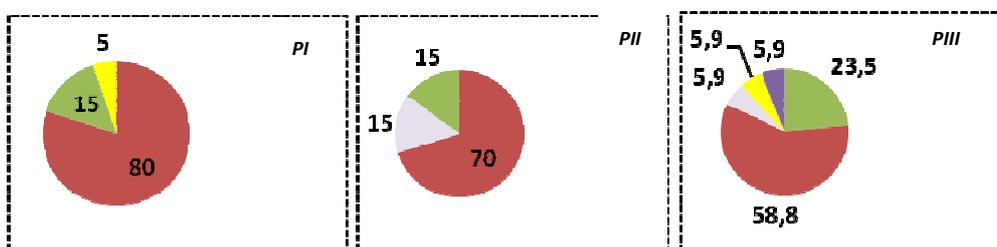


Fig. N° 10. Porcentaje de la caracterización Micromorfológica de las cepas bacterianas presentes en cada una de las parcelas de las diferentes transectas.

En la parcela III predominaron los bastones Gram⁺ (38,9 %), seguido de bastones Gram⁻ y cocos Gram⁻ (27,8), como se muestra en la Fig. N°10.

Los cocos bastones Gram⁺ se presentaron en las tres parcelas en porcentaje alrededor del 6%, mientras que los cocos bastones Gram⁻ solo se aislaron en la parcela 2.

Se observó que en la parcela I y III de la transecta 2, una predominancia de bastones Gram⁺ 55 % y 58,8 %, respectivamente, seguido de bastones Gram⁻, (25 % y 17,7 %).

En la parcela II se observó la desaparición de bastones Gram⁻, el aumento en la abundancia de cocos Gram⁻ (53,9 %) y la disminución en la abundancia de bastones Gram⁺ (15,4 %).

Y en el caso de las parcelas de la transecta 3, se pudo observar que los bastones Gram⁺ fueron dominantes en las tres parcelas estudiadas. Al mismo tiempo, la diversidad bacteriana incrementa a medida que aumenta la distancia desde el borde de la fosa hacia zonas menos influenciadas por la actividad petrolera.

Cada una de las transectas estudiadas permiten señalar que la presencia y permanencia de las poblaciones bacterianas en los suelos muestreados podría estar sujeto de la capacidad que ellas tienen de metabolizar una determinada fuente de carbono, de la disponibilidad de macro y micro nutrientes y el contenido de agua y oxígeno en el suelo, entre otros.

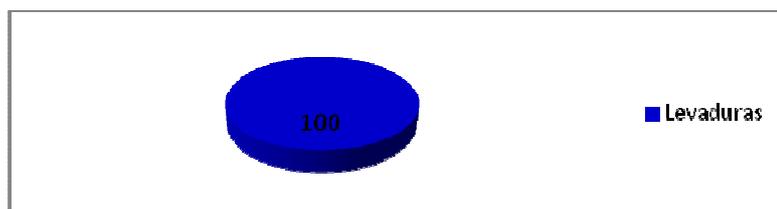
Diversos autores (Campbell, 1997; Alexander, 1980; Richards, 1987) plantean que bajo condiciones naturales los microorganismos viven en una estrecha proximidad e interactúan de una manera única, en contraste con la respuesta que éstos tienen en los cultivos puros estudiados en el laboratorio. En condiciones naturales, los miembros de la microflora dependen unos de otros para obtener ciertas sustancias de crecimiento, pero al mismo tiempo pueden establecer relaciones negativas, por lo que se evidencian efectos sinérgicos y autogénicos, pudiendo ocurrir diversos tipos de interacciones.

También se pudo observar que las formas celulares en las tres transectas estudiadas son similares, pero que diferencias en las proporciones de las mismas. Estas diferencias pueden deberse a las variaciones microclimáticas, así como de perturbación, lo que se refleja en los cambios en la estructura micromorfológicas de las comunidades bacterianas.

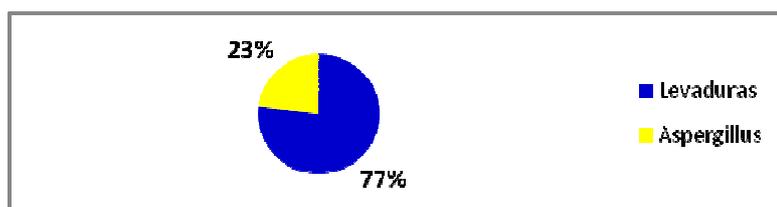
7.4.2. Hongos

Los resultados obtenidos para la comunidad fúngica en las diferentes transectas y parcelas estudiadas se muestran en la Fig. N°11.

TRANSECTA 1.



TRANSECTA 2.



TRANSECTA 3.

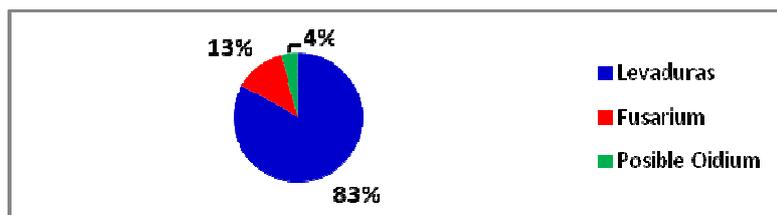


Fig. N° 11. Porcentaje de la caracterización Micromorfológica de las cepas fúngicas presentes en las diferentes transectas.

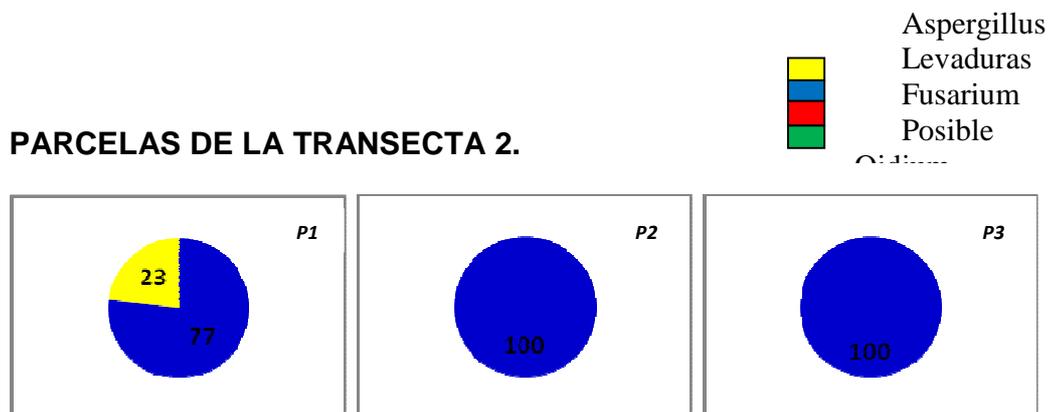
La transecta 1 estuvo dominada por 11 levaduras, ubicadas de la siguiente manera: 1 levadura blanca en la parcela I, 2 levaduras de color

beige en la parcela II y 8 levaduras de diversos colores, incluyendo blanco y beige, rosado y amarillo en la parcela III (Anexos 2b).

De la transecta 2 se aisló 13 cepas fúngicas, de las cuales 3 correspondieron al género *Aspergillus*, (23%) y el 77% restante correspondió a 10 cepas de levaduras. Las 3 cepas del género *Aspergillus* fueron aisladas de la parcela I (Anexo 2b).

En la transecta 3 también se observó la dominancia de levaduras con un 83%, seguido de la presencia de 3 hongos pertenecientes al género *Fusarium* que representan el 13% y por último una cepa que posiblemente sea del género *Oidium*, que representa un 4% en la muestra.

Al estudiar por separado las transectas, se pudo observar que la transecta 1 estuvo dominada en las tres parcelas por levaduras, como se muestra en la Fig. N° 11. En el caso de la transecta 2, también estuvo dominada por levaduras en las tres parcelas (100%), excepto en la parcela I que se observó la presencia del hongo filamentoso *Aspergillus* (23%).



PARCELAS DE LA TRANSECTA 3.

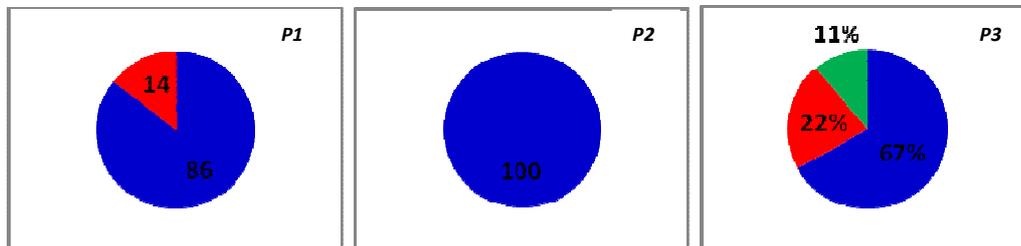


Fig. N° 12. Caracterización Micromorfológica de las cepas fúngicas presentes en las tres parcelas de las diferentes transectas.

La distribución fúngicas en las diferentes parcelas de la transecta 3, estuvo dominada en la parcela I, por levaduras con un 86 % y 14 % por hongos pertenecientes al género *Fusarium*. En la parcela II, se aislaron solo levaduras y en la parcela III fue más diversa, se observó la dominancia de levaduras (67 %) y la presencia de *Fusarium* (14%) y otro hongo filamentoso por confirmar si posiblemente pertenezca al género *Oidium* con 11 % de abundancia.

En las parcelas de las diferentes transectas estudiadas, se observó, en el caso de las parcelas I, la dominancia de las levaduras, así como la presencia de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, con un 5%, en la transecta 2 y 3.

Estos últimos resultados coinciden con los reportados por Leahy y Colwell (1990) y Okerentugba y Ezeronye (2003), quienes encontraron que los hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* son degradadores de hidrocarburos, lo que explicaría la presencia de esos hongos en los bordes de la fosa. De igual forma, (Rosenberg y Ron, 1998), aislaron, entre otros hongos, los antes mencionados, y suponen la presencia de oxigenasas en la membrana citoplasmática y es por ello, que logran permanecer en dichos ambientes de estrés.

Cabe destacar que los suelos de esta parcela son cercanos al borde de la fosa, lo que indica visiblemente la presencia de hidrocarburos, que son utilizados por dichos microorganismos como fuente de carbono y energía, debido a que contienen los elementos químicos necesarios para su desarrollo (carbono, nitrógeno, azufre y oxígeno), (Ercoli y col. 2001).

En las parcelas II de las tres transectas se observó la presencia de levaduras (100%) y la ausencia de hongos filamentosos, lo cual puede deberse a que la mayoría de los hongos filamentosos del suelo son oportunistas (zimógenos), y crecen llevando a cabo un metabolismo activo cuando las condiciones le son favorables (Hernández, 2008). Por otro lado, Atlas y Bartha (2001) indican que el letargo o latencia es una condición típica de los hongos filamentosos del suelo, los cuales se inactivan en ausencia de substratos disponibles, conservando su viabilidad.

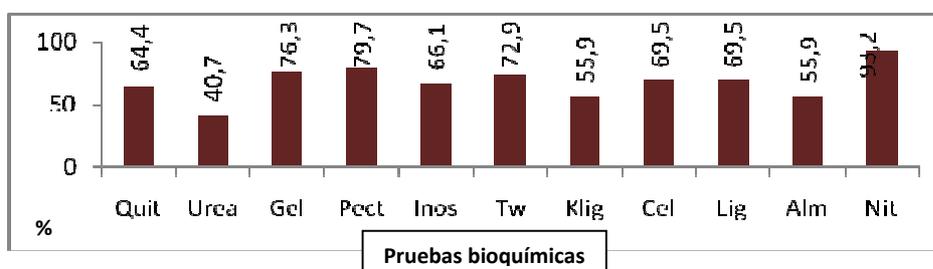
En las parcelas III de las transectas, se observó la presencia de *Fusarium* y de otros hongos filamentosos que probablemente pertenezca al género *Oidium* (parcela III de la transecta 3), también fueron abundantes las levaduras (84%). Este comportamiento puede deberse a que en estas parcelas se observó una alta cobertura vegetal de plantas de alto y bajo porte. Bajo estas circunstancias, esos hongos cumplen funciones, tales como: fragmentación de las hojas de los árboles, degradación de la madera y de la materia orgánica en el suelo. Así mismo, esos hongos pueden encontrarse estableciendo simbiosis micorrícicas o como endófitos de hojas y raíces, relación que se ha estudiado con atención debido a que muchas plantas colonizadas por hongos son una fuente valiosa de metabolitos útiles y de productos con valor medicinal e importancia económica (Sosa-Rodríguez y col., 2009).

7.5. Características Bioquímicas de la comunidad microbiana

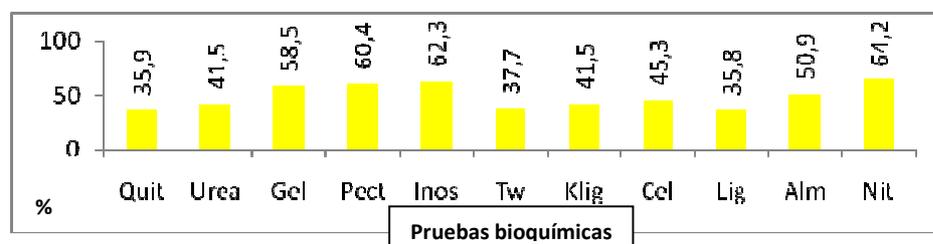
7.5.1. Bacterias

Se muestra a continuación, la respuesta de la comunidad bacteriana frente a la utilización de distintos sustratos.

TRANSECTA 1.



TRANSECTA 2.



TRANSECTA 3.

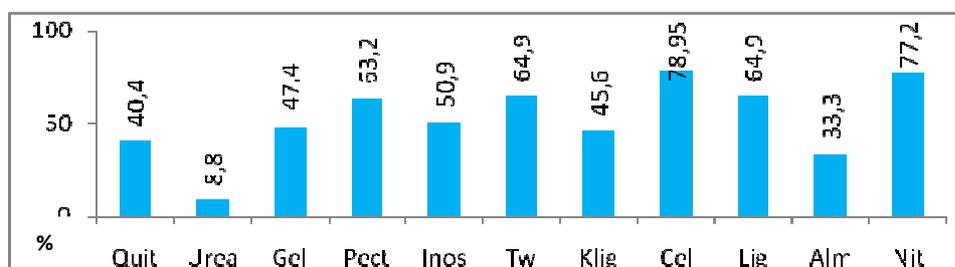


Fig. N° 13. Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas presentes en las diferentes transectas de la fosa Bared-9.

Las cepas presentes en la transecta 1, degradaron los diferentes sustratos a las que fueron expuestas. Se observó que el 93,2 % utilizaron nitrato, (79,7%) pectina, (76,3%) actividad proteolítica, (72,9%) actividad lipolítica, (69,5%) celulosa, (69,5%) lignina, (64,4%) quitina y (55,9%) klier (utilización de azúcares simples). Esto nos indica que la comunidad bacteriana en dicha transecta presenta un potencial bioquímico que le confiere la capacidad de producir enzimas capaces de degradar compuestos complejos, y participar en el proceso de descomposición de la materia orgánica, utilizándola como fuente de carbono y energía para su crecimiento y mantenimiento. También se puede apreciar que un 40,7% de las cepas presentaron la capacidad de desdoblar urea, más de un 90% de las cepas fueron capaces de transformar el nitrato a nitrito, esto les confiere un gran potencial participativo en el uso de diferentes fuentes de nitrógeno.

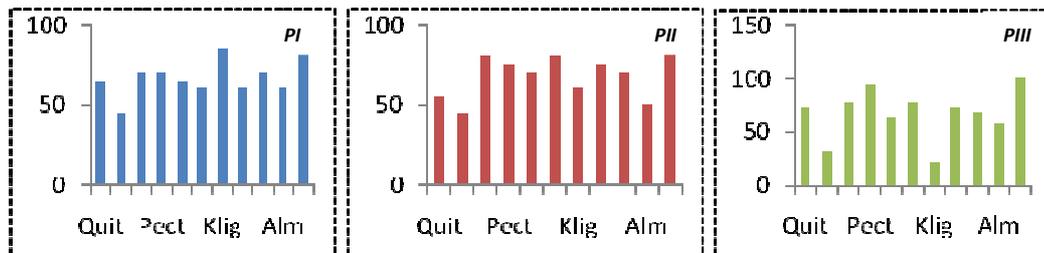
En la transecta 2, se observa que las cepas presentaron un espectro bioquímico similar a la transecta 1, con % variables de degradación de los sustratos nitrato (64,2%), inositol (60,4%), pectina (60,4%), actividad proteolítica (58,5%) y almidón (50,9%). Mientras que el resto de los sustratos presentaron media y baja actividad de degradación por parte de las cepas.

En la transecta 3 se puede observar un alto porcentaje de cepas bacterianas que tienen la capacidad de degradar sustratos complejos como celulosa, pectina, lignina y tween; sin embargo, la capacidad de utilización de nitrógeno a través de la producción de ureasas se observó en muy baja proporción en las cepas.

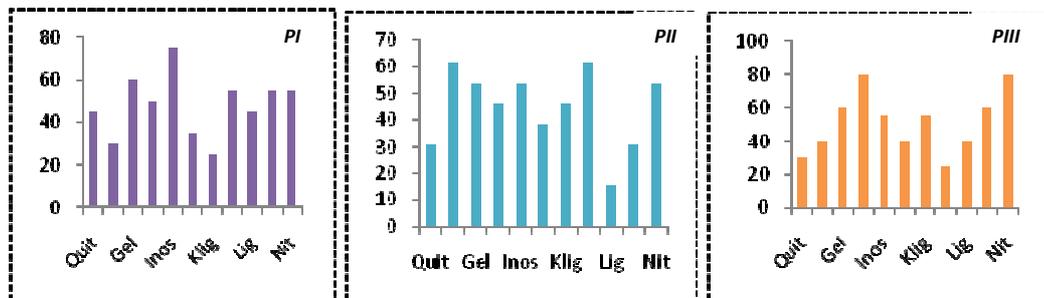
Cabe destacar que las cepas bacterianas presentes en las tres transectas, presentaron baja capacidad de desdoblar la urea, utilizando como única fuente de nitrógeno: nitrato, lo cual está relacionado con el hecho que en la naturaleza, la mayoría de las bacterias son capaces de usar amoníaco

como única fuente de nitrógeno, y otras muchas pueden usar nitratos (Madigan, 2004).

PARCELAS PRESENTE EN LA TRANSECTA 1.



PARCELAS PRESENTE EN LA TRANSECTA 2.



PARCELAS PRESENTE EN LA TRANSECTA 3.

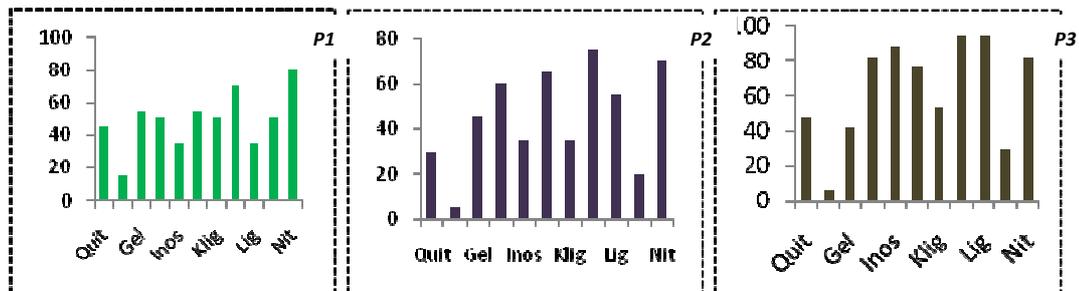


Fig. N° 14. Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas presentes en las parcelas de las diferentes transectas.

En las parcelas de la transecta 1, se pudo observar que a medida que nos alejamos del borde de la fosa hacia zonas menos influenciada por la actividad petrolera, desde la parcela I a la III, existe cambios en las

proporciones de los sustratos degradados, sin embargo, muestran un potencial bioquímico similar, frente a los diferentes sustratos a los que fueron sometidas.

Al estudiar las parcelas por separado de la transecta 2, se pudo observar que las cepas presentaron la capacidad de degradar sustratos complejos y presentan baja actividad ureásica. Cabe destacar que en la parcela II, aumentaron las cepas capaces de degradar urea, disminuyendo a su vez aquellas que tienen la capacidad de degradar lignina. En la parcela 3, disminuyó el número de cepas que degradaron sustratos como quitina, tween y celulosa, y aumentaron las cepas que degradaron sustratos como pectina y nitrato.

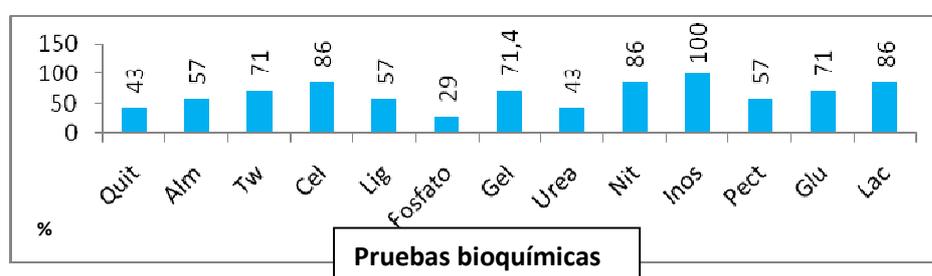
En la transecta 3, se pudo observar que la mayoría de las cepas degradaron los sustratos a los que fueron sometidas, con la excepción de la urea (18%). En la parcela II existe dominancia en la degradación de sustratos tales como: pectina, actividad proteolítica, actividad lipolítica, celulosa, lignina y nitrato; de igual forma, en esta parcela se presentó baja actividad ureasica. En el caso de la parcela III, se observó una alta degradación de sustratos complejos como: nitrato, lignina, celulosa, pectina, inositol y tween (82, 94, 94, 82, 88, 76%, respectivamente).

Los resultados de las pruebas bioquímicas nos indican que las diferentes cepas que conforman la comunidad bacteriana, poseen rutas metabólicas que les permiten la producción de enzimas capaces de degradar los sustratos complejos (celulosa, pectina) además de presentar actividad lipolítica, proteolítica y reducción de nitrato a nitrito. Esto le confiere una capacidad de utilización como fuentes de carbono y energía, de residuos vegetales presentes en el suelo, (Mason, 1976).

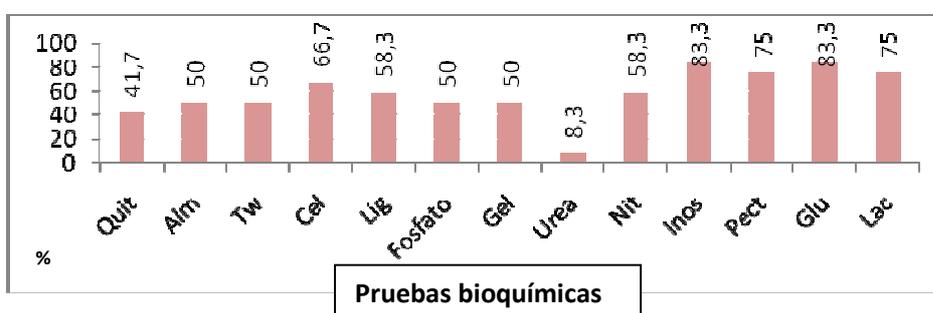
7.5.2. Hongos

Se muestra a continuación, el comportamiento de la comunidad fúngica presente en los suelos de cada transecta y cada parcela frente a la utilización de distintos sustratos.

TRANSECTA 1.



TRANSECTA 2.



TRANSECTA 3.

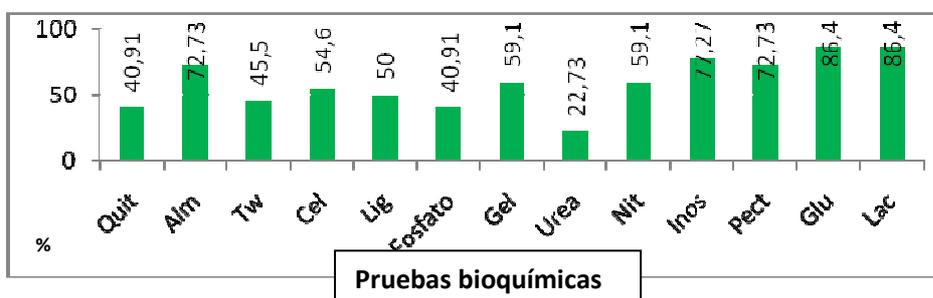


Fig. N° 15. Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas fúngicas presentes en las parcelas ubicadas en la fosa Bared-9.

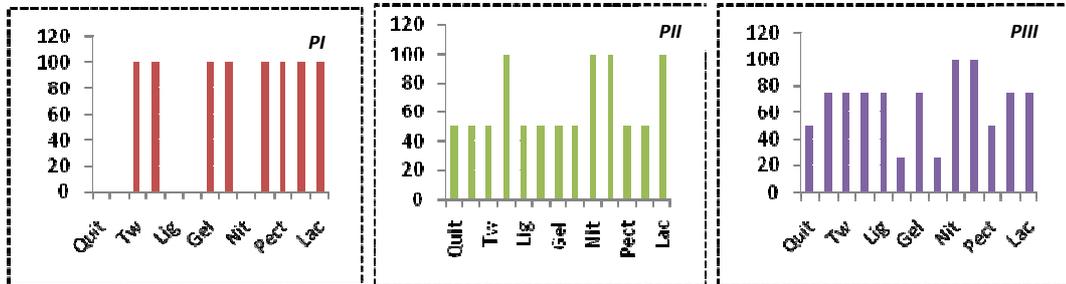
En la transecta 1 se observa que los sustratos lactosa, nitrato, celulosa e inositol fueron degradados por un alto porcentaje de cepas, mientras que para el sustrato fosfato orgánico se obtuvo que solo el 29 % de la población fúngica utilizó ese compuesto como fuente de energía.

Las cepas aisladas de la transecta 2 degradaron sustratos como azúcares simples: lactosa (75%), glucosa (83,3%); sustratos complejos como: pectina (75%), lignina (58,3%) y celulosa (66,7%); fuente de nitrógeno: nitrato (58,3%); fuente de fósforo: inositol con un alto porcentaje (83,3%), mientras que el resto de los sustratos fueron degradados por un porcentaje medio y bajo de cepas.

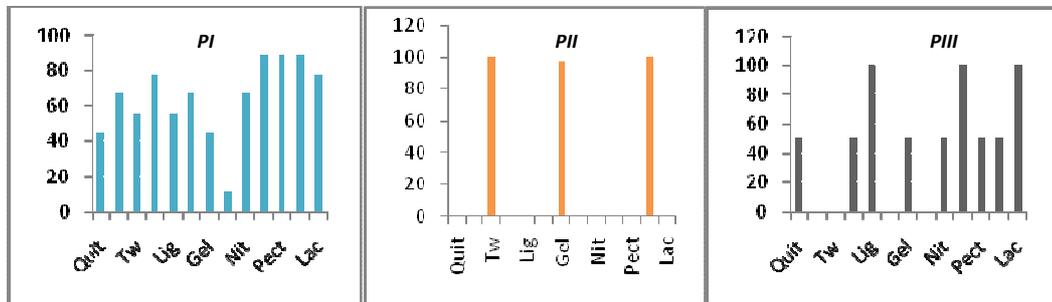
Las cepas aisladas de la transecta 3, presentan un alto porcentaje de degradación frente a los sustratos complejos: pectina, lignina y celulosa, nitrato, actividad proteolítica, fuente de fosforo inorgánico. Además de azúcares simples y complejo.

La población fúngica presente en la parcela I de la transecta 1, degradó sustratos tales como lactosa, glucosa, pectina, fósforo inorgánico, urea, gelatina, celulosa y tween, y no degradaron el resto de los sustratos a las que fueron sometidas. En la parcela II, las cepas aisladas degradaron todos los sustratos a los que fueron sometidas, encontrándose que el mayor porcentaje de degradación lo hicieron frente a la celulosa, que es el sustrato complejo. El nitrato fue la única fuente de nitrógeno, el inositol fue la fuente de fósforo y la lactosa fue el sustrato simple. El resto de los sustratos fueron degradados por el 50% de las cepas presentes. Y en el caso de la parcela III de la transecta 1, se observó que las cepas aisladas de este sitio aumentaron la capacidad de degradar los sustratos presentes, manteniendo al nitrato como fuente de nitrógeno y al inositol como fuente de fósforo.

PARCELAS PRESENTES EN LA TRANSECTA 1.



PARCELAS PRESENTES EN LA TRANSECTA 2.



PARCELAS PRESENTES EN LA TRANSECTA 3.

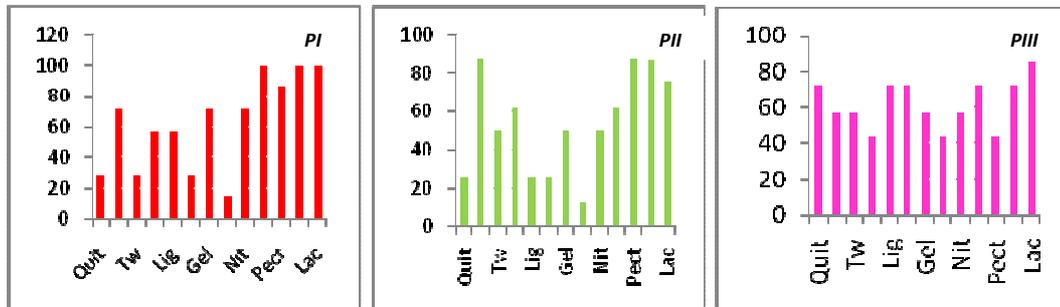


Fig. N°16. Porcentaje de la caracterización bioquímica de las cepas fúngicas presentes en las parcelas de las transectas.

En las parcelas I de la transecta 2 se observa que en la parcela I las cepas presentes degradaron los sustratos a los que fueron sometidas en un alto porcentaje, con excepción de la fuente de nitrógeno: urea. Al aumentar la distancia desde el borde de la fosa hacia el exterior de la misma (parcelas II y

III), disminuyó el porcentaje de cepas que degradaron los sustratos, observándose un alto porcentaje en la actividad lipolítica, actividad proteolítica y azúcares simples como glucosa. En la parcela III aumentó el número de cepas que degradaron sustratos complejos como quitina (50%), lignina (100%); se utilizó fósforo inorgánico (100%) y un azúcar simple: lactosa (100%). En la parcela I, las cepas aisladas degradaron almidón (71%), celulosa (57%), actividad proteolítica (71%), nitrato (71%), utilización de fósforo inorgánico (100%), pectina (86%) y azúcares simples: lactosa y glucosa (100%). En el caso de la parcela II, disminuyeron las cepas que degradan sustratos como: lignina, fósforo orgánico, fuente de nitrógeno: urea y azúcar simple: lactosa; mientras que en el resto de los sustratos aumentaron las cepas degradadoras. Y en la parcela III, aumentaron las cepas que degradaron los sustratos a los que fueron sometidas.

Con los resultados observados anteriormente se puede observar que la comunidad fúngica, estuvo dominada por hongos unicelulares (levaduras) y presentó un alto porcentaje en degradación de sustratos simples como lactosa y glucosa, entre otros sustratos. Eso se debe a que las levaduras poseen un metabolismo que acumulan fuentes de carbono como glucosa o lactosa en forma de intermediarios energéticos como etanol, consiguiendo con ello convertir un sustrato fácilmente asimilable por la mayoría de la flora con la que compite, en otro sustrato que pocas especies pueden utilizar. Además el etanol es altamente tóxico a concentraciones a las que las levaduras son muy tolerantes (Camacho y col. 2009).

En general, la comunidad microbiana (bacterias y hongos) presenta una importante acción degradativa, y por lo tanto juega un papel importante en el ciclaje de nutrientes en dichos suelos. Se pudo observar que los hongos y bacterias degradaron y mineralizaron todos los sustratos a los que fueron expuestos, en su mayoría compuestos complejos como: celulosa, lignina, quitina y pectina que son compuestos recalcitrantes y de cadenas

largas con enlaces estables que son difíciles de atacar por los microorganismos, indicando que esta comunidad puede ser sometida a compuestos hidrocarbonados (compuestos del petróleo) y se esperaría la degradación de los mismos, por lo que son cepas que pueden ser utilizadas en pruebas que le permita generar tecnologías de biorremediación para zonas petroleras impactadas.

Zak y col. (1994) señalan la importancia de considerar los cambios en la composición de la actividad de las comunidades microbianas, ya que ello puede tener efectos sobre el funcionamiento de los ecosistemas (ciclaje de nutrientes). Por esta razón, esos autores plantean que la funcionalidad más que la diversidad taxonómica suministra un gran conocimiento y comprensión del rol microbiano dentro de los ecosistemas.

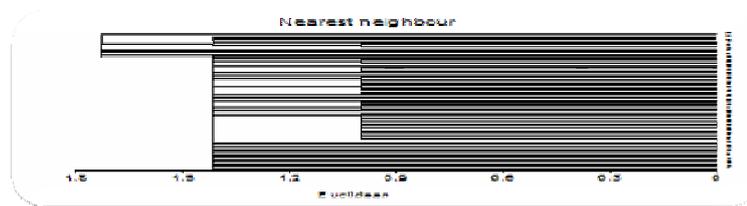
También Álvarez (2005) señala la importancia de los estudios de las comunidades microbianas, debido a la presencia de enzimas extracelulares de carácter hidrolítico u oxidativo que degradan sustancias en el exterior de la célula (Münster y Chróst, 1990), y que son exclusivas de los microorganismos en un amplio sentido de la palabra (bacterias, hongos, fitoplancton y protozoos).

7.6. Caracterización funcional de la comunidad microbiana

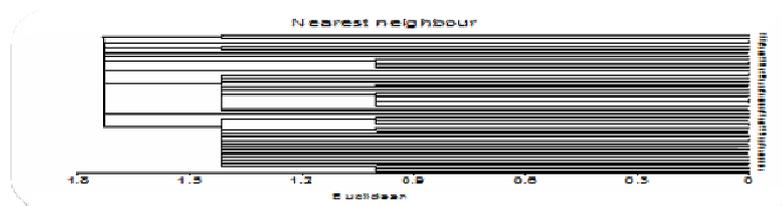
7.6.1. Bacterias

A continuación se muestra el análisis de clúster realizado a la comunidad bacteriana. Dicho análisis se realizó según transecta y para cada una de las parcelas de cada transecta.

TRANSECTA 1.



TRANSECTA 2.



TRANSECTA 3.

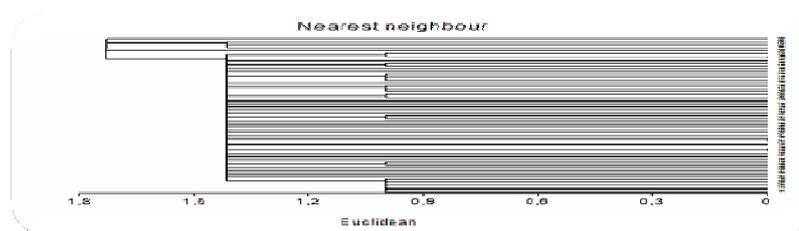


Fig. N° 17. Análisis de Clúster de la comunidad bacteriana presente en cada una de las transectas.

El clúster realizado para la transecta 1, incluye 57 cepas bacterianas, en función a la disimilitud en el potencial bioquímico entre las cepas, y tomando en cuenta los diferentes nodos, se forman 3 grupos, que corresponde a una distancia Euclídeana de 1, 1.4, y 1.8, respectivamente.

Dentro de los 3 grupos, se formaron grupos de identidad funcional (GIF) que corresponde a cepas que presentan igual respuesta frente a los sustratos probados, por lo que se superponen y la distancia que los separa es 0. En la Tabla N° 4 se muestra como están constituido los diferentes grupos.

Tabla N° 4. Grupos funcionales y grupos de identidad funcional correspondiente a la comunidad bacteriana presente en la transecta 1.

Grupo	Cepa	Pruebas bioquímicas										
		Quit	Urea	Gel	Pect	Inos	Tw	Klig	Cel	Lig	Alm	Nit
1	2 GIF y 28 GF				X							X
2	1 GIF y 20 GF									X		X
3	4 GF y grupo 2.											X

El grupo 1 incluye 2 GIF (grupo de identidad funcional) y 28 grupos funcionales (GF), que se encuentra separado del resto de la comunidad bacteriana a una distancia Euclidea de 1, y presentaron en común ser degradadores de pectina y respuesta positiva a la reducción de nitrato a nitrito. El GIF1 lo conforman las cepas 9 y 31 que correspondieron a cepas aisladas de la parcela I y II respectivamente, presentaron en común la degradación de: almidón, celulosa, lignina, pectina, actividad lipolítica y proteolítica, fósforo inorgánico y utilización de nitrato, y urea. Y el GIF2 está conformado por las cepas 23 y 59, que corresponde a cepas aisladas de la parcela I y II y presentan en común la degradación de 8 sustratos, que son: quitina, celulosa, lignina, pectina, actividad proteolítica y lipolítica, nitrato y fósforo inorgánico.

El grupo 2 está formado por 1 GIF y 20 GF, separados a una distancia Euclidea de 1.4, del resto de la comunidad. Los GF degradan lignina y reducen el nitrato a nitrito. El GIF está constituido por dos cepas bacterianas

(26, 52) aisladas de la parcela I y II, que degradan en común los siguientes sustratos: quitina, celulosa, lignina, nitrato y actividad proteolítica y lipolítica.

El grupo 3 está constituido por 4 GF y el grupo 2, separados a una distancia Euclídeana de 1.8. Este grupo difieren en la degradación de 9 sustratos y se asemejan por tener en común la capacidad de reducir el nitrato a nitrito. Cabe destacar que la cepa 46 es la más disímil, por lo que no se une con ninguna otra cepa o grupo. Esta cepa en particular, degradó los siguientes sustratos: celulosa, pectina, fósforo inorgánico, actividad proteolítica y lipolítica y urea.

La transecta 2 está formada por 45 grupos, los cuales se discrimina en 6 GIF (integrado por dos cepas) y 39 GF, que se encuentran agrupados en 3 grupos a diferentes distancias Euclidianas.

El grupo 1 está agrupado por 3 GIF y 18 GF, a una distancia Euclídeana de 1, que son degradadores de pectina y reducen el nitrato a nitrito.

Los GIF están constituido de la siguiente manera: El GIF1 está formado por dos cepas (63, 87) que corresponde cepas aisladas de la parcela I y II, que presentan en común la degradación de 3 sustratos, los cuales son: quitina, almidón, fósforo inorgánico y urea

Las cepas 83 y 84 conforman el GIF2 que corresponden a cepas aisladas de la parcela II. Presenta en común la degradación de los siguientes sustratos: celulosa, nitrato y actividad proteolítica.

Y el GIF3 agrupa (108 y 120), separados a una distancia Euclídeana de 1, que corresponde cepas aisladas de la parcela II. Los sustratos que presentan en común son: lignina, pectina, fósforo inorgánico y las dos fuentes de nitrógeno: urea y nitrato.

El grupo 2 está constituido por 2 GIF y 21 GF que se encuentra separado a una distancia Euclídeana de 1.4, presentando en común la degradación de los siguientes sustratos: pectina y almidón.

El GIF1 corresponden a cepas aisladas de la parcela I, presentan en común la degradación de: quitina, almidón, pectina, fósforo inorgánico, actividad proteolítica y urea.

El GIF2 está agrupado por 2 cepas aisladas de la parcela II. Degradaron los siguientes sustratos en común: almidón, celulosa, nitrato, pectina y actividad proteolítica.

A una distancia Euclídeana de 1.7, se forma el tercer grupo, que está constituido por 1 GIF y 6 GF, donde la mayoría de las cepas, degradan los siguientes sustratos: quitina, celulosa, fósforo inorgánico, actividad proteolítica y lipolítica.

El GIF está constituido por las cepas (79 y 102) aisladas de las parcelas I y II. Presentan en común la degradación de los siguientes sustratos: quitina, almidón, celulosa, pectina, fósforo inorgánico, actividad proteolítica y lipolítica.

Y en la transecta 3, se formaron 3 GIF y 54 GF, agrupados en 3 grupos de acuerdo a su distancia Euclídeana. El grupo 1 está conformado por 1 GIF y 22 GF, separados a una distancia Euclídeana de 1, donde las cepas presentan la mayoría la degradación del sustrato: celulosa. El GIF se encuentra compuesto por 2 cepas bacterianas (174, 180) aisladas de la parcela III. Se agrupan por la degradación común de sustratos, tales como: quitina, celulosa, lignina y pectina.

El grupo 2 está formado por 2 GIF, 30 GF y el grupo 1, separados a una distancia Euclídeana de 1.4, que se agrupan de acuerdo a sus semejanzas y diferencias con respecto a sus potenciales bioquímicos. Se

asemejan la mayoría de los GF por la degradación de 2 sustratos, los cuales son: celulosa y nitrato.

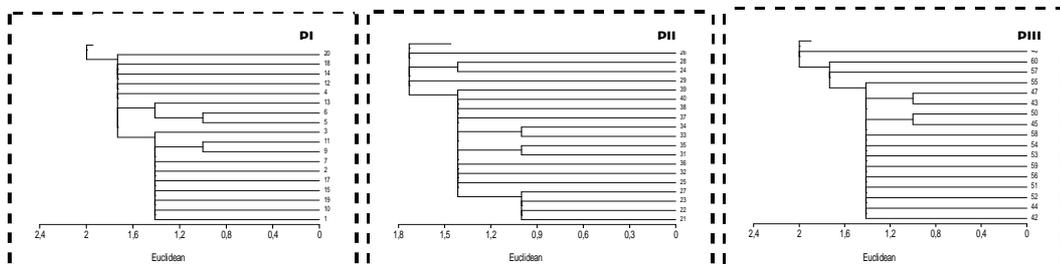
Las cepas (172, 176) degradan compuestos como: celulosa, lignina, nitrato, pectina, actividad lipolítica y fósforo inorgánico, y pertenece a la parcela III. Estas cepas constituyen el GIF1.

El GIF2 está representado por las cepas (154, 158), que pertenecen a la parcela 2, y degradan los siguientes sustratos: quitina, celulosa, lignina, nitrato, fósforo inorgánico, actividad proteolítica y lipolítica.

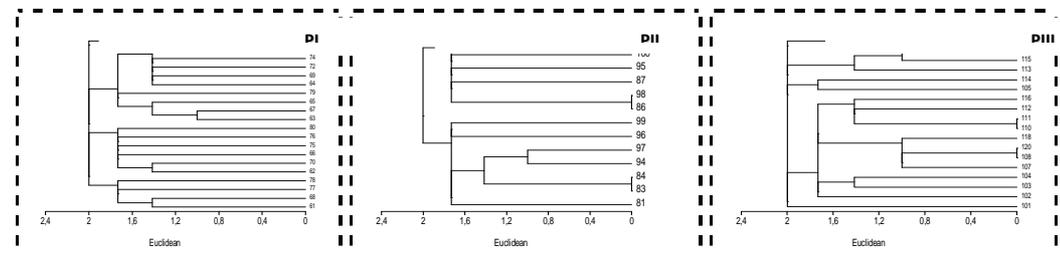
Y el grupo 3, está representado por 2 GF y el grupo 2. Este grupo se encuentra separado a una distancia Euclidea de 1.7, que presentan en común la mayoría de los grupos de degradar nitrato.

Los 2 GF corresponden a dos cepas disimiles entre sí y con el resto de los grupos.

PARCELAS DE LA TRANSECTA 1.



PARCELAS DE LA TRANSECTA 2.



PARCELAS DE LA TRANSECTA 3.

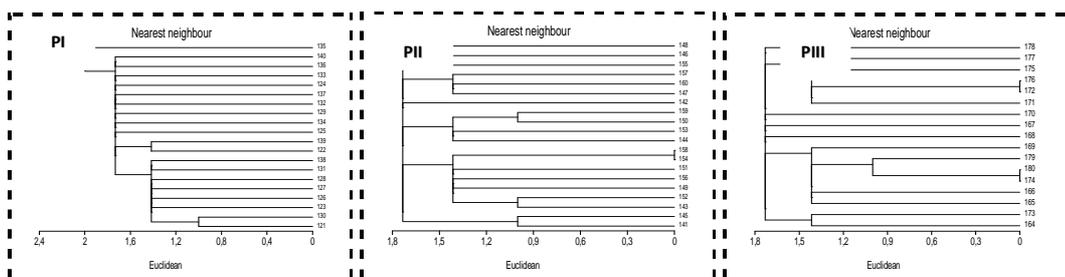


Fig. N° 18. Análisis de Clúster de la comunidad bacteriana presente en las parcelas de las transectas.

En el estudio por separado de las parcelas, se observa que en las parcelas de la transecta 1, se formaron 3 grupos, de acuerdo a la distancia Euclídeana: 1, 1.4, 2.7.

En las parcelas no se formó GIF. La parcela I está constituida por 19 cepas bacterianas, las cuales presentan en común la degradación de los siguientes sustratos: nitrato y el azúcar simple: Kliger. La parcela II, agrupó 20 GF, que presentaron en común la degradación de 1 sustrato, que fue: nitrato. Y 18 GF se formó en la parcela III, que presentan en común la degradación de 2 sustratos: pectina y nitrato.

Cabe destacar, que en las 3 parcelas se formaron GF separadas y disimiles entre sí, que presentan la degradación de sustratos, tales como: pectina, kliger y nitrato, en el caso de la parcela I. En la parcela II y III se formaron 2 GF disimiles y que no se agrupa a ningún otro grupo, y presentan la degradación de: pectina.

En el caso de las parcelas de la transecta 2, se observa la formación de 2 GIF en la parcela II y III, que presentan en común la degradación de 2 sustratos: celulosa y nitrato

La parcela I y II están constituidas por 3 grupos: El grupo 1 de la parcela I están formados por 2 cepas (63, 67), que presentan en común la degradación de los siguientes sustratos: quitina, almidón, nitrato, fósforo inorgánico.

El grupo 2 está formado por 10 GF y grupo 1, agrupados a una distancia Euclídeana de 1.4. La prueba bioquímica que presentaron en común fue la siguiente: fósforo inorgánico.

A una distancia Euclídeana de 1.7, se formó el grupo 3 que está formado por 7 GF y el grupo 2. Estos GF presentan en común la degradación de 2 sustratos, los cuales son: celulosa y nitrato.

Y un GF aislado, que corresponde a la cepa bacteriana con características funcionales más disímil en comparación con los otros grupos formados. Esta cepa presenta la degradación de 8 de los sustratos a la que fue expuesta, con la excepción de la prueba: almidón y kliger.

El grupo 1 de la parcela II, está constituido por 2 GF (94, 97) y 1 GF, agrupados por la degradación de sustratos, como: pectina, celulosa y nitrato.

El GIF conformado por 2 cepas bacterias (83, 84), difieren en 7 pruebas bioquímicas y se asemejan en la degradación de 3 sustratos, los cuales son: celulosa, nitrato y actividad proteolítica.

El grupo 2 está formado por 8 GF y 1 GIF, separados a una distancia Euclídeana de 1.7. Se asemejan en la degradación de 2 sustratos: urea y fósforo inorgánico.

Se observa en la Fig. N° 22, que la parcela III presenta un número mayor de grupos, en comparación con las parcelas anteriormente estudiadas, encontrándose distribuidos los GF de la siguiente manera: El grupo 1 está formado por 5 GF y 1 GIF, agrupados a una distancia Euclídeana de 1, y presentan la degradación de sustratos como: lignina, nitrato y urea.

El GIF se agrupa debido a la característica que tienen las cepas de degradar los siguientes sustratos: pectina, lignina, nitrato, kliger, fósforo inorgánico. Actividad proteolítica y urea.

La formación de 6 GF, 1 GIF y el grupo 1, que corresponde al grupo 2, se encuentran agrupados por la degradación de los siguientes sustratos: nitrato y pectina. Este grupo se forma a una distancia Euclídeana de 1.4.

El GIF se agrupo debido a que las cepas degradan los siguientes sustratos: pectina, celulosa, nitrato, almidón, kliger y actividad proteolítica.

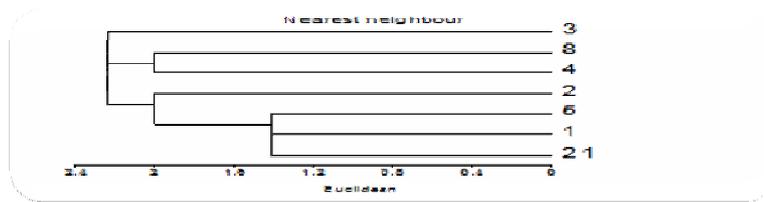
Y el grupo 4, separados a una distancia Euclídeana de 2, agrupa la cepa bacteriana de 119 con el grupo 2 y 3. Presentan la capacidad de degradar 1 sustratos en común, el cual fue: almidón.

Y en las parcelas de la transecta 3, se observa que a medida que nos alejamos de la fosa Bared-9, aumentan los GIF a lo largo de las parcelas. Pero existe el agrupamiento de 1 GIF en la parcela II, que no se formó en la Fig. N°21.

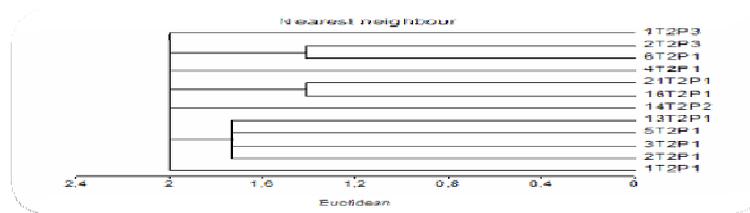
Este GIF, se encuentra separado a una distancia Euclídeana de 1.4, difiriendo en la degradación de sustratos por: quitina, celulosa, lignina, nitrato, actividad lipolítica y fósforo inorgánico.

7.6.2. Hongos

TRANSECTA 1.



TRANSECTA 2.



TRANSECTA 3.

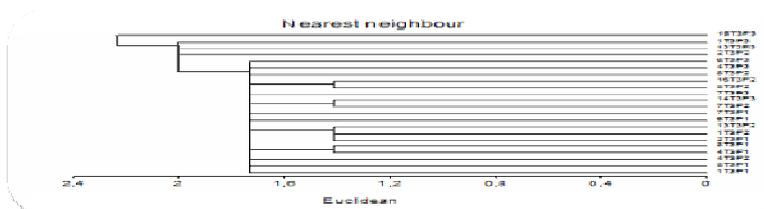


Fig. Nº 19. Análisis de clúster de la comunidad fúngica presente en las transectas.

En la transecta 1, se observa el agrupamiento de las 7 cepas fúngicas aisladas de la primera transecta ubicada en la fosa Bared-9, los cuales se distribuyen en 3 grupos, de acuerdo a la distancia Euclídeana.

El grupo 1 se encuentra constituido por 3 GF, separados a una distancia Euclídeana de 1.4. Los GF poseen en común la degradación de los siguientes sustratos: tween, celulosa, urea, inositol, pectina, glucosa y lactosa.

El grupo 2 está formado por 3 GF y el grupo 1, separado a una distancia euclídeana de 2, lo que implica que poseen en común la degradación de 2 sustratos: celulosa e inositol.

Y el grupo 3, se encuentra la cepa (3) que es la más disímil del grupo, que se une a una distancia Euclídeana de 2.2 con el grupo 2, debido a la degradación en común de fósforo inorgánico.

Se observa en el clúster de la transecta 2, el agrupamiento de un total de 12 cepas fúngicas, distribuidas en 3 grupos de la siguiente manera:

El grupo 1 está constituido por 4 GF, donde los primeros 2 GF (16, 21) son un hongo y una levadura y (6, 2) son levaduras. Separados a una distancia euclídeana de 1.4. Poseen en común la degradación de los siguientes sustratos: celulosa, nitrato, inositol y lactosa.

Grupo 2 formado por 4 GF, separados a una distancia euclídeana de 1.7, por lo que poseen en común la degradación de: tween, fosfato, pectina y glucosa.

Y el grupo 3 está constituido por 3 GF y por los grupos 1 y 2. Está separado a una distancia euclídeana de 2. Presentan en común 3 pruebas bioquímicas positivas que son: inositol, pectina y glucosa.

El análisis de clúster de la transecta 3 agrupa 23 cepas fúngicas, constituidas por hongos y levaduras, se encuentra agrupado de la siguiente forma:

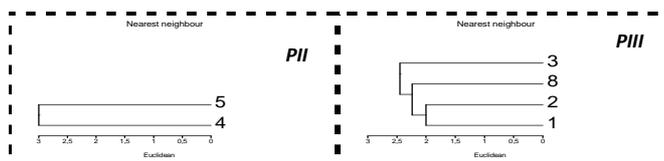
El grupo 1 se encuentra formado por 9 GF, constituido por levaduras, separados a una distancia euclídeana de 1.4, que presentan en común la degradación de los siguientes sustratos: almidón, nitrato, inositol, pectina, glucosa y lactosa.

El grupo 2 está formado por 8 GF y el grupo 1, que corresponde entre levaduras y hongos. Poseen en común la degradación de glucosa y lactosa.

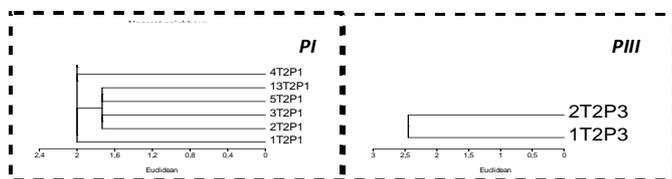
El grupo 3 agrupa 3 GF y el grupo 2, debido a la degradación de glucosa.

Y la cepa 15T3P3 que es la cepa más disímil en la degradación de los sustratos se une al grupo 3, de acuerdo a la degradación de los siguientes sustratos: azúcares simples: glucosa y lactosa.

PARCELAS DE LA TRANSECTA 1.



PARCELAS DE LA TRANSECTA 2.



PARCELAS DE LA TRANSECTA 3.

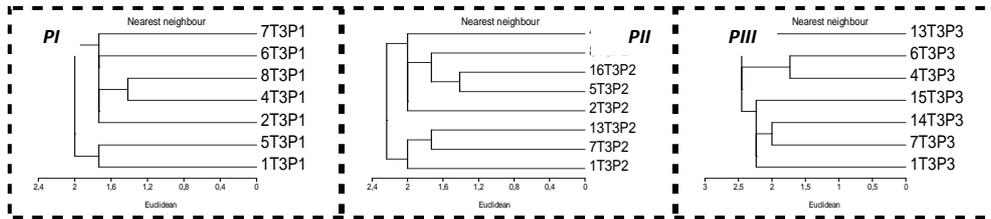


Fig. Nº 20. Análisis de Clúster de la comunidad fúngica presentes en las parcelas de las diferentes transectas.

En el caso de la parcela 1 de la transecta 1, no se observa la formación de ningún clúster, porque de dicha parcela solo se pudo aislar 1 sola cepa fúngica, por lo que no permitió realizarle ningún análisis estadístico. En el caso de la segunda parcela, se logró aislar 2 cepas fúngicas, que son levaduras de diversos colores, formando un grupo separado a una distancia Euclídeana de 3, por lo que poseen en común la degradación de sustratos, tales como: celulosa, nitrato, inositol y lactosa. Y en el caso de la tercera parcela, se aisló 4 cepas fúngicas, constituidos en 3 grupos, debido a la distancia Euclídeana: El grupo 1 está formado por 2 GF, separados a una distancia euclídeana de 2 y poseen en común la degradación de los siguientes sustratos: celulosa, lignina, gelatina, nitrato, inositol, pectina, glucosa y lactosa.

El grupo 2 está constituido por 1 GF y el grupo 1, separados a una distancia euclídeana de 2.4. Poseen en común la degradación de los siguientes sustratos: celulosa, lignina, gelatina, nitrato, inositol, pectina, glucosa y lactosa.

Y el grupo 3 constituido por 1 GF y el grupo 2, se encuentra separados por una distancia euclídeana de 2.5, por lo que poseen en común la degradación de: nitrato e inositol.

En el caso de las parcelas de la transecta 2, se observa que en la primera parcela está formada por 9 GF, distribuidos en 3 grupos. El cual el grupo 1 está formado por 2 GF (16, 21), que está constituido por un hongo y

una levadura, se encuentra separados a una distancia euclídeana de 1.4 y poseen en común la degradación de los siguientes sustratos: quitina, almidón, celulosa, fosfato, gelatina, nitrato, inositol glucosa y lactosa.

El grupo 2 constituido por 4 grupos funcionales (2, 3, 5 y 13), se encuentra constituido por 3 levaduras y 1 hongo, respectivamente, separados a una distancia euclídeana de 1.7. Presentan en común la degradación de: tween, fosfato, pectina y glucosa.

Y el grupo 3 está representado por 3 GF y el grupo 1 y 2, separados a una distancia euclídeana de 2, y poseen en común los sustratos: inositol, pectina y glucosa.

En la parcela 2 no se puede realizar el análisis de clúster, porque estuvo representada por 1 cepa fúngica (levadura). (Anexo 2.b.)

En la tercera parcela, se observa la formación de 2 GF, como se puede observar en la Fig. N° 25, separados a una distancia euclídeana de 2.5, lo que implica que al menos difieren en 3 pruebas bioquímicas y presentan en común 3 sustratos, los cuales son: lignina, inositol y lactosa.

Y en las parcelas de la transecta 3, la primera parcela agrupa 7 cepas agrupadas en 2 grupos: El grupo 1 está formado por 2 GF, separados a una distancia euclídeana de 1.4, acuerdo a la degradación de: almidón, nitrato, inositol, pectina, glucosa y lactosa. En cambio el grupo 2 está constituido por 5 GF, separados a una distancia euclídeana de 1.6, debido a que poseen en común la degradación de 3 pruebas bioquímicas: inositol, glucosa y lactosa.

La segunda parcela se encuentra formada por 8 grupos funcionales, agrupados por 3 grupos, formado el grupo 1 por 2 GF, separados a una distancia de 1.3 y agrupados por los siguientes sustratos: almidón, tween, pectina, glucosa y lactosa.

El grupo 2 se encuentra formado por 3 GF y el grupo 1, separados a una distancia euclídeana de 1.6, agrupados por los siguientes sustratos: almidón, celulosa, lignina, gelatina, nitrato, inositol y pectina.

El grupo 3 está formado por 2 GF y por el grupo 1 y 2, separados a una distancia de 2 y poseen en común la degradación de: almidón, celulosa, nitrato, inositol y pectina.

La tercera parcela agrupa 7 GF, en 3 grupos de la siguiente manera:

EL grupo 1 formado por 2 GF, se encuentra separados a una distancia euclídeana de 1.5, debido a la degradación de sustratos tales como: fosfato, glucosa y lactosa.

El grupo 2 está formado por 4 GF, separados a una distancia euclídeana de 2, lo que presentan en común 7 pruebas bioquímicas que son: almidón, celulosa, lignina, gelatina, nitrato, inositol y lactosa.

Y el grupo 3 está formado por 1 GF y el grupo 1 y 2, separados a una distancia euclídeana de 2.5, de acuerdo a la siguiente degradación de sustratos: fosfato y lactosa.

En general, se observó que disminuyó la diversidad funcional de las comunidades microbianas a medida que aumentó la distancia desde el borde de la Fosa Bared-9 a zonas donde disminuye la actividad petrolera, siendo diferentes no solo las características macro y Micromorfológica sino gremiales y funcionales de la comunidad, que están íntimamente relacionadas con los diferentes sustratos presentes en el suelo y su aporte para el crecimiento y desarrollo de la vegetación.

También tales diferencias, en cuanto a la diversidad funcional, se debió a que los suelos presentan características particulares, generándose un microambiente que favorecieron o no a las poblaciones existentes, y que

las poblaciones aisladas y cultivadas presentaron un metabolismo particular para cada grupo de poblaciones. Por ello, su diferencia en el patrón gremial, morfológico y funcional en dichos sitios.

7.6.3. COMUNIDAD MICROBIANA (BACTERIAS-HONGOS)

El análisis de clúster realizado para la comunidad microbiana, arrojó un total de 27 grupos de identidad funcional, de los cuales 22 son grupos que no se observaron en los análisis realizados con anterioridad. Cabe destacar, que no se puede colocar el clúster debido a lo extenso que resultó. Sin embargo, en la siguiente tabla indica las pruebas bioquímicas que agruparon las diferentes cepas que corresponden a bacterias y hongos de iguales o diferentes sitios.

También cabe acotar, que para lograr realizar un estudio homogéneo entre las bacterias y hongos se hicieron con las pruebas bioquímicas que presentaban en común ambos grupos, y es posiblemente el porqué no se observaron en los análisis de clúster realizados con anterioridad.

Tabla N° 5. Grupos constituidos por el clúster de las cepas microbianas (hongos y bacterias) con sus características bioquímicas.

Grupos	Quit	Alm	Tw	Cel	Lig	Gel	Urea	Nit	Inos	Pect
46, 21T1P1			X	X		X	X		X	X
9, 31		X	X	X	X	X	X	X	X	X
27, 171			X	X	X	X		X	X	X
21T2P1, 54, 78			X	X	X			X	X	X
11, 146	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
23, 59	X		X	X	X	X		X	X	X
108, 12					X				X	X
8T1P3, 7T3P3, 178		X	X	X	X	X		X	X	
50, 154			X	X	X	X		X	X	
25, 52	X	X	X	X	X	X	X	X		X
2T1P3, 2T1T2P1, 13T3P2	X	X		X	X	X		X	X	
2T2P3, 43	X			X	X			X	X	X
10, 173	X	X	X	X	X	X			X	X
58, 126		X	X	X		X		X		X
20, 127		X	X	X		X		X		

110,111		X		X		X		X		X
16T3P2,101		X	X							X
4T3P1,104		X				X		X	X	X
75,15								X		X
83,84,121,130				X				X		
97,112				X				X		X
124,1T2P3					X	X				
174,18	X									X
70,179				X	X					X
63,87	X	X					X		X	
86,98	X	X				X	X		X	X
74,79		X				X			X	X

Como se observa en la Tabla N°5, que los grupos es tán compuestos por 2,3 y 4 GF, formado por cepas bacterianas y fúngicas. En general, la mayoría de los grupos poseen la capacidad de degradar sustratos, tales como: celulosa, lignina, pectina, nitrato y actividad lipolítica. En el caso de presentar la actividad lipolítica por las cepas se debió a que los microorganismos utilizan los triglicéridos después de la hidrólisis del enlace éster que llevan a cabo las enzimas extracelulares llamadas lipasas, donde el resultado de la acción de una lipasa es la liberación de ácidos grasos y glicerol, y todas estas sustancias pueden ser atacadas tanto anaeróbica como aeróbicamente por diferentes microorganismos quimiorganotrofos (Madigan y col., 2004).

En el caso de pectina, celulosa y lignina son los compuestos más abundantes de los residuos vegetales (Mason, 1976) y por ello, los microorganismos presentan enzimas extracelulares que permiten degradar o despolimerizar dichas moléculas para absorberla (Álvarez, 2005).

Y en el caso del nitrato que es la fuente nitrogenada para estos microorganismos, debido a que este elemento es importante en las proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares, por lo que es aprovechada al máximo por las cepas microbianas.

De acuerdo a los resultados encontrados para las poblaciones de bacterias y hongos, se puede indicar que la población fúngica es más diversa funcionalmente, en comparación con las poblaciones de bacterias, en los distintos sitios realizados. Sin embargo, se formaron GIF en el clúster de la comunidad microbiana que estaban constituidos tanto por bacterias como por hongos, indicando que la funcionalidad de los sitios es mantenida por ambas poblaciones de microorganismos.

8. CONCLUSION

- ✓ Los cambios observados en la densidad, morfología, estructura y diversidad funcional de las poblaciones bacterianas y fúngicas a medida que nos alejamos desde el borde de la Fosa a zonas con menor influencia por la actividad petrolera, permite aceptar la hipótesis propuesta.
- ✓ Las bacterias Gram- fueron las que mostraron mayor proporción en la transecta 1, mientras que para las transectas 2 y 3, fueron las bacterias Gram+. En el caso de los hongos, las levaduras expresaron una mayor proporción en las tres transectas estudiadas. En las parcelas de la transecta 2 y 3 se observó la presencia de los géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y un posible *Oidium*.
- ✓ Las poblaciones bacterianas y fúngicas degradaron los sustratos a los que fueron expuestos, en su mayoría compuestos complejos como: celulosa, lignina, quitina y pectina, infiriendo que esta comunidad microbiana muestra un potencial bioquímico para ser enfrentada a moléculas hidrocarbonadas complejas.
- ✓ Se evidenció en los análisis de clúster que las poblaciones fúngicas, son funcionalmente más diversas que las poblaciones bacterianas. Sin embargo, la formación de GIF indica que la funcionalidad de la comunidad mantenida por ambas poblaciones de microorganismos.

9. BIBLIOGRAFIA

Acuña, A., Pucci, O., Pucci, G. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia, Argentina. *Ecosistemas*. **2**: 85-93.

Ahumada, M., Gómez, E. 2009. Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Trabajo de grado. Bogotá, D.C.

Alexander, M. 1980. Introducción a los microorganismos del suelo. 2da Edición. Editorial AGT, S.A. 491.

Alvarez, S. 2005. La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Ecosistemas*. **2**: 17-29.

Ananda, K. Sridhar, K. 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Can. J. Microbiol.*, **48**: 871–878.

Antia, A. 1995. Estudio ecológico de las comunidades microbianas heterotróficas de un suelo en condiciones naturales y sometidas a manejo agrícola. Tesis Doctoral no publicada. Universidad Central de Venezuela.

April, T., Foght, J., Currah, R. 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. Microbiol.* **46**:38-49.

Atlas, R.; Horowitz, A.; Krichevsky, M.; Bej, A. 1991. Response of microbial populations to environmental Disturbance. *Microbial Ecology* **22**: 249-256.

Atlas, R., Bartha, R. 2001. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 3ra Edición. Editorial Addison Wesley. España.

Atlas, R., Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 4ta edición. Editorial Addison Wesley. España.

Atlas, R., Bartha, R. 2005. *Ecología Microbiana. Microbiología Ambiental*. 5ta edición. Pearson educación, S.A. España.

Baedecker, M., Cozzarelli, I., Eganhouse, R., Siegel, D., Bennett, P. 1993. Crude oil in a shallow sand and gravel aquifer III. Biogeochemical Reactions and Mass Balance Modeling in anoxic Groundwater: *Applied Geochemistry*. **8**: 569-586.

Bending, G.; Turner, M.; Rayns, F.; Marx, M.; Wood, M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology & Biochemistry*. **36**: 1149-1159.

Bossert, D., Compeau, G. 1995. Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil, in L. Young and C. E. Cerniglia (eds), *Microbial Transformation and degradation of Toxic Organic Chemicals*. Wiley – Liss, New York, and John Wiley & Sons, Chichester, UK. 77-125.

Bracho, M.; Díaz, L.; Soto, L. 2005. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. Tesis de Grado. Universidad del Zulia, Venezuela.

Buyer, J.; Drinkwater, L. 1997. Comparison of substrate utilization assay and fatty acids analysis of soil microbial communities. *Journal of microbial methods*. **30**: 3-11.

Camacho, A.; Giles, M.; Ortegón, A.; Palao, M.; Serrano, B.; Velázquez, O. 2009. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Campbell, R. 1987. *Ecología microbiana*. 2da Edición. Editorial Limuna, S.A. 518.

Cerniglia, C., Shuttleworth, K. 2002. Methods for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons PAH.-degrading microorganisms and procedures for determination of biodegradation intermediates and environmental monitoring of PAHs. En: Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach, L.D. *Manual of Environmental Microbiology* 2nd. Edition. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., 972 – 986.

Clark, R., Brown, D. 1977. Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems. En D. C. Malins (Ed.), *Effects of Petroleum on arctic and subarctic environments and organisms*. Academic Press, Inc. London. 1-75.

Delin, G., Essaid, H., Cozzarelli, I., Lahvis, M., Bekins, B. 1998. Ground water contamination by crude oil near Bemidji, Minnesota. USGS Fact Sheet 84-98.

Dominguez, D., Malaver, N. 2008. Evaluación del potencial de una comunidad microbiana (hongos y bacterias) para biorremediar a escala de laboratorio un suelo contaminado artificialmente con crudo pesado. Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Dyksterhouse, S., Gray, J., Herwig, R., Lara, J., Staley, J. 1995. *Cycloclasticus pugetii* gen. Nov., sp. nov., anaromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 116-123.

Engelhardt, M., Daly, k., Swannell, R., Head, I. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *J. Appl. Microbiol.* 237-247.

Ercoli, E.; Gálvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, M.; Bauza, J. 2001. Analisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Laboratorio de Bioprocesos, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Eweis, B., Ergas, J., Chang, Y., Schroeder, D. 1999. Principios de biorrecuperación. Mac Graw Hill. España.

Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C. 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology.* **99**: 5296-5308. Pediatría.

Gauthier, M., Lafay, B., Christen, R., Fernández, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J. 1992. *Marinobacterhydrocarbonoclasticus* gen. Nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 568-576.

George-Okafor, U., Tasié, F., Muotoe-Okafor., F. 2009. Hydrocarbon Degradation Potentials of Indigenous Fungal Isolates from Petroleum Contaminated Soils. *Journal of physical and natural sciences.* **1**: 1-6.

Gilewicz, M., Nimatuzahroh, T., Nadalig, H., Budzinski, P., Doumenq, V., Michotey, J., Bertrand, J. 1997. Isolation and characterization of a marine

bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 528-533.

Gilbert, G. Sousa. W. 2002. Host specialization among wood-decay polypore fungi in a Caribbean mangrove forest. *Biotropica.* **34** (3): 396-404.

Golyshin, P., Chernikova, T., Abraham, W., Lunsdorf, H., Timmis, K. Yakimov, M. 2002. Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligatory utilizes hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 901-911.

Hambrick, G., Delaune, R., Patrick, W. 1980. Effect of estuarine sediment pH and oxidation reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Applied Environmental Microbiology.* **40**: 365-369.

Hansel, C., Fendorf, S., Jardine P., Francis, C. 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. Department of Geological and Environmental Sciences, Stanford University, Stanford, California.

Harrigan, W. McCance, M. 1968. Métodos de Laboratorio en Microbiología. Editorial Academia. León, España.

Hernández, C. 2008. Interrelación entre las comunidades microbianas y los procesos edáficos de un suelo agrícola, modificaciones inducidas por un abono orgánico. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Venezuela, Caracas.

Howe-Grant, M. 1996. Petroleum. Encyclopedia of chemical technology. 4ta edición. Wiley Inerscience Publication. New York. 342-480.

Kanally, R., Bartha, R., Watanabe, K., Harayama, S. 2000. Rapid mineralization of benzopyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4205-4211.

Leahy, J., Colwell, R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. **3**: 305-315.

León, Y., De Sisto, A., Inojosa, Y., Malaver, N., Naranjo-Briceño, L. 2009. Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la Faja Petrolífera del Orinoco. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*. **2**:11-24.

Mac Faddin J. 2003. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia clínica. 3era Edición. Editorial Panamericana. Argentina.

Macnaughton, S., Stephen, j., Venosa, J., Davis, D., Chang, G., White, D. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3566-3574.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2000. Biología de los Microorganismos. 8va edición. Prentice Hall. Madrid, España. 130-140, 151, 630-357.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2003. Biología de los Microorganismos. 10ma edición. Prentice Hall. Madrid, España. 130-140, 151, 630-357.

Madigan Martinko, J., Parker, J. 2004. Biología de los Microorganismos. 10ma edición. Prentice Hall. Madrid, España. 104-110, 596-600.

Madriz, M., Cataldi, A. 2002. Caracterización de fosas petroleras y sitios contaminados por crudo a través de métodos geofísicos y sensores geoquímicos *in situ*. *Sociedad Venezolana de Ingenieros Geofísicos*. Caracas, Venezuela.

Manual de procedimientos de laboratorio y de Productos BBL. 1974. Editores Asociados S.A. México.

Martínez-Alonso, M., Gaju, N. 2005. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistema*. **14**:79-91.

Mason, C.F. 1976. Decomposition. The Camelot Press Ltd, London, UK. 57 pp.

Maugeri, T., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E. 2002. Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 450-455.

Messarch, B., Nies, L. 1997. Modification of heterothropic plate counts for assessing the bioremediation potential of petroleum- contaminated soils. *Environ. Technol.* **18**: 639- 646.

Munnecke, D., Huysmans, K. 1998. Fungal composting processes for polyaromatic hydrocarbons. Annual AAPG Conventions. Salt Lake City, Utah, USA. **5**:17-20.

Okerentugba, P., Ezeronye, O. 2003. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. **2**:288-292.

Outdot, J., Dupont, J., Haloui, S., Roquebert, M. 1994. Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil biology and Biochemical*. **25**. 1167-1173.

Pardo, J., Perdomo, M., Benavidez, J. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuesto en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. **2**: 1-108.

Pérez, R., Camacho, M., Gómez, J., Abalo, A., Viñas, M., Cantero, D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. **39**. 44-51.

Piskonen, R., Kapanen, A., Mansikka, T., Rytönen, J. 2002. Evaluation of bioremediation treatments in a shoreline-simulating microcosm. *Bioremediation Journal*. **2**: 143-158.

Pozzo, M., Ferrari, M., Calderón, G. 2000. Diseño y ejecución de un plan de biotratamiento para residuos (cortes) de perforación de la actividad petrolera, por la metodología de biodegradación con bioaumentación. *Geociencias, consultoría y servicios ambientales*. Tartagal, Salta, Argentina.

Pucci, O., Pérez, F., Pucci, G. 2001. Biodegradación de hidrocarburos, influencia de la fertilización en el proceso de biorremediación. CEIMA.

Richards, R. 1987. The microbiology of terrestrial ecosystems. First Published. *Logman Scientific and Technical*. 399.

Rios-Hernández, L., Gieg, L., Suflita, J. 2003. Biodegradation of an alicyclic hydrocarbon by a sulfate-reducing enrichment from a gas

condensate-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 434-443.

Rivera-cruz, M., Ferrera, R., Volke, V., Fernandez, L., Rodriguez, R. 2002a. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra*. **20**: 423-434.

Rivera-cruz, M., Ferrera, R., Volke, V., Fernandez, L., Rodriguez, R. 2002b. Adaptacion y selección microbiana autóctona en medios de cultivo enriquecidos con benzo(a)pireno. *Agrociencia*. **5**: 503-514.

Rivera-cruz, M., Ferrera, R., Volke, V., Fernandez, L., Rodriguez, R. 2002c. Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia*. **2**: 149-160.

Roberts, D. 2002. Methods for assessing anaerobic biodegradation potential. En: Hurst C. J., Crawford R. L., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach, L. D. *Manual of Environmental Microbiology* 2nd. Edition. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., 1008 – 1017.

Rosenberg, E., Ron, E. 1998. Bioremediation of petroleum contamination. In: R.L. Crawford Y D.L. Crawford edition. *Bioremediation: Principles and applications*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Rosini, F. 1960. Hydrocarbons in petroleum. *Journal of Chem. Educ.* **39**: 554-561.

Samson R. 1995. Curso de detección e identificación de hongos en alimentos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. UCV. Caracas, Venezuela.

SHA Corporativo. 2001. Pasivos ambientales. INTEVEP-PDVSA.

Solórzano, J., Rizzo, C., Millioli, V., Soriano, U., Sarquis, M., Santos dos, R. 2002. Petroleum degradation by filamentous fungi. In: 9th Annual International Petroleum Conference. Novo. México, EUA.

Sosa-Rodríguez, T.; Sánchez-Nieves, J.; Melgarejo, L. 2009. Papel funcional de los hongos en ecosistemas de Manglar. Bol . Invest . Mar . Cost . 1: 39-57.

Speight, J. 1991. The chemistry and technology of petroleum. John Wiley and sons. New York.

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., Painter, P. 1992. Microbiología. Segunda Edición. Editorial Reverte, S.A. Barcelona, España.

Swannell, R., Lee, K., McDonagh, M. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*. **2**: 342 – 365.

Tabak, H., Govind, R., Fu, G. 1997. Application of bioavailability and biokinetics protocol to phenol and polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants in soil and development of bioavailability and biokinetics models for soil systems. En: Sheehan, D. (Ed). *Bioremediation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. 297 – 323.

Torres, R., Rodríguez, Ma., Esparza, F., Barrera, J., 1999. Aislamiento de Consorcios Microbianos Presentes en un Suelo Contaminado con Hidrocarburos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV. México.

Valenzuela, E., Solís, L., Martínez, O., Pinochet, D. 2006. Hongos aislados de suelos contaminados con petróleo. Boletín Micológico. **21**: 35-41.

Venosa, A., Zhu, Suidan, X., Lee, K. 2001. Guidelines for the bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands.

Environmental Protection Agency. Office of Research and development. National Risk Management Research Laboratory. Land Remediation and Pollutions Control Division. 26 W. Martin Luther King Drive Cincinnati, OH 45268.

Yakimov, M., Golyshin, P., Lang, S., Moore, E., Abraham, W., Lunsdorf, H., Timmis, K. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. Nov., sp. nov., a new hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 339-348.

Yakimov, M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T., Abraham, W., Lunsdorf, H., Timmis, K. Golyshin, P. 2003. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 779-785.

Zak, I.; Willing, M.; Moorhead, D.; Wildman, H. 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* **26** (9): 1101-1108.

Zhuang, W., Tay, J., Maszenan, A., Tay, S. 2003. Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments. *Water Sci. Technol.* **47**: 303-308.

ANEXOS

1. Densidades de las comunidades microbianas (hongos y bacterias)

Tabla N° 6. Densidades microbianas presente en cada muestra de suelo.

Título				Transecta					
	T1P1	T1P2	T1P3	T2P1	T2P2	T2P3	T3P1	T3P2	T3P3
log(UFC/g de suelo)									
Bacterias	1,61E+13	2,025E+10	1,54E+13	Incontable	1,955E+10	1,075E+10	1,59E+12	3,5E+10	1,44E+12
Hongos	2,80E+07	2,00E+12	9,90E+10	2,98E+11	1,55E+11	1,82E+07	7,10E+06	9,00E+11	5,60E+06

2. Caracterización Macromorfológica

2.a. Bacterias

Tabla N° 7. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T1PI.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR
1	Regular	Opaco	Plana	Crema
2	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
3	Irregular	Opaco	Plana	Blanca
4	Irregular	Transparente	Plana	Transparente
5	Regular	Azul	Plana	Amarilla
6	Regular	Opaco	Plana	Blanca
7	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
8	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
9	Irregular	Azul	Plana	Azul
10	Irregular	Opaco	Cóncava	Amarilla
11	Irregular	Transparente	Plana	Transparente
12	Irregular	Transparente	Plana	Transparente
13	Irregular	Azul	Plana	Azul
14	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
15	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
17	Irregular	Opaco	Cóncava	Blanca
18	Irregular	Azul	Cóncava	Amarilla
19	Regular	Azul	Plana	Crema
20	Irregular	Opaco	Cóncava	Blanca

Tabla N° 8. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T1PII y T1PIII.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR
21	Regular	Transparente	Cóncava	Crema
22	Irregular	Transparente	Plana	Crema
23	Irregular	Amarillo	Cóncava	Amarilla
24	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
25	Irregular	Transparente	Cóncava	Amarilla
26	Regular	Transparente	Cóncava	Crema
27	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
28	Irregular	Amarillo	Plana	A
29	Regular	Transparente	Plana	Transparente
30	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
31	Regular	Opaco	Cóncava	Crema
32	Regular	Crema	Plana	Crema
33	Irregular	Transparente	Plana	Crema
34	Regular	Opaco	Plana	Blanca
35	Regular	Blanca	Plana	Blanca
36	Regular	Azul	Plana	Blanca
37	Regular	Opaco	Cóncava	Blanca
38	Regular	Azul	Cóncava	Amarilla
39	Regular	Azul	Plana	Amarilla
40	Regular	Azul	Plana	Amarilla
42	Regular	Crema	Cóncava	Crema
43	Regular	Azul	Cóncava	Crema
44	Regular	Azul	Plana	Verde
45	Regular	Crema	Cóncava	Crema
46	Regular	Azul	Cóncava	Crema
47	Regular	Transparente	Plana	Amarilla
48	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
50	Regular	Azul	Plana	Amarilla
51	Regular	Crema	Cóncava	Crema
52	Irregular	Transparente	Cóncava	Amarilla
53	Irregular	Transparente	Cóncava	Amarilla
54	Regular	Azul	Cóncava	Crema
55	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
56	Regular	Azul	Plana	Verde
57	Regular	Azul	Plana	Amarilla
58	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
59	Irregular	Azul	Plana	Verde
60	Irregular	Azul	Plana	Verde

Tabla N° 9. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T2PI y T2PII.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR
61	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
62	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
63	Regular	Azul	Plana	Amarilla
64	Irregular	Transparente	Plana	Amarilla
65	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
66	Regular	Azul	Plana	Azul
67	Regular	Azul	Plana	Verde
68	Irregular	Transparente	Plana	Amarilla
69	Regular	Transparente	Plana	Amarilla
70	Irregular	Opaco	Plana	Amarilla
71	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
72	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
73	Irregular	Opaco	Cóncava	Amarilla
74	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
75	Irregular	Transparente	Cóncava	Crema
76	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
77	Regular	Crema	Cóncava	Crema
78	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
79	Irregular	Transparente	Cóncava	Crema
80	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
81	Regular	Azul	Plana	Verde
83	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
84	Irregular	Opaco	Cóncava	Blanca
86	Irregular	Azul	Plana	Verde
87	Irregular	Azul	Plana	Verde
93	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
94	Irregular	Azul	Cóncava	Crema
95	Regular	Azul	Plana	Verde
96	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
97	Regular	Azul	Plana	Verde
98	Irregular	Azul	Plana	Verde
99	Irregular	Azul	Cóncava	Crema
100	Irregular	Azul	Cóncava	Crema

Tabla N° 10. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presentes en T2PIII y T3PI.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR
101	Irregular	Azul	Plana	Crema
102	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
103	Regular	Azul	Plana	Verde
104	Regular	Azul	Cóncava	Crema
105	Irregular	Azul	Cóncava	Crema
107	Regular	Azul	Cóncava	Amarilla
108	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
110	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
111	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
112	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
113	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
114	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
115	Irregular	Crema	Cóncava	Crema
116	Regular	Blanca	Plana	Blanca
117	Irregular	Amarillo	Cóncava	Amarilla
118	Regular	Azul	Plana	Amarilla
119	Irregular	Azul	Plana	Crema
120	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
121	Irregular	Azul	Plana	Crema
122	Irregular	Azul	Plana	Verde
123	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
124	Regular	Transparente	Plana	Transparente
125	Regular	Azul	Plana	AZM
126	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
127	Irregular	Opaco	Cóncava	Blanca
128	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
129	Irregular	Blanca	Cóncava	Blanca
130	Irregular	Transparente	Cóncava	Amarilla
131	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
132	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
133	Irregular	Opaco	Cóncava	Blanca
134	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
135	Regular	Azul	Plana	Amarilla
136	Regular	Azul	Plana	Amarilla
137	Regular	Azul	Cóncava	Crema
138	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
139	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
140	Irregular	Azul	Plana	Amarilla

Tabla N°11. Caracterización Macromorfológica de las cepas bacterianas presente en T3PII y T3PIII.

Cepa	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR
141	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
142	Irregular	Opaco	Cóncava	Blanca
143	Irregular	Azul	Cóncava	Crema
144	Irregular	Azul	Plana	Verde
145	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
146	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
147	Irregular	Opaco	Cóncava	Blanca
148	Regular	Azul	Plana	Amarilla
149	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
150	Regular	Azul	Plana	Amarilla
151	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
152	Regular	Azul	Plana	Verde
153	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
154	Irregular	Opaco	Cóncava	Crema
155	Regular	Transparente	Plana	Transparente
156	Regular	Opaco	Cóncava	Crema
157	Regular	Azul	Plana	Amarilla
158	Regular	Azul	Plana	Crema
159	Regular	Azul	Plana	Crema
160	Regular	Transparente	Plana	Amarilla
164	Irregular	Azul	Cóncava	Crema
165	Regular	Azul	Plana	Crema
166	Irregular	Crema	Ramificada	Crema
167	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
168	Irregular	Azul	Plana	Amarilla
169	Irregular	Crema	Ramificada	Crema
170	Irregular	Crema	Ramificada	Crema
171	Regular	Azul	Plana	Verde
172	Regular	Azul	Plana	Crema
173	Irregular	Azul	Cóncava	Crema
174	Regular	Transparente	Cóncava	Crema
175	Regular	Azul	Plana	Amarilla
176	Regular	Opaco	Cóncava	Crema
177	Regular	Azul	Plana	Amarilla
178	Regular	Azul	Plana	Amarilla
179	Regular	Azul	Plana	Amarilla
180	Regular	Azul	Plana	Crema

2.b. Hongos

Tabla N° 12. Caracterización Macromorfológica de las cepas fúngicas presentes en la transecta 1 y 2.

Cepa	Características
21	Levadura blanca
4	Levadura beige
5	Levadura beige
1	Levadura blanca
2	Levadura blanca
3	Levadura amarilla
8	Levadura blanca
1	Levadura blanca
2	Levadura blanca
3	Levadura blanca
4	Levadura beige
5	Levadura blanca
6	Levadura blanca
13	Hongo verde oscuro con envés blanco
16	Hongo verde
21	Levadura amarilla
14	Levadura blanca
1	Levadura beige
2	Levadura blanca

Tabla N° 13. Caracterización Macromorfológica de las cepas fúngicas presentes en la transecta 3.

Cepas	Característica
2	Levadura Blanca
3	Levadura Blanca
4	Hongo Blanco
5	Levadura Blanca
6	Levadura Beich
7	Levadura Blanca
8	Levadura Beich
1	Levadura Blanca
2	Levadura Blanca
4	Levadura Beich
5	Levadura Blanca
7	Levadura Blanca
8	Levadura Blanca
13	Levadura Blanca
16	Levadura Beich
1	Levadura Blanca
4	Hongo Blanco
6	Levadura Beich
7	Levadura Beich
13	Levadura Beich
14	Levadura Blanca
15	Levadura Amarilla
16	Hongo verde oscuro

3. Imágenes del diseño experimental

3.a. Labores de Campo



Borde de la Fosa Bared-9.



Presencia de plantas en el borde de la Fosa Bared-9.



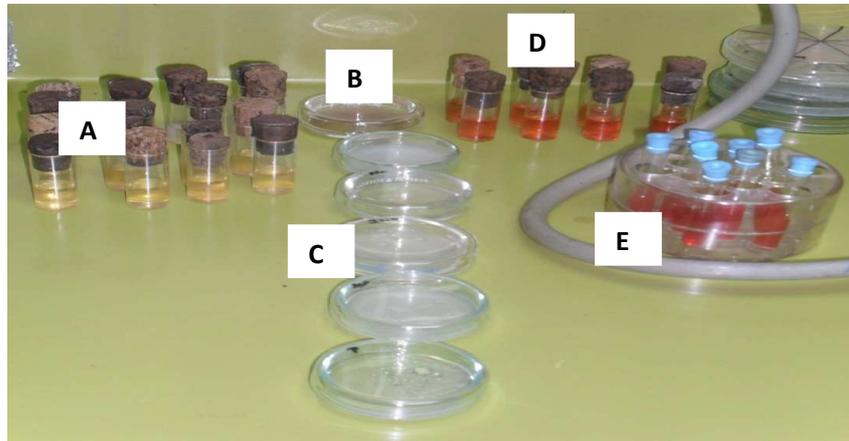
Presencia de plantas y desechos en zonas alejadas de la Fosa Bared-9.



Plantas de alto porte en zonas alejadas de la Fosa Bared-9.

3.b. Trabajo de laboratorio

3.b.1. Bacterias



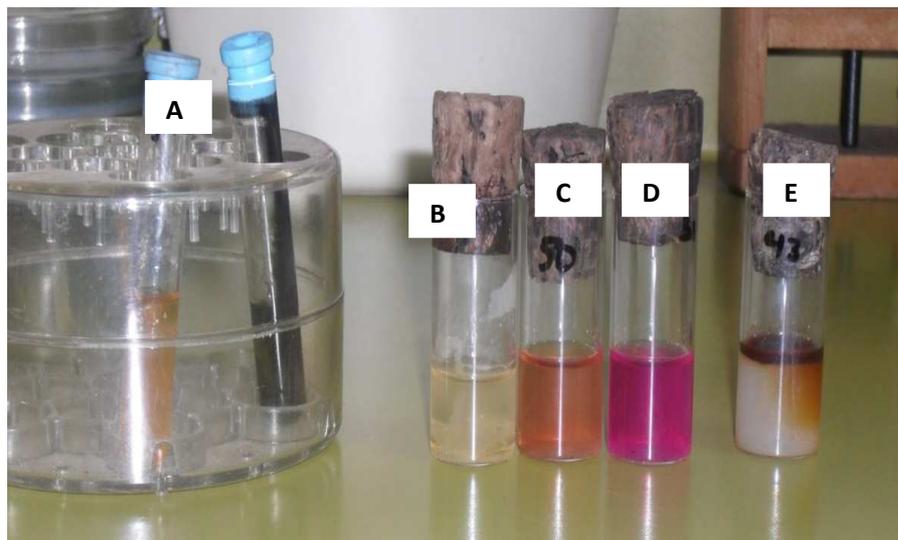
Pruebas bioquímicas: (A) Gelatina, (B) lignina, (C) celulosa, (D) Urea, (E) Kligler.



Cepario de cepas bacterianas.



Pruebas bioquímicas de nitrato.



Pruebas bioquímicas: (A) Kligler, (B) Gelatina, (C) Urea y (E) Nitrato.

3.b.2.Hongos



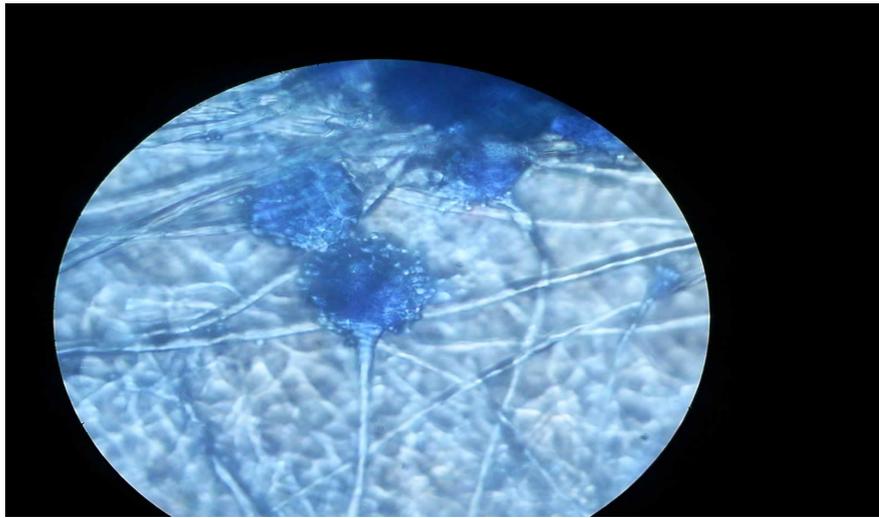
Crecimiento del hongo que posiblemente es del género *Oidium*.



Crecimiento de las diferentes levaduras aisladas.



Degradación de glucosa por parte de las cepas fúngicas.



Microcultivo de una cepa fúngica: Género *Aspergillus*.