



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS  
EN SUELOS IMPACTADOS CON PETRÓLEO, PROVENIENTES  
DE YARACAL, ESTADO FALCÓN VENEZUELA**

**Elaborado por: Jhonnán Oropeza**

Valencia, Octubre de 2010



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS  
EN SUELOS IMPACTADOS CON PETRÓLEO, PROVENIENTES  
DE YARACAL, ESTADO FALCÓN VENEZUELA**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO ANTE LA ILUSTRE  
UNIVERSIDAD DE CARABOBO, PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN QUÍMICA**

**Tutor:** Prof. Arnaldo Armado

**Elaborado por:** Jhonnán Oropeza

CI: 17.878.574

Valencia, Octubre de 2010

## **Dedicatoria**

*Se lo dedico especialmente a mis  
Padres, mis Hermanos y Sobrinas*

## Agradecimientos

*A Dios que en su infinita bondad me permitió nacer, me dio inteligencia, me dio fuerza y me dio lo que necesite para llegar hasta aquí ¡Gracias Dios mío siempre te llevo en mi corazón!*

*A mis Padres que cada día despertaron para conseguir lo que se pudiera para darme lo que necesitaba y más.*

*Gracias **Cecilio** tu valor me llena de nostalgia nunca podre conocer un padre tan maravilloso como tú, Dios no me pudo dar uno mejor siempre pendiente de mi, de mi bienestar, de lo que tenía que hacer nunca me presionaste, me diste espacio sin alejarte de mí, eres la razón por la que estoy aquí, este triunfo también es tuyo padre.*

*Gracias **María**. Gracias por ser una madre dedicada, cuidadosa, protectora 100 %, me transmitiste tu sensibilidad hiciste de mi una gran persona nunca podre alejar de mi pensamiento cuanto amor, cuanto cuidado, sin haberme parido (y no te hizo falta) hiciste lo necesario para enseñarme como vivir, te desvelaste por mi eres una gran madre para mi, mi vieja me diste mucho y ahora te doy gracias, las páginas de mi vida están escritas con las palabras de tu vida y con el soplo de mi alma viviré para agradecerte por todo lo que has hecho por mi ¡Gracias madre, bendición!*

*Gracias **Yeli**, no hemos vivido siempre juntos pero desde que nací de tu vientre te llevo en mi corazón como una joya preciada has sido mi fuente de fortaleza, eres inspiración para mí. Has sabido salir adelante aun a pesar de las vicisitudes, no has desmayado ante los tropiezos, madre de ti tengo más que solo un parecido físico tengo tu amor, llevo en mi alma tu aliento, somos el uno para el otro y contigo puedo ir y venir sin descansar ¡Gracias mami bendición!*

*Sólo Dios conoce porque ha de bendecirme tan grandemente porque me ha dado una madre de repuesto, gracias a ti **mamita** estoy aquí fuiste mi educadora por excelencia, fuiste mi fuente de carácter y de rectitud, me enseñaste a valorar mi potencial, te quedaste a mi lado a decirme como debía andar, me enseñaste a caminar magdalena,*

*me defendiste de todo y me consentiste, mientras no estuvieron mis sobrinas fui y soy tu hijo, nunca te detuviste a pensar en que te hacía falta para darme lo que yo necesitaba, admiro tu organización y dedicación ¡Gracias herma eres la mejor!*

*Gracias **padrino** por darme fortaleza, has participado de una u otra en mi vida eres como un padre para mi, durante toda mi carrera me has ayudado y tu familia es también mi familia, me has abierto las puertas de tu casa y me has brindado confianza y enseñanza, admiro tu dedicación a lograr lo que has querido para ti y para tu familia.*

*A mi **hermanita** gracias por hacerme reír, por compartir conmigo tus alegrías y penas, por siempre decirme si se puede, por cada mensaje de esperanza y por cada te extraño desde que estudio, por ser mi compañera fiel, gracias Yeli y por darme una hermosa sobrina a la que adoro. ¡Siempre juntos hermanita!*

*Gracias Alberto, logras a tu manera enseñarme algo y ahora nuestra familia se llena de honor frente a este, mi triunfo, el cual también debo a ti por darme la vida y estar ahí pendiente de mi. ¡Gracias papá!*

*A Dios no le faltó con tres sino que me dio una madre mas, tía **Rosa** eres una persona que siempre estuvo a mi lado, en cada paso que di recuerdo que estuviste ahí conmigo, me enseñaste de Padre, hijo y Espíritu Santo, y de ahí en adelante fuiste mi guía personal, siempre pendiente, atenta y de cada error siempre supiste decirme lo que estaba mal y lo que estaba bien, sin criticarme, no hay mayor nobleza que la tuya para mi eres mi madre predilecta ¡Gracias bendición mi tía!*

*Siempre habrá a quien le debo parte di desarrollo juvenil, parte de mi maduración y esa eres tu **Jeanne**, supiste llorar conmigo y te has alegrado de cada uno de mis triunfos y en mis fracasos me has dado fortaleza, me aceptaste tal y como soy, me hiciste tu hermano pequeño aunque fuese más alto que tu jajaja, me diste parte de ti y de tu gran ser, eres una gran amiga y hoy tú te gradúas conmigo mi amor ¡Gracias Jean, soy feliz por tenerte!*

*A mi **comadre** que siempre ha tenido ese aliento de profesionalismo conmigo, tú has sabido ver en mi todo lo bueno y el potencial para llegar hasta donde estoy. Muchas*

*gracias por cuidarme, y por subir conmigo escalón por escalón este difícil muro de las metas. ¡Te adoro comadre yenny!*

***Mary**, mi prima más querida como no agradecerte después de tantas noches de conversación, me iniciaste a una vida nueva y me diste aliento cuando lo necesite. Te has alegrado conmigo de cada triunfo y yo de los tuyos hemos sido como hermanos desde que yo tengo razón, me has aconsejado y me has dado de comer de tu sabiduría, hemos vivido muchas cosas juntos, aprendimos juntos todo lo nuevo que nos iba llegando y me has impulsado a siempre alcanzar lo que quiero. ¡Gracias mi prima bella siempre te llevo en mi corazón!*

*A **Janny** por siempre estar pendiente de mí y mostrarme un ejemplo de constancia y dedicación. ¡Gracias prima, celebraremos juntos!*

*Agradezco a todas mis tías por siempre estar pendiente, mi tía Luca, mi tía Yesenia “la chocha”, mi tía Yosbeli, mi tía Manuela, mi tía Aura, mi tía Ana. A mis tíos Julio, Pedro, Oscar, Sixto, gracias por su apoyo incondicional.*

*A mis primos Jimmy, Yasnelis, Kisyra, Oswal, a mi madrina nilda, gracias por todo su apoyo.*

*A mis madrinas Elsa “La comadre”, Olaida “la pororó”, Mercedes, la Sra Ada, gracias por su gran apoyo y educación.*

*A la **familia Ascanio** por estar desde mi nacimiento y mi desarrollo son mi segunda familia. Especialmente a mi madrina **Norkys** que has sabido brindarme tu apoyo incondicional y tu cariño, y has transmitido ese cariño a tus hijas. Te quiero mucho, madrina, gracias por tanto.*

*A mis amigos que nunca desvanecieron a la hora de apoyarme y darme una palabra de aliento, a los que siempre llevo conmigo y nunca podre olvidar **Georgina** fuiste mi amiga predilecta, me presionaste a tu manera y ahora nos graduamos juntos gina te quiero mucho amiga gracias por tu apoyo durante la carrera y en mi tesis y por saber escucharme “igual que el mosquito más tonto de la manada”; **Keyla** mi herma putativa gracias por tu apoyo académico y sentimental fuiste y eres parte importante de mi vida; **Liguelly** mi catira bella siempre me has dado animo y cuando decaí con tu*

alegría supiste levantarme te doró mi catira hermosa; **Walter** gracias por escucharme, recibirme junto con tu hermana en tu casa, te has convertido en un hermano para mí, Diana “la china del Japón” gracias por estar pendiente de mi chinita y por siempre ofrecerme soluciones te adoro, **Zule** mi kuzco bella tienes un gran espacio dentro de mi corazón has sido mi apoyo desde primer año y lo sigues siendo, siempre con tu mano en mi corazón; **Anyo** hemos compartido saliendo pero también aprendimos a conocernos y compenetramos ahora somos los mejores amigos jum!, **Soyi** mi gordis bella me has aceptado tal y como soy y me has apoyado en mis decisiones gracias por estar ahí a mi lado en las clases y en las rumbas te quiero mucho gordita, **Sikleb** gracias por recibirme en tu vida, “de la vida” a tu manera me enseñaste mucho y siempre pendiente de mí te aprecio mucho, **Leito** por recibirme en tu casa y brindarme tu apoyo y amistad; **Rodolfo** gracias por motivarme durante mi tesis y por los cuentos únicos y por tus críticas constructivas, **Yissett** siempre pendiente de mí y de mis problemas en momentos fuiste un gran apoyo de cariño y amistad, **Angélica** gracias por aceptarme como soy y por enseñarme a darle más valor a mis logros; **Alejandra** gracias por darme tu cariño y siempre estar dispuesta a todo, te quiero muchísimo mi negra. **Victor** gracias por recibirme en tu casa y en tu vida y por en tan poco tiempo mostrar esa gran amistad; **Viviana** por enseñarme las cosas esenciales y fuertes de la vida y por tu sabiduría, **Geiby** mi princesa gracias por confiar en mí y por regalarme tu amistad y consejos nunca los olvidaré, **Andrea** gracias por tu carisma y humildad por todo tu cariño incondicional. A todos gracias por estar ahí, y por todo ese amor. Gracias a todos aquellos que de una u otra forma también pusieron su apoyo para ayudarme Anggie, Lenys, Eliandreina, Indira, Luis Miguel, Doménico, Gabriel M., Elena, Angelesmary.

A mis madres, siempre me recibieron en sus casas y me alimentaron durante las jornadas de estudio mamá Celenia, mamá Lilian, mamá Maritza, mamá Nídea, mamá Antonieta, mamá Belkys, mamá Irene; muchísimas gracias las llevo muy dentro de mi corazón.

A Tamara por haberme recibido en tu casa, brindarme apoyado y bienestar en todo.  
¡Muchas Gracias!

*A los profesores de química José Parra, Jeff Wiskeľman, Carolina Corao, Xiomara Cardozo, Luis Amaiz, Gilberto Pinto, Ismel la Rosa, David Vega, Sheyla Ortiz. Muy agradecido con el profesor Arnaldo Armado por ser mi tutor, por recibirme en su grupo de trabajo y enseñarme muchas cosas que no sabía y por ser también un gran amigo. A la profesora Elizabeth Perozo por creer en mí, por darme toda tu confianza. Y por supuesto a mi primera jefa Mariandry, me enseñaste a disfrutar mejor mi vida universitaria desde tu perspectiva y con academia te adoro “mona”.*

*Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) por su colaboración para la realización de este proyecto.*

*A CIMA-UC por prestarme sus instalaciones para realizar los experimentos de mi tesis. Gracias Dr. Luis Medina, Rosmery, Carlitos y Luis.*

*A la Universidad de Carabobo por brindarme la oportunidad de graduarme.*

*A la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, por permitirme utilizar sus instalaciones para desarrollarme como químico.*

*Al profesor Doménico Pavone por su colaboración en la tesis.*

*A los paladines de los laboratorios, que con magia han sabido enseñarme con paciencia y dedicación, lo que debí aprender Lesbia Martínez, Beatriz Moy, Víctor Perez y Diolcidy González.*

*Por último a las personas que son la base de mi carrera: Leonardo por ser mi hermano siempre incondicional, inmóvil ante los problemas, con carácter forjaste parte de tu personalidad en mí, no dejaste que decayera y si caí estuviste ahí para ayudarme a levantarme, fuiste un hermano de alma diste parte de tu tiempo para escucharme y entenderme. Hiciste de tu familia mi familia y nunca titubeaste para enseñarme lo que necesitaba aprender, fuiste consiente e incomprensible pero eternamente amigo. Gracias, no es suficiente para agradecerte por tu apoyo conmigo siempre podrás contar conmigo colega. Joan Yuribeth eres y serás por siempre mi ángel, Dios en su infinita bondad me regaló un ángel de la guarda para la universidad y ese fuiste tú. Eres una de las mujeres que más amo en este planeta, sé que si hubiese sido posible hubieses metido la mano al fuego por mí. Siempre*

*cariñosa, carismática, tolerante, temperamental, reflexiva, siempre con tu mano en mi hombro para llorar y escribir nuestros sentimientos en el viento. Tu apoyo es fundamental para mí, tal vez sin ti no hubiese pasado los maravillosos momentos que pase a tu lado, no estuviese donde estoy. Mi ángel siempre te amare y si algún día necesitas de mi corazón tómallo es tuyo. Por último mi peque, Marcell Sánchez no por que seas la menos importante sino porque estas palabras se han de terminar con el sabor de tu esencia para que sepas que nada de lo que está arriba se pudo hacer sin ti. Como olvidar aquel día que nos encontramos en Faces el primer día de clase, cuando nos enteramos que el resto de nuestras vidas seguiríamos juntos. Has sido tú la que a punta de golpes de amor me enseñaste a no meter la pata, ha ser fiel a lo que creía, a descubrir mi ser interior, a salir de mi burbuja de jabón y enfrentar la realidad, ha estudiar con dedicación, divirtiéndonos solos tu y yo. Nuestro mundo paralelo nos ayudo a comprender el uno del otro, que era lo que nos hacía falta y lo buscamos y lo encontramos. Que mas alcahueta podre conseguir, pero con qué certeza siempre me dijiste lo que estaba mal sin bacilar para que yo comprendiera y reflexionara, cuantas veces no nos contradijimos y nos reímos de lo diferentes que éramos y a la vez de lo igual que somos, no hay espacio suficiente en ninguna tesis para describir cómo se vive al lado de lo que uno más quiere. Vivimos, comimos, nos bañamos, nos echamos, nos reímos, cuanto nos reímos, sufrimos, estudiamos, petición de titulo, beca todo lo hicimos juntos. Ahora nos toca seguir nuestro camino cada uno pero nuestro cordón seguirá fuerte hasta el fin. Gracias por darme lo que siempre necesite, sin pedir nada a cambio, no existe otra peque para mí. Tu familia es mi familia, tus triunfos son los míos vive para saber que te amo y que este título también es tuyo. Por siempre y para siempre tu y yo, Licenciada Sánchez.*



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y  
TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS EN SUELOS  
IMPACTADOS CON PETRÓLEO PROVENIENTES DE YARACAL, ESTADO  
FALCÓN, VENEZUELA**

**Br. Jhonnán Oropeza**

**RESUMEN**

Las actividades mineras que involucran al petróleo pueden ser determinantes en la vida microbiológica de los ambientes donde se desarrollen. El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad de microorganismos existentes en suelos con presencia y ausencia del petróleo como contaminante, provenientes del Mene de San Lorenzo, Yaracal, Estado Falcón, Venezuela. Se tomaron 4 muestras de pozos donde se observó la emanación de petróleo y a una distancia de 30 m se tomaron muestras control. El conteo de unidades formadoras de colonias (ufc) se realizó en placas utilizando agar LB como medio de crecimiento, complementado con Ciprofloxacina® para el crecimiento de hongos y con Fluconazol® para el crecimiento de bacterias. Para los microorganismos fijadores de nitrógeno se utilizó medio Burk's con agar-agar como gelificante. Se encontró que el petróleo afectó de manera diversa a las comunidades de microorganismos en los suelos estudiados, observando en las muestras impactadas con petróleo una disminución de dichas comunidades comparadas con las no contaminadas. Se encontraron 28 colonias bacterianas representativas con un 60% de Bacilos gran-positivos 40% Cocos gram-positivos y 0% Bacilos Gram negativos para las muestras impactadas. Para los hongos se aislaron 17 colonias y se identificaron dos géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En el caso de los microorganismos fijadores de nitrógeno se encontraron 10 colonias con un 44,44 % de bacilos gram-positivos, 33,33 % de cocos gran-positivos y 22,22 % de cocos gram-negativos en las muestras control, mientras que en las muestras impactadas solo una colonia identificada como cocos gram-negativos. Los organismos fijadores de nitrógeno se correlacionaron con las bacterias y se determinó que tenían capacidades microaeróbicas. Se demostró que bajo una determinada concentración de petróleo, algunas familias microbianas pueden adaptarse a este agente perturbador y que muchas otras no. Las bacterias gran-negativas y los hongos fueron más sensibles a la presencia del contaminante que las bacterias gran-positivas. Es necesario hacer estudios empleando técnicas de biología molecular, para establecer un posible biotratamiento con microorganismos autóctonos.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y  
TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



## MICROBIAL DIVERSITY OF BACTERIA AND FUNGI IN SOILS IMPACTED WITH OIL FROM YARACAL, FALCON STATE, VENEZUELA

Br. Jhonnán Oropeza

### ABSTRACT

Mining activity involving oil can be determinants in microbial life environments where they are developed. The main objective of this work was to study the diversity of microorganisms in soils with presence and absence of oil as a pollutant, from Mene de San Lorenzo, Yaracal, Falcon State, Venezuela. Samples of four wells where noted the emanation of oil were taken and control samples were taken at a distance of 30 m. Colony forming units (CFU) count was using LB Agar as growth medium in plates, supplemented with ciprofloxacin ® for the growth of fungi and fluconazole ® for the growth of bacteria. For nitrogen fixing microorganisms was used N-free Burk's medium with Agar-Agar as a gelling agent. Found that the petroleum affected differently communities of microorganisms in soils under study, noting a decrease in those communities compared with the not impacted samples. For Bacteria 27 colonies were isolated with 60% Gram-positive Bacilli and 40% Gram-positive cocci for contaminated soils. For fungi 17 colonies were isolated and identified two genera: *Aspergillus* and *Penicillium*. For nitrogen fixing microorganisms were found 10 colonies; 44,44% gram-positive bacilli, 33,33% gram-positive cocci and 22,22% gram-negative cocci in oil-free samples while samples impacted just a colony, identified as gram-negative cocci. Nitrogen fixing microorganisms are correlated with bacteria and found that they had micro-aerobics capabilities. In general, the microbial diversity decreases with oil present. It was shown that under a certain concentration of oil, some microbial families adapt to this disturbing agent and that many others are not. Fungi and Gram negative bacteria were more sensitive to the presence of pollutant to Gram-positive bacteria. Need to do studies using molecular biology techniques to establish procedures in a possible bio-treatment with autogenous microorganisms.



## ÍNDICE GENERAL

	Pagina
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. Formulación Del Problema	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Objetivos de la investigación	3
1.3. Justificación	4
CAPITULO II. Marco Teórico	6
2.1 Antecedentes	6
2.2. Bases Teóricas	12
2.2.1. El suelo	12
2.2.2. Suelo Contaminado	13
2.2.3. Suelo como hábitat para los microorganismos	14
2.2.4. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno	17
2.2.5. Suelos Contaminados y Microorganismos	19
2.2.6. Aislamiento de Cultivos Puros	19
2.2.6.1. Siembra en placas por extensión y en estrías	29
2.2.6.2. Siembra en Profundidad	20
CAPITULO III. Marco Metodológico	21
3.1. Muestreo y preparación de las muestras	21
3.2. Caracterización fisicoquímica de suelo	22
3.3. Determinación de la concentración de petróleo en las muestras estudiadas	23
3.4. Conteo de la Carga Microbiana (Hongos y Bacterias)	24
3.5. Cuantificación de la Carga de Microorganismos Fijadoras	25



de Nitrógeno	
3.6. Aislamiento de microorganismos representativos de cada una de las muestras (Bacterias, Hongos y Microorganismos Fijadores de Nitrógeno)	26
3.7. Caracterización Macro y Micromorfológica de las colonias.	27
3.8. Determinación de los tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno de acuerdo a su capacidad para utilizar el oxígeno.	27
3.9. Determinación del Índice de Shannon.	28
3.10. Correlación entre la carga bacteriana, fúngica, microorganismos fijadores de nitrógeno, las propiedades fisicoquímicas y la concentración de petróleo.	28
CAPITULO IV. Resultados	29
4.1. Caracterización fisicoquímica del suelo.	29
4.2. Concentración de Hidrocarburos totales del Petróleo en las muestras estudiadas.	30
4.3. Carga bacteriana, fúngica y microorganismos fijadores de nitrógeno, Índice de Shannon y Correlación de Pearson.	30
4.4. Diversidad de las colonias bacterianas, fúngicas y fijadores de nitrógeno	33
4.5. Tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno de acuerdo a su capacidad para utilizar el oxígeno.	36
CAPITULO V. Discusión de Resultados	38
CAPITULO VI. Conclusiones y recomendaciones	45



6.1. Conclusiones	45
6.2. Recomendaciones	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APENDICE	52
Apéndice A. Macro y Micromorfología	52
Apéndice A.1 Morfología de las colonias utilizada para realizar la macromorfología	52
Apéndice A.2 Descripción del método realizado para hacer la tinción de Gram	53
Apéndice A.3 Soluciones preparadas para la tinción de Gram.	55
Apéndice B. Fotos tomadas de algunas de las colonias aisladas	56
Apéndice B.1 Fotos de 6 de las bacterias aisladas	56
Apéndice B.2 Fotos de 5 de los hongos aislados	57
Apéndice C. Conidióforos	58
Apéndice D. Índice de Shannon	59
Apéndice E. Coeficiente de Correlación de Pearson	60
Apéndice F. Morfología de las colonias bacterianas	61
Apéndice G. Macromorfología de las colonias fúngicas	66
Apéndice H. Macromorfología y Micromorfología de las colonias de microorganismos fijadores de nitrógeno	69



## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla N° 01.</b> Metodología sugerida para la caracterización fisicoquímica de las muestras.	22
<b>Tabla N° 02.</b> Cantidad en gramo por litro de las sales que conforman el medio Burk's.	26
<b>Tabla N° 03.</b> Parámetros fisicoquímicos del suelo en estudio	29
<b>Tabla N° 04.</b> Porcentaje de HTP en las muestras impactadas	30
<b>Tabla N° 05.</b> Promedio de los logaritmo de las UFC/ g suelo de cada tipo de microorganismo estudiado.	31
<b>Tabla N° 06.</b> Coeficiente Lineal de Pearson para las variables seleccionadas.	32
<b>Tabla N° 07.</b> Número de colonias aisladas por muestra	33
<b>Tabla N° 08.</b> Morfología microscópica de las colonias de bacterias aisladas	34
<b>Tabla N° 09.</b> Clasificación de los microorganismos fijadores de N de acuerdo a el uso del oxígeno	36
<b>Tabla N° 10.</b> Micromorfología de los microorganismos Fijadores de Nitrógeno	37
<b>Tabla N° F.1</b> Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MII	60
<b>Tabla N° F.2</b> Macromorfología y Micromorfología de las colonias Bacterianas de la MIII	60



<b>Tabla N° F.3</b> Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MIV	60
<b>Tabla N° F.4</b> Macromorfología y Micromorfología de la colonia bacteriana de la MV	61
<b>Tabla N° F.5</b> Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MVI	61
<b>Tabla N° F.6</b> Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MVII	61
<b>Tabla N° F.6</b> Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MVII. Continuación	64
<b>Tabla N° F.7</b> Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MVIII	62
<b>Tabla N° G.1</b> Macromorfología de las colonias fúngicas de la MIII.	63
<b>Tabla N° G.2</b> Macromorfología de las colonias fúngicas de la MV.	63
<b>Tabla N° G.3</b> Macromorfología de las colonias fúngicas de la MVI.	64
<b>Tabla N° G.4</b> Macromorfología de las colonias fúngicas de la MVII.	64
<b>Tabla N° G.5</b> Macromorfología de las colonias fúngicas de la MVIII.	64
<b>Tabla N° H.1</b> Macromorfología y micromorfología de las colonias fijadoras de N de la MII	65
<b>Tabla N° H.2</b> Macromorfología y micromorfología de las colonias fijadoras de N de la MIII	65
<b>Tabla N° H.3</b> Macromorfología y micromorfología de las colonias fijadoras de N de la MIV	65



<b>Tabla N° H.4</b> Macromorfología y micromorfología de las colonias fijadoras de N de la MVI	66
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Horizontes del Suelo. Fuente (Contreras 2005)	13
<b>Figura 02.</b> Ciclo del Nitrógeno	17
<b>Figura N° 03.</b> Extractor Soxhlet	24
<b>Figura N° 04.</b> Índice de Diversidad de Shannon obtenido para cada muestra de suelo en estudio. Las muestras 1, 3, 5 y 7 son las impactadas con petróleo y las muestras 2, 4, 6 y 8 son las no impactadas o control.	31
<b>Figura N° 05.</b> Micrografía de los microorganismos aislados (a) Bacilos Gram positivos, colonia MII(2).FN (b) Cocos Gram negativos, colonia MVII(3).B. (c) Cocos gran positivos, colonia MVII(8).B	34
<b>Figura 06.</b> (a) Placa MVI (10) H, contiene el hongo aislado de la muestra 06, que fue identificado como perteneciente a la especie <i>Aspergillus</i> . (b) Placa MIII (1) H, contiene el hongo aislado de la muestra 03, que fue identificado como perteneciente a la especie <i>Penicillium</i> .	35
<b>Figura N° 07.</b> Vista microscópica de los conidióforos de los hongos identificados (a) Colonia MVI (10) H, <i>Aspergillus</i> . (b)	35



Colonia MIII (1) H, *Penicillium*

<b>Figura N° 08.</b> Colonia MV(1)FN aislada de la muestra 05 crecida en medio semilíquido Burk's	37
<b>Figura A-1.</b> Morfología de colonias bacterianas. Tomado de Prescott y col. (2004)	52
<b>Figura A-2.</b> Resumen de la tinción de Gram.	53
<b>Figura B-1.</b> Colonia MII(5).B	55
<b>Figura B-2.</b> Colonia MII(7).B	55
<b>Figura B-3.</b> Colonia MII(2).B	55
<b>Figura B-4.</b> Colonia MVIII(4).B	55
<b>Figura B-5.</b> Colonia MVII(8).B	55
<b>Figura B-6.</b> Colonia MVII(6).B	55
<b>Figura B-7.</b> Colonia MVII(3).H	56
<b>Figura B-8.</b> Colonia MVI(5).H	56
<b>Figura B-9.</b> Colonia MVI(2).H	56
<b>Figura B-10.</b> Colonia MV(3).H	56
<b>Figura B-11.</b> Colonia MIII(3).H	56
<b>Figura N° C-1.</b> Conidióforos de los hongos (a) <i>Penicillium</i> y (b) <i>Aspergillus</i>	57



## INTRODUCCIÓN

El petróleo es la fuente de energía más importante en la actualidad. Proporciona calor y luz; es el combustible fósil más empleado y produce alquitrán para asfaltar la superficie de las carreteras; y de él se fabrica una gran variedad de productos químicos.

A pesar de proveer grandes cantidades de productos de alto consumo humano, el petróleo, durante su extracción, transporte, refinación, entre otros; puede contaminar tanto suelos como mares, provocando modificaciones en estos ambientes que afectan directamente la vida presente.

La contaminación del suelo por el petróleo puede modificar el equilibrio que existe entre los microorganismos, las partículas del suelo, las plantas, entre otros. El suelo es generalmente un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos y en las partículas que lo forman se desarrollan microcolonias. En esos hábitat, los microorganismos son por lo general mucho más abundantes que en otros de agua dulce o marinos (Mishustin, citado en Atlas y Bartha, 2002). Típicamente, en los hábitats del suelo se encuentran de  $10^6$  a  $10^9$  bacterias por gramo de suelo. Los microorganismos aislados del suelo comprenden virus, bacterias, hongos, algas y protozoos (Atlas y Bratha, 2002).

En el siguiente proyecto se propone el estudio de la influencia de la contaminación de petróleo sobre la diversidad de microorganismos cultivables del suelo. Este estudio se realizará a muestras de suelo de pozos petroleros inactivos ubicados en la zona del Mene de San Lorenzo, Yaracal Estado Falcón Venezuela.



## CAPITULO I: Formulación del problema

### 1.1 Planteamiento del problema

El petróleo es la principal fuente de ingresos en Venezuela y por esta razón es la actividad minera de mayor importancia; pero de igual forma esa explotación causa perturbaciones ambientales que determinan la vida microbiológica del suelo. A lo largo del siglo XX, se ha registrado en casi todo el mundo, un incremento vertiginoso en la cantidad de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo y sus derivados. La disposición final de cantidades excesivas del lodo aceitoso generado en las refinerías de petróleo, así como la remediación de ecosistemas contaminados por derrames accidentales, imponen grandes desafíos tecnológicos (Vasudevan y Rajaram, 2001).

Según Beelen y Doelman (1997) “los microorganismos resistentes a los contaminantes presentes en su hábitat, suelo en este caso, normalmente fracasan en realizar algunas de sus funciones ecológicas específicas”. Teóricamente la diversidad de especies presentes en el suelo puede ser un indicador de los efectos de la contaminación, en particular la aparición de microorganismos resistentes a ésta en una comunidad, lo cual puede ser de utilidad al momento de decidir por un indicador biológico de impacto.

La zona del Mene, Yaracal estado Falcón es *“un lugar situado al norte del tramo occidental de la cordillera de la costa en la región noroccidental de Venezuela, entre los 10°18’; 12°11’46” de latitud Norte. 68°18’; 71°21’ de longitud Oeste, con una temperatura promedio anual de 28,7 °C”* (Fernández y col., 2008). En esta localidad existían alrededor de ochenta y dos pozos



petroleros de los cuales sesenta y siete fueron cementados y saneados, pero 15 pozos, aunque inactivos para la producción petrolera, continúan emanando crudo de manera natural lo que trae como consecuencia la contaminación del suelo de la zona. Por esta razón se plantea el estudio de la influencia del petróleo sobre la diversidad de los microorganismos cultivables del suelo contaminado con este agente.

## **1.2 Objetivos de la investigación**

### **1.2.1 Objetivo general**

Determinar la diversidad de Bacterias y Hongos en suelos con presencia y ausencia de petróleo como contaminante, provenientes de pozos petroleros abandonados ubicados en la zona del Mene de San Lorenzo, Yaracal, Estado Falcón, Venezuela.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Cuantificar la carga bacteriana y fúngica cultivable (ufc/g suelo) en las muestras de suelo con presencia y ausencia de petróleo.
- Cuantificar la carga microbiana de los microorganismos fijadores de nitrógeno cultivables en las muestras impactadas y no impactadas.
- Seleccionar y aislar algunas colonias bacterianas y fúngicas que presenten características definidas.
- Caracterizar macromorfológica y micromorfológicamente (tinción de Gram) las colonias aisladas.
- Correlacionar el contenido de bacterias y hongos con la capacidad fijadora de nitrógeno, presente en suelos con y sin contaminación.



- Analizar el posible efecto que el petróleo puede generar sobre las comunidades microbianas presentes en el suelo.

### 1.3 Justificación

Los compuestos derivados del petróleo constituyen una de las principales fuente de ingresos a nivel mundial y a su vez son generadores de contaminantes atmosféricos, acuáticos y terrestres. Cuando se realiza un estudio de evaluación o de caracterización de un suelo contaminado con hidrocarburos, se determinan diversos parámetros físicos, químicos y biológicos. Estos parámetros pueden dar idea de cuánto y cómo esos contaminantes afectaron el sistema de vida del suelo.

El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariontas (bacterias y arqueas). También encontramos virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas y también contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa que lo conforman. Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros elementos; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, entre otros (Nogales, 2005).

Debido a la degradación natural que sucede en los suelos ante la presencia de contaminantes como los hidrocarburos, y la participación en este proceso que realizan los microorganismos, en particular, las bacterias, se han realizado estudios con respecto a la diversidad microbiana presente en un sitio antes, durante y después de su descontaminación (Abed y col., 2002).



Es necesario conocer la influencia de la contaminación con petróleo sobre la diversidad microbiológica del suelo, ya que los organismos suministran los elementos y compuestos orgánicos e inorgánicos nutricionales que mantienen la buena salud del suelo. Por tanto se plantea el estudio de los microorganismos cultivables en el suelo de los pozos petroleros inactivos ubicados en la zona del Mene, Yaracal Estado Falcón. Este estudio ayudará a determinar la diferencia en la diversidad de microorganismos existentes en los suelos con presencia y ausencia del petróleo como contaminante.

## CAPITULO II: Marco teórico

### 2.1 Antecedentes

A continuación se presentan una serie de trabajos, que si bien algunos no tienen relación directa con este estudio, sirven como base para tomar las metodologías y procedimientos que serán necesarios durante este proyecto.

- **Evaluación de la diversidad microbiana en sistemas de cultivo a base de vegetales en la agricultura ecológica**

Srivastava y col. (2007), estudiaron el efecto de los hongos micorrizicos arbusculares (AMF) y pseudomonas como inoculantes microbianos en los sistemas de cultivo a base de vegetales en la agricultura ecológica. Ellos tomaron tres cosechas del sistema de rotación de okra, arveja y frijol durante un año. Los inoculantes utilizados fueron *Glomus intraradices*, un hongo micorriza arbuscular, y cuatro cepas de *Pseudomonas fluorescens* por separado y en combinación. Ningún químico o abono orgánico se agregó durante dos rotaciones de las hortalizas elegidas. Observaron un aumento significativo del rendimiento en las parcelas inoculadas por el control y la diversidad microbiana cultivable aumentó en comparación con el inicio del experimento. Evaluaron la diversidad microbiana por electroforesis en gradiente de gel desnaturalizante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*) confirmando la diversidad microbiana total. La diversidad funcional evaluada en base a productores de celulasa, xilanas, amilasa, proteasa y solubilizadores de fósforo (P), mostraron que los inoculantes utilizados beneficiosamente mantenían la salud del suelo. Los resultados indicaron que la reserva genética microbiana, especialmente la de los ayudantes clave para el mantenimiento de la salud del suelo, residen en las



cercanías de las raíces, y estos fueron afectados positivamente por el uso de pseudomonas y AMF. Concluyeron que en las prácticas de la gestión de la agricultura, agentes biológicos y residuos de cultivos inoculados incrementaban el rendimiento de los vegetales.

Esta investigación ayudó a entender como es el proceso de estimación de la diversidad microbiana total de un suelo y como evaluar esta diversidad en función de las bacterias y hongos productores de celulasa, xilanas, amilasa, proteasa; parámetros importantes para este estudio, ya que ofrece información de cómo ha sido afectado el suelo contaminado.

- **Influencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en la composición de la comunidad microbiana de suelos con y sin vegetación**

Yang y col., (2007), analizaron, durante 8 semanas, los ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) microbianos en suelos con vegetación y sin vegetación, contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), naftaleno (NAP), fenantreno (PHN), y pireno (PYR). La vegetación presente en estos suelos era césped inglés (ray-grass), trébol blanco y la soja. Encontraron que la contaminación con HAP inhibió la actividad microbiana del suelo. En los suelos sin vegetación, el PLFA total mostró 87% de reducción sobre la adición de PAH después de una incubación de 8 semanas en comparación con el suelo libre de PAH, las concentraciones de NAP, PHN y PYR en suelos mostraron 19,4%, 25,5% y 24,3% de reducción, respectivamente, debido principalmente a la pérdida por evaporación y la degradación microbiana. En los suelos con vegetación, la reducción de NAP y del PHN añadidos no se relaciona con la biomasa de la planta ni el PLFA total. Sin embargo, la reducción de las concentraciones de PYR en el suelo, mediada por el crecimiento de la soja, fue más pronunciada que en el crecimiento del



trébol blanco o césped, pero esto no está relacionado con la biomasa microbiana total en comparación con los de PLFAs. Estos investigadores concluyeron que usando el PLFA como un biomarcador las bacterias Gram-negativas fueron más sensibles a los PAHs que las bacterias Gram-positivas y hongos.

Esta investigación ayudó a conocer cuáles son las posibles tipos de bacterias que se pueden encontrar en suelos contaminados con hidrocarburos, y como se comportan estos ante la presencia de un agente externo como los derivados del petróleo.

- **La bacteria *Halomonas maura* moderadamente halófila es un diazotrófo de vida libre**

Argandoña y col., (2005) estudiaron la fijación de nitrógeno por una bacteria halófila, *Halomonas maura*, que vive en suelos salinos y sintetiza un exopolisacárido conocido como Maurano. La cepa S-31T creció en un medio libre de nitrógeno con atmósfera de N. El ensayo de reducción de acetileno fue positivo en condiciones específicas. Ellos identificaron el gen *nifH* en esta cepa, utilizando oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de secuencias altamente conservadas de un gen, obtenidos de la alineación de un gran número de secuencias del gen *nifH* de diferentes microorganismos. Sus resultados los llevaron a la conclusión de que *H. maura* es capaz de fijar el nitrógeno en condiciones microaeróbicas.

Esta investigación ayudó a conocer los parámetros necesarios para evaluar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en un determinado suelo. Estas bacterias son importantes dentro del ciclo del nitrógeno y conservan la fertilidad del suelo y ayudan al crecimiento de plantas superiores.



- **Diversidad de *Mycobacterium* y mineralización de pireno en suelos contaminados con petróleo**

Cheung y Kinkle (2001) estudiaron genes que codifican el ARNr 16S amplificándolos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) utilizando cebadores específicos de *Mycobacterium* y separados por electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE, Temperature Gradient Gel Electrophoresis) y fueron secuenciadas importantes bandas para comparar las estructuras endógenas *Mycobacterium* de la comunidad en cuatro pares de muestras tomadas de suelos muy contaminados y en áreas menos contaminadas en cuatro sitios diferentes. Determinaron mediante los perfiles obtenidos por TGGE que, en general, los suelos altamente contaminados fueron menos diversos que los suelos menos contaminados. Esta disminución en la diversidad puede ser debido a la toxicidad, ya que de manera significativa se detectaron menos filotipos *Mycobacterium* en el suelo tóxico por el ensayo Microtox que en suelos no tóxicos. La secuenciación y análisis filogenético de las bandas de TGGE indicó que cepas nuevas de *Mycobacterium* dominaron la comunidad del suelo. Los estudios de mineralización con pireno [<sup>14</sup>C], añadido a cuatro de los suelos contaminados con petróleo, con y sin la adición de la conocida degradadora de pireno *Mycobacterium sp.*, cepa RJGII-135, indica que la inoculación incrementó el nivel de degradación en tres de los cuatro suelos. Los resultados de la mineralización, obtenidos de un suelo esterilizado inoculado con la cepa RJGII-135, sugiere que la competencia con microorganismos autóctonos puede ser un factor significativo que afecta la biodegradación de HAPs.

Esta investigación es de mucha importancia para el estudio planteado ya que estos investigadores comprobaron la presencia de un determinado grupo de



bacterias en suelos contaminados con petróleo, hecho que nos da un indicio de cuáles pueden ser las posibles especies a encontrar.

- **Análisis de la estructura de comunidades bacterianas en suelos que contienen aceites sulfurados y detección de genes (dsz) de especies que llevan a cabo desulfuración de benzotiofeno**

Duarte y col. (2001) estudiaron los efectos selectivos de hidrocarburos que contienen azufre, con respecto a los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana y la selección de genes y organismos desulfurizantes. Las muestras fueron tomadas de un suelo contaminado del campo (A) a lo largo de un gradiente de concentración de aceite de azufre y de microcosmos (suelos) tratados con dibenzotiofeno (DBT), con contenido de petróleo (suelo FSL). Los análisis incluyeron conteo de bacterias totales consumidoras de DBT en placas, perfiles moleculares de la comunidad del suelo basada en el análisis de ADN de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante con PCR (PCR-DGGE), y la detección de genes codificantes de enzimas que participan en la desulfuración de los hidrocarburos, tales como, dszA, dszB y dszC. Los datos obtenidos del suelo no mostraron un efecto discriminatorio en los niveles de aceite sobre el número de bacterias cultivables en cada medio utilizado. En general, la carga microbiana de degradadores DBT fueron 10 a 100 veces menor que la cuenta total cultivable en el control. Sin embargo, la PCR-DGGE mostró que el número de bandas detectadas en los perfiles moleculares de las comunidades disminuyó cada vez que el contenido de aceite era mayor en el suelo. El análisis de las secuencias de tres bandas prominentes de los perfiles generados en las muestras de suelo con alto grado de contaminación, sugirió que los organismos correspondientes se relacionan con *Actinomyces sp.*, *Arthrobacter sp.*, y una bacteria de afiliación incierta. Los genes dszA, dszB, y dszC estaban presentes en todas las muestras de



suelo A, mientras que una gama de suelos no contaminados dieron resultados negativos en este análisis. El análisis con PCR-DGGE reveló la presencia de organismos relacionados con *Pseudomonas putida*, una *Pseudomonas sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *erythropolis Rhodococcus*.

El estudio de Duarte demostró que si bien el número de bacterias no variaba con respecto a la presencia de contaminantes, al realizar análisis de las comunidades a través de métodos moleculares, específicamente DGGE, se observa que a medida que aumenta la concentración de contaminantes en el suelo, el perfil de análisis de la comunidad disminuía. Según Duarte las “*comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de contaminantes del petróleo, cambiando su estructura a una que favorezca los organismos capaces de sobrevivir a las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que son reprimidas*”.

## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 El suelo

El suelo es un recurso natural definido generalmente como la capa superior de la corteza terrestre, está formado por partículas de minerales, materia orgánica, agua, aire y allí nacen y se desarrollan miles de seres vivos, desde microorganismos hasta plantas y animales superiores (COM 2002). Los suelos se clasifican en distintos tipos de acuerdo al porcentaje de cada uno de los componentes mencionados. Según el Instituto Geográfico de Venezuela “Simón Bolívar” (2003), en Venezuela existen 9 tipos de suelos, con características dependientes de la cantidad de materia orgánica, cantidad de arcilla, fertilidad, minerales, meteorización, entre otros.



El suelo se forma a partir de las rocas mediante un proceso complejo en el que intervienen fuerzas físicas, químicas y biológicas, que primero reducen la roca regolito (fragmentos de roca) y después a suelo. Los cinco principales factores que participan en la formación del suelo son el material parental, el clima, la topografía, la actividad biológica y el tiempo. El suelo contiene comunidades microbianas de gran diversidad y, por definición, soporta el crecimiento de las plantas. Los microorganismos contribuyen en gran manera a la fertilidad del suelo, es decir, a su capacidad de sostener el crecimiento vegetal (Meeting, 1993).

Los suelos se constituyen en capas, llamadas horizontes. Cada horizonte difiere en una o más características del superior o del inferior. Usualmente se reconocen cinco tipos de horizontes. En la Figura N° 01 se observan los horizontes de un suelo.

La materia orgánica del suelo, procedente de los restos de plantas, animales y microorganismos (Bear, 1964), es uno de los componentes centrales del suelo y juega un rol muy importante, pues se encarga de mantener las funciones del suelo, en particular la capacidad de resistir a la erosión y de mantener la fertilidad del suelo. Además asegura la capacidad tampón y de adhesión que posee el suelo, primordial para limitar la difusión de contaminantes.

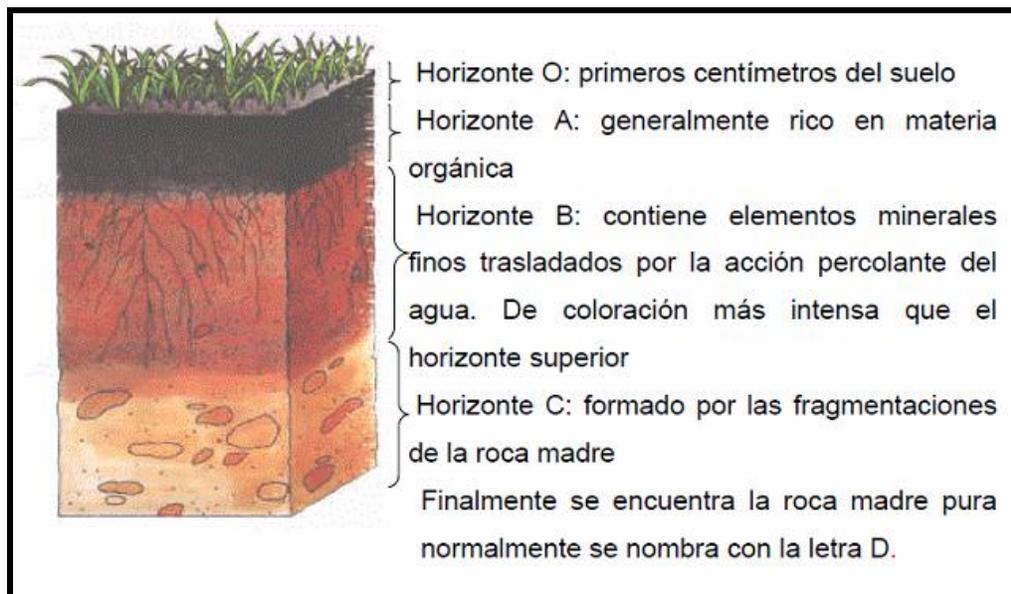


Figura N° 01: Horizontes del Suelo. Fuente (Contreras, 2005)

### 2.2.2 Suelo Contaminado

Se entiende como suelo contaminado, según muchos organismos internacionales (EPA Australia, Environmental Agency UK, entre otras), aquel que represente una amenaza para la salud humana y el medio ambiente, debido a las sustancias presentes en el suelo o bajo de éste, generalmente debido a un mal uso previo.

La introducción de contaminantes o material exógeno al suelo puede traducirse en un daño o pérdida de algunas o varias de las funciones antes mencionadas, repercutiendo directamente en la calidad del suelo y su función. Además no solo perjudica al suelo, sino también puede tener implicaciones en aguas superficiales y subterráneas al ser arrastrados los contaminantes de ese lugar ya sea por medio de lluvias o simple infiltración. Además la presencia de contaminantes por sobre ciertos niveles involucra múltiples consecuencias negativas para la cadena alimenticia y por lo tanto para la salud humana.



La contaminación de suelos donde se desarrollan actividades industriales, agrícolas y humanas en general, se debe principalmente a la inadecuada gestión del mismo, la cual ha llevado a la disposición deliberada o accidental de desechos sobre él, tanto de materia orgánica, solventes o residuos peligrosos, perjudicando a su vez cualquier actividad posterior relacionada con este recurso, traduciéndose finalmente en un problema mundial de contaminación de los suelos (Contreras, 2005).

### **2.2.3 Suelo como hábitat para los microorganismos**

Se puede pensar en el suelo como un medio de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. El tipo y composición de la materia mineral viene dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La fracción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, entre otros. La materia orgánica proviene de la acción de los diferentes organismos vivos del suelo y puede variar tanto en composición como en cantidad, especialmente en función del tipo de vegetación que exista. El resto del volumen del suelo está habitualmente constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica. Podemos encontrar que la atmósfera del suelo se halla enriquecida en dióxido de carbono y empobrecida en oxígeno, como consecuencia de la respiración aeróbica de raíces de plantas, animales y microorganismos. Sin embargo, cuando se producen condiciones de anaerobiosis aparecen en la atmósfera del suelo otros gases como óxido nitroso, nitrógeno gaseoso y metano, resultantes de actividad respiratoria anaeróbica bacteriana (Nogales, 2005).



Este sistema complicado que compone el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, aloja una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El suelo es un ambiente muy favorable para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También se puede encontrar virus y bacteriófagos.

Las bacterias son un indicador que refleja la población potencial de microorganismos en un determinado suelo, especialmente aquellas que ocupan diferentes nichos o habitats en forma saprofítica. La función básica de las bacterias es la descomposición y mineralización de los residuos orgánicos, de donde obtienen su fuente energética y alimenticia. Las bacterias liberan al medio en el que se encuentren a través de su metabolismo, especialmente en el suelo, sustancias tales como enzimas, proteínas, reguladores de crecimiento, metabolitos y algunos nutrientes. Los beneficios de las bacterias para los cultivos se relacionan con un incremento en la cantidad de raíces y un aporte importante de elementos básicos para el desarrollo y producción (Acuña y col., 2006).

Las bacterias poseen una numerosa variedad de funciones en el suelo. La descomposición de animales, plantas y residuos microbianos es llevada a cabo por bacterias heterótrofas. Estas bacterias tienden a ser los miembros más numerosos de la comunidad microbiana del suelo y su selectividad de los substratos varía considerablemente de una especie de bacteria a otra. Las bacterias quimioautótrofas del suelo, juegan un papel importante en los ciclos de nutrimentos (Alexander, 1980)

La composición de la población bacteriana del suelo frecuentemente puede indicar las condiciones físicas y químicas del mismo. La presencia activa de una bacteria como *Clostridium*, es indicativa de condiciones anaeróbicas, ya sea en el suelo en su totalidad o bien en los micrositios.



Como ejemplo de este tipo de bacterias tenemos: *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* (Bautista y col., 2004).

Los hongos son los más abundantes en biomasa microbiana del suelo. Los hongos poseen un amplio intervalo de funciones en el suelo, incluyendo su papel como simbioses de plantas, patógenos de plantas y animales, oligótrofos, e incluso carnívoros, sin embargo su papel más importante en el suelo desde el punto de vista ecológico, es la descomposición de la materia orgánica desde los azúcares simples y aminoácidos hasta polímeros muy resistentes como la lignina y complejos de ácidos húmicos del suelo. Gracias a su gran tolerancia a la acidez, comparado con las bacterias heterótrofas, la descomposición de la materia orgánica en suelos ácidos es en su mayoría realizada por hongos. El papel de los hongos como simbioses, específicamente en micorrizas, es de gran importancia para el desarrollo de plantas, por su papel en la toma de nutrientes, resistencia a enfermedades y relaciones hídricas favorables. Dentro de los hongos representativos tenemos como ejemplos: *Glomus*, *Fusarium*, *Gigaspora*, *Trichoderma*, *Pythium*, *Penicillium* (Alexander, 1980).

Los protozoarios se restringen a ocupar los primeros 15 a 20 cm del suelo, debido a la gran cantidad de presas microbianas posibles de ser consumidas. Las actividades alimenticias de los protozoarios no se basan únicamente en la depredación de microorganismos, ya que pueden involucrarse en la descomposición primaria de la materia orgánica del suelo. Los protozoarios toman y procesan partículas orgánicas finas, tal como ocurre en el tracto digestivo de muchos animales, y juegan un papel importante en la descomposición de residuos celulolíticos. Se pueden nombrar algunos importantes como: *Ciliata*, *Amoeba*, *Paramecium*, *Flagellata* (Alexander, 1980).

## 2.2.4 Microorganismos Fijadores de Nitrógeno

Muchos de los ciclos biogeoquímicos, entre ellos el ciclo del nitrógeno (Figura N° 02), son realizados por bacterias especializadas que no pueden ser reemplazadas por otras. Estas son de gran importancia debido a su participación en actividades simbióticas, como en el caso de las plantas y la fijación de nitrógeno, resaltando así que la presencia de estos microorganismos permiten tener un suelo fértil. Por ejemplo la presencia de las especies *Streptomyces* da el olor característico al suelo, que se atribuye a un suelo saludable (Contreras, 2005).

La disponibilidad de formas fijadoras de nitrógeno es un importante factor limitante tanto para la actividad microbiana en el suelo como para el crecimiento de las plantas superiores, la presencia de estas especies permite el 60% de la fijación de nitrógeno que ocurre en la tierra (Madigan y col., 1999).

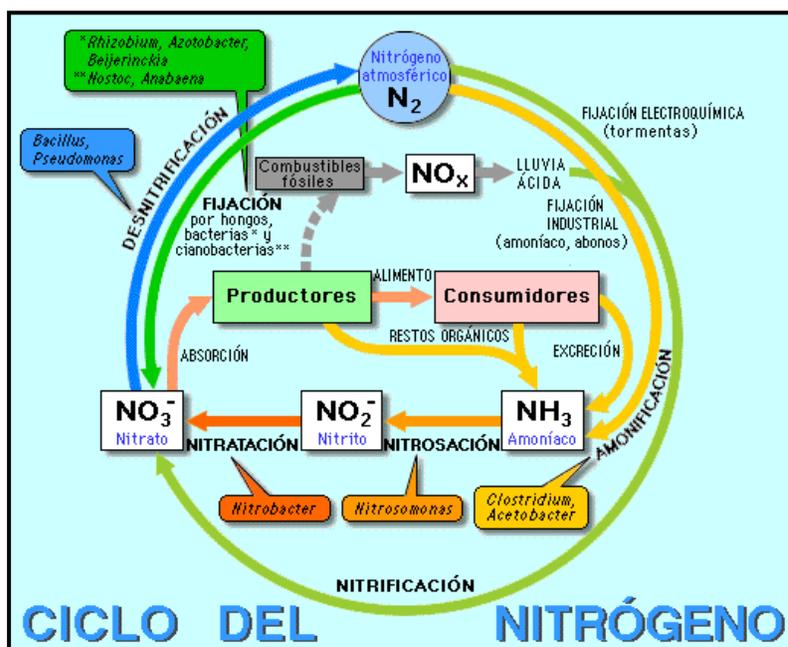


Figura N° 02. Ciclo del Nitrógeno (Prescott y col., 2004)



Dentro de los principales organismos fijadores de nitrógeno se encuentran bacterias como *Azotobacter*, *Mycobacterium flavum*, *Azospirillum lipoferum*, *Methylococcus*, *Thiobacillus* y *Rhizobium*, entre otras (Contreras, 2005).

### 2.2.5 Suelos Contaminados y Microorganismos

Las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados tienden a estar dominadas por aquellas bacterias que pueden sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente siendo capaces de utilizar al contaminante para crecer; en este sentido el contaminante “desbalancea”, más que toxifica, las comunidades ecológicas del suelo.

Estudios de Van Beelen y Doelman (1997) sobre toxicidad, han expuesto que algunos grupos de microorganismos tienen la capacidad de ser más resistentes a contaminantes que otros, por ejemplo las bacterias Gram negativas son más resistentes en comparación a las Gram positivas, en particular ante la presencia de metales.

Entre los microorganismos que normalmente se encuentran en un suelo contaminado, con hidrocarburos, está la especie *Pseudomonas* en particular *P. putida*. Esta bacteria pertenece a la subclase proteobacteria (Nelson y col., 2002), específicamente según Yu y col., (2000) corresponde a una  $\gamma$  proteobacteria y asegura que la temperatura óptima para su crecimiento está en el intervalo de 15 a 22 °C, pero observa que pueden crecer a intervalos menores entre 4 y 22° C. *Psuedomona* es una bacteria propia del suelo, y algunos linajes de esta especie han sido considerados como potencial bacteria para aplicaciones biotecnológicas como es la biorremediación de suelos.



## 2.2.6 Aislamiento de Cultivos Puros

En los hábitats naturales, los microorganismos crecen en poblaciones mixtas y complejas, que contienen varias especies. Esto representa un problema para el científico porque no se puede estudiar adecuadamente un único tipo de microorganismo en un medio mixto. Se necesita un cultivo puro, población de células que procede de una única célula, para caracterizar una especie individual. Existen varias formas de obtener cultivos puros, a continuación se describen los más comunes, según Prescott y col. (2004).

### 2.2.6.1 Siembra en placas por extensión y en estrías

Si se extiende una mezcla de células sobre una superficie de agar, cada célula aislada se multiplicará formando una colonia independiente, formación o agrupación macroscópicamente visible de microorganismos sobre un medio sólido; cada colonia representa un cultivo puro. La siembra por extensión es una forma directa y fácil de conseguir este resultado. Se pasa un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida conteniendo no más de un centenar de células, al centro de una placa de agar y se extiende uniformemente sobre la superficie con una varilla acodada de vidrio estéril.

Las colonias aisladas se pueden obtener también mediante siembra en estrías. Se inocula la mezcla microbiana sobre un extremo de la placa de agar con una asa de siembra o un hisopo, y se extiende formando estrías sobre la superficie en uno o varios sentidos. Las células individuales se irán desprendiendo del asa al frotarla sobre la superficie y desarrollarán colonias aisladas.



### **2.2.6.2 Siembra en Profundidad**

La siembra en profundidad que se emplea frecuentemente con bacterias y hongos, puede también generar colonias aisladas. La muestra original se diluye varias veces para reducir la población microbiana lo suficiente, con el fin de obtener colonias separadas cuando se siembran. A continuación, se mezclan volúmenes pequeños de las muestras diluidas con agar líquido, que se ha temperado hasta aproximadamente 45 °C, y la mezcla se vierte inmediatamente en placas de cultivo estériles. La mayoría de las bacterias y hongos no se destruyen a una exposición breve al agar temperado. Después de endurecerse el agar, cada célula forma una colonia individual. Por motivos estadísticos y de fiabilidad, únicamente se deberán contar las placas conteniendo entre 30 y 300 colonias.



## **CAPITULO III: Marco metodológico**

### **3.1. Muestreo y preparación de las muestras**

Se realizó una toma de muestra representativa, empleando el método al azar estratificado, en cuatro de los pozos inactivos de explotación petrolera presentes en la zona del Mene de San Lorenzo, en Yaracal Estado Falcón. La población total consta de alrededor de ochenta y dos pozos, de los cuales sesenta y siete pozos de los antes mencionados fueron cementados y saneados, pero quince de ellos presentan emanaciones de crudo de manera natural (Fernández, 2008).

Se recolectaron, utilizando un barreno, en bolsas plásticas (polietileno) esterilizadas, muestras compuestas (aproximadamente de 4 Kg) de 4 sub-muestras, tomadas entre 0-10 cm de profundidad, para cada pozo muestreado. Adicionalmente se tomaron muestras compuestas de igual manera que se presumían que no estaban contaminadas de acuerdo a una inspección visual y por la presencia de vegetación. A las muestras impactadas se le asignaron números impares y a las no impactadas números pares.

Para la medición de los parámetros fisicoquímicos (textura, pH, conductividad eléctrica, contenido y retención de humedad, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico), las muestras de suelo se secaron al aire por 72 horas, y luego se realizó la molienda y se pasaron por un tamiz de 2 mm. Se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes con tapa.

Para el análisis microbiológico las muestras frescas (almacenadas a 4° C entre las 24 o 48 horas después de la toma de muestras) se extendieron sobre un plástico limpio y seco, se les retiró el material grueso (piedras, hojas, tallos, raíces), luego se pasaron por el tamiz de 2 mm. Una vez

tamizadas las muestras se almacenaron en recipientes estériles con tapa a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Frostergård y col., 1993; Matsushita y col., 2007) hasta su análisis.

### 3.2 Caracterización fisicoquímica del suelo

A cada una de las muestras de suelo que se tomaron, se le determinaron algunos parámetros fisicoquímicos de acuerdo a la metodología resumida en el Tabla N° 01.

**Tabla N° 01.** Metodología sugerida para la caracterización fisicoquímica de las muestras.

Parámetro	Método	Principio	Técnica	Referencia
Humedad Relativa (%)	10g de muestra T = 105 °C en 1h.	Diferencia de peso después de evaporación	Gravimetría	(Jackson, 1970).
Retención de Humedad (%)	30 g de muestra. Se filtra el agua por 6h	Diferencia de peso	Gravimetría	Citado por: (Jaramillo, 2002)
Conductividad	1 : 2,5 agua	Medición de la movilidad de los iones	Conductimetría	(Jackson, 1970)
pH	1:1 agua y KCl 1M	Mide concentración de protones con un electrodo de vidrio	Potenciometría	(Olarte, 1979).
Carbono orgánico	Walkley-Black modificado	Oxidación del carbono con $\text{K}_2\text{CrO}_4$ en medio ácido	Espectrofotometría 600 nm	(Walinga y col., 1992)
CIC-suelo	$\text{NH}_4\text{OAC}$ 1N pH 7	Intercambio Catiónico, reacciones ácido-base	Extracción y alcalimetría	(Schollenberger y Simón, 1945)
Textura	Al Tacto	Respuesta a la manipulación a diferentes estados de humedad	Tacto	Citado por: (Jaramillo, 2002)



### **3.3 Determinación de la concentración de petróleo en las muestras estudiadas**

La determinación de la concentración de hidrocarburos totales de petróleo se hizo mediante un extractor soxhlet (material de vidrio vertical, cilindro o sifón, de aproximadamente un pie de alto y una pulgada y media de diámetro, compuesto de dos cámaras unidas por dos tubos vacíos que se encuentran a lo largo del cilindro. A este cilindro se encuentra unido en la parte superior un condensador y en la parte inferior un matraz, (Figura N° 03). Para realizar la extracción se requiere de un cartucho de celulosa, el cual se coloca dentro del cilindro mencionado con 5 g de muestra, previamente pesado. Una vez conectadas la salida y entrada de agua del condensador, se colocaron 150 mL de una mezcla extractante (solvente cloroformo/metanol 70:30) en el matraz y se ubicó el equipo sobre una manta de calentamiento, la cual se encendió posteriormente por encima de 100°C. El proceso de extracción consiste en hacer pasar el extractante (proveniente de la condensación) por el cartucho de celulosa con el fin de extraer el petróleo de la muestra. El solvente con el material extraído, una vez inundado el sifón, recorre los tubos laterales y llega al matraz; a este proceso se le llama sifonada. Una vez el solvente haya vuelto a su color inicial durante las sifonadas, se detiene el calentamiento y se coloca el cartucho en una estufa a 105°C por 15 min. Después se introduce en un desecador a temperatura ambiente, una vez seco se pesa y por diferencia de peso se determina el porcentaje de materia orgánica extraíble en las muestras. Al realizar la extracción Soxhlet sobre las muestras impactadas con petróleo, el extractante disuelve los HTPs contenidos en el suelo junto con la materia orgánica. En las muestras no impactadas se extrae fundamentalmente la materia orgánica originaria del suelo. De esta manera se determinan los contenidos de materia orgánica

extraíble, y por diferencia entre las muestras impactadas y no impactadas obtenemos el porcentaje real de petróleo.

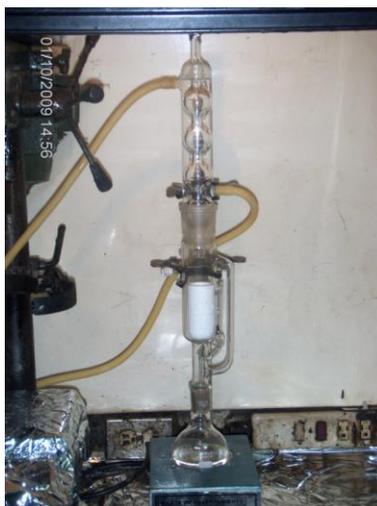


Figura N° 03. Extractor Soxhlet

### 3.4 Conteo de la Carga Microbiana (Hongos y Bacterias)

La carga microbiana se determinó utilizando un sembrado por profundidad. Se tomó 1 gramo de muestra de suelo y se diluyó en 9 mL de una solución salina (NaCl) 0,8 % p/v y luego se hicieron diluciones sucesivas de 1/100, 1/1000 y 1/10000. Se tomaron 100  $\mu$ L de cada una de estas diluciones para el conteo de la carga tanto de bacterias como de hongos (Prescott y col., 2004).

Srivastava y col. (2007), realizaron el conteo de la carga bacteriana utilizando medios de crecimientos suplementados con antibióticos para el crecimiento de hongos y con antifúngicos para el crecimiento de bacterias, en este caso se utilizó el mismo principio pero con suplementos diferentes. Para realizar el conteo de la carga bacteriana se suplementó medio Agar LB con Ciprofloxacina, Genven®, en una proporción 1g/L. Una vez realizada la



siembra y gelificado el Agar, se colocaron las placas en incubación a 33°C por 24 horas y se hizo el conteo de las unidades formadoras de colonia para cada dilución. Con respecto de la carga fúngica se utilizó medio Agar LB suplementado con fluconazol, Calox® en una concentración de 1 g/L. Las muestras fueron incubadas a 33°C entre 3 a 4 días. Todo esto bajo un ambiente estéril y por duplicado.

### 3.5 Cuantificación de la Carga de Microorganismos Fijadores de Nitrógeno

Los microorganismos fijadores de nitrógeno se estudiaron según la metodología de Argandoña y col. (2005). Se tomó 1 gramo de muestra de suelo y se diluyó en 9 mL de una solución salina (NaCl) 0,8 % p/v y luego se hicieron diluciones sucesivas de 1/100, 1/1000 y 1/10000. Se tomaron 100 µL de cada una de estas diluciones para el conteo de la carga de fijadores de nitrógeno. Las muestras se sembraron en un medio de crecimiento Burk's, con una concentración final de 0.8 % p/v de las sales de la Tabla N° 02 y utilizando como medio gelificante Agar-Agar 1,5%. Todo esto bajo un ambiente estéril y por duplicado.

**Tabla N° 02.** Cantidad en gramo por litro de las sales que conforman el medio Burk's. (Modificado de Argandoña y col., 2005)

Sal	Gramo por litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.64
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16
NaCl	7
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05
Glucosa	8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.001
FeSO <sub>4</sub>	0.003



### **3.6 Elección de microorganismos representativos de cada una de las muestras (Bacterias, Hongos y Microorganismos Fijadores de Nitrógeno)**

Una vez realizada la siembra de cada una de las muestras y después de hacer el conteo de las UFC, se procedió a elegir las colonias, tanto bacterias como hongos y microorganismos fijadores de nitrógeno, para realizar su aislamiento y luego hacer la caracterización macro y micromorfológica. El criterio de elección de estas colonias se hizo de acuerdo a la coloración de las colonias, la forma, el margen, el orden de aparición, la repetitividad en las muestras, parecido entre ellas y separación entre ellas. Cada colonia fue rotulada con el número de la muestra de suelo de la cual provenía (en números romanos), seguida entre paréntesis de un número arábigo correspondiente a la colonia. Por ejemplo, la colonia VII (2) corresponde a la colonia número 2 aislada de la muestra de suelo número 7.

### **3.7 Caracterización Macro y Micromorfológica de las colonias**

La caracterización de las colonias seleccionadas tanto bacterianas, fúngicas y fijadoras de nitrógeno se realizó por simple observación de las placas, detallando la forma, elevación, margen, color, tono y tamaño. Las tres primeras características se hicieron de acuerdo a la morfología presentada por Prescott y col. (2004), la cual se puede observar en la figura A-1 (Apéndice A).

La caracterización micromorfológica de las bacterias se hizo mediante la tinción de Gram, de acuerdo al procedimiento descrito en el Apéndice A.2. Según la observación al microscopio se logró determinar si los microorganismos estudiados eran Gram positivos o Gram negativos de acuerdo al color de la tinción y si eran bacilos o cocos de acuerdo a la forma.



### 3.8 Determinación de la capacidad para utilizar el oxígeno de los microorganismos fijadores de nitrógeno

Se eligieron 10 colonias para realizar el estudio de la capacidad de uso de oxígeno por parte de los microorganismos fijadores de nitrógeno. Para ello se preparó el medio semilíquido Burk's con 0,2% p/v de agarosa y se colocaron 10 mL en tubos de ensayo y después de añadir el inoculo, se incubaron los tubos en un baño de maría a 37 °C por 96 h (Argandoña y col., 2005). Una vez cumplido el tiempo se retiraron los tubos y se midió la profundidad del crecimiento de las colonias, respecto al fondo del tubo de ensayo.

Las colonias se clasificaron en aeróbicas si la altura de crecimiento era cercana a la altura del medio semilíquido; microaeróbicas si crecían en un valor medio de altura y en anaeróbicas si crecían en el fondo del tubo.

### 3.9 Determinación del Índice de Shannon

Una vez obtenida las unidades formadoras de colonia (ufc) de cada tipo de microorganismo, se le hizo el correspondiente tratamiento matemático tomando en cuenta las diluciones, para expresarlas en base al suelo seco como  $\log (ufc/g ss)$ , obteniendo los valores que se observan en la tabla N° 05. Con el logaritmo de cada ufc/g suelo se calculó el índice de Shannon (Apéndice D) como estimación de la diversidad de bacterias y hongos.



### **3.10 Correlación entre la carga bacteriana, fúngica, microorganismos fijadores de nitrógeno, las propiedades fisicoquímicas y la concentración de petróleo**

Para realizar la correlación entre las UFC de bacterias, hongos y fijadores de nitrógeno con respecto a las propiedades fisicoquímicas del suelo y la concentración de petróleo, se calculó el coeficiente de Pearson mediante el procedimiento descrito en el Apéndice E. Este parámetro estadístico indica si hay correlación entre dos variables de manera directamente proporcional con valores entre 0 y +1, o si la correlación es inversamente proporcional con valores entre -1 y 0.

## CAPITULO IV: Resultados

### 4.1 Caracterización fisicoquímica del suelo

Una vez recolectadas las muestras se le realizó la caracterización fisicoquímica del suelo de acuerdo a las metodologías citadas en el Tabla N° 01, la cual se puede observar en la tabla N° 03.

**Tabla N° 03.** Parámetros fisicoquímicos del suelo en estudio

Muestras	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS							CIC (meq/*100g suelo)
	pH 1:1 H2O	pH 1:1 KCl	CE ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ )	Humedad relativa (%)	Retención de Humedad (%)	% MO por Walkley- Black modificado	Textura	
MI	4,3±0,1	3,6±0,1	433±13	6,1±0,2	7±1	19,5 ± 0,5	Franco Arenoso	18,67 ± 0,03
MII	4,70±0,03	3,7±0,01	464±16	4±1	60±2	9,8 ± 0,3	Franco Arenoso	117,0 ± 0,3
MIII	4,65±0,04	3,89±0,04	277±39	5±2	8±2	15 ± 2	Franco Arenoso	7,01 ± 0,04
MIV	6,03±0,03	5,35±0,07	150±13	10±1	30±1	10 ± 1	Franco Arenoso	23,07 ± 0,03
MV	6,8±0,2	6,7±0,4	563±33	5±1	6±2	17,4 ± 0,7	Franco Arenoso	42,2 ± 0,3
MVI	5,5±0,2	4,8±0,05	343±58	8±1	15,8±0,5	2,8 ± 0,2	Franco Arenoso	55,3 ± 0,3
MVII	5,3±0,4	4,6±0,2	86±1	7,1±0,4	8±2	22 ± 2	Franco Arenoso	41,9 ± 0,2
MVIII	6,7±0,1	6,5±0,4	242±2	12±1	50±2	13 ± 1	Franco Arenoso	148,4 ± 0,1

**CE:** Conductividad Eléctrica **MO:** Materia Orgánica **CIC:** Capacidad de Intercambio Catiónico



## 4.2 Concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo en las muestras estudiadas.

Las muestras impactadas presentaron variabilidad en los valores de HTP obtenidos. La muestra con mayor contenido de HTPs fue la muestra V, estando por encima del resto de las muestras hasta un doble del porcentaje. Esta información está contenida en la Tabla N° 4.

**Tabla N° 04.** Porcentaje de HTP en las muestras impactadas

Muestra	% HTP
I	7,60
III	7,00
V	14,00
VII	5,00

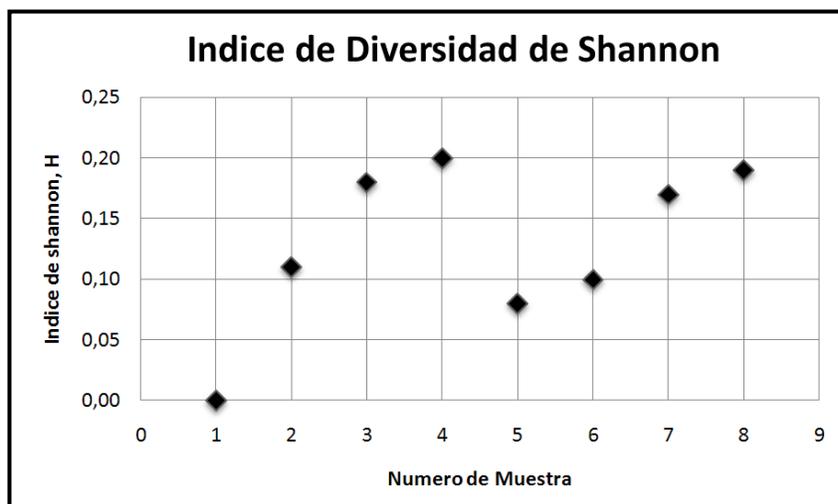
## 4.3 Carga bacteriana, fúngica y microorganismos fijadores de nitrógeno, Índice de Shannon y Correlación de Pearson.

Al realizar el conteo de las ufc para cada caso y haciendo el tratamiento matemático se obtuvo la carga bacteriana y fúngica para cada una de las muestras expresada como Log (ufc/g suelo), expuestos en la tabla N° 05 observando mayor carga bacteriana y carga de fijadores de nitrógeno con respecto a la de hongos. La carga bacteriana varió entre  $3,32 \cdot 10^4$  y  $4,85 \cdot 10^5$  para las muestras impactadas y  $1,60 \cdot 10^6$  y  $9,77 \cdot 10^6$  para las muestras control; la carga fúngica varió entre  $1,33 \cdot 10^4$  y  $7,10 \cdot 10^5$  para las muestras impactadas y  $8,36 \cdot 10^4$  y  $1,46 \cdot 10^6$  para las muestras control; y para los organismos fijadores de nitrógeno la carga varió entre  $2,58 \cdot 10^4$  y  $7,28 \cdot 10^4$  y  $1,19 \cdot 10^6$  y  $4,07 \cdot 10^6$  para las muestras control. Se observa que para todos los casos las muestras control (II, IV, VI y VIII) presentaron mayor carga que las muestras impactadas (I, III, V y VII).

A través del Índice de Shannon H (Figura N° 04) se observa la diversidad de especies en cada muestra. En las muestras impactadas con petróleo la diversidad es menor que en las muestras control, al observarse que H para estas está por encima de las muestras impactadas.

**Tabla N° 05.** Promedio de los logaritmo de las ufc/ g suelo de cada tipo de microorganismo estudiado.

Muestras	Hongos		Bacterias		Fijadores de Nitrógeno	
	ufc/g suelo	Log (ufc/g suelo)	ufc/g suelo	Log (ufc/g suelo)	ufc/g suelo	Log (ufc/g suelo)
I	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00
II	0	0,00 ± 0,00	9.77*10 <sup>6</sup>	6,99 ± 0,39	2,20*10 <sup>6</sup>	6,34 ± 0,45
III	7,10*10 <sup>5</sup>	5,85 ± 0,78	3,32*10 <sup>4</sup>	4,52 ± 0,07	2.58*10 <sup>4</sup>	4,41 ± 0,09
IV	1,46*10 <sup>6</sup>	6,16 ± 0,50	7,23*10 <sup>6</sup>	6,86 ± 0,22	4,07*10 <sup>6</sup>	6,61 ± 0,22
V	4.88*10 <sup>4</sup>	4,69 ± 0,50	0	0,00 ± 0,00	4,45*10 <sup>4</sup>	4,65 ± 0,05
VI	0	0,00 ± 0,00	1,60*10 <sup>6</sup>	6,20 ± 0,23	1,40*10 <sup>6</sup>	6,14 ± 0,36
VII	1.33*10 <sup>4</sup>	4,12 ± 0,22	4,85*10 <sup>5</sup>	5,69 ± 0,44	7.28*10 <sup>4</sup>	4,86 ± 0,11
VIII	8,36*10 <sup>4</sup>	4,92 ± 0,43	3.52*10 <sup>6</sup>	6,55 ± 0,16	1.19*10 <sup>6</sup>	6,08 ± 0,38



**Figura N° 04.** Índice de Diversidad de Shannon obtenido para cada muestra de suelo en estudio. Las muestras 1, 3, 5 y 7 son las impactadas con petróleo y las muestras 2, 4, 6 y 8 son las no impactadas o control.



El coeficiente lineal de Pearson (Tabla N° 06) mostró que las bacterias se correlacionaron con los microorganismos fijadores de nitrógeno positivamente (0.80), indicando que la población de estos últimos está ligada a las bacterias. De igual forma el porcentaje de petróleo se correlacionó positivamente (0.59) con la materia orgánica, indicando que la presencia del contaminante ocasiona aumento de esta última. El pH se correlacionó positivamente con la carga fúngica (0.53) mostrando que el aumento de este parámetro afecta evidentemente el desarrollo de estos microorganismos. El petróleo se correlacionó negativamente con la carga bacteriana (-0.89) y con los fijadores de nitrógeno (-0.57), indicando que el desarrollo de cualquiera de estas especies biológicas se ve afectado negativamente por la presencia del petróleo, es decir, mientras uno aumenta el otro disminuye.

**Tabla N° 06.** Coeficiente Lineal de Pearson para las variables seleccionadas.

r	Hongos	Bacterias	Fijadoras de N	% Petróleo	pH 1:1 H <sub>2</sub> O	Humedad relativa	%MO
Hongos	1,00	0,11	0,30	0,19	0,53	0,35	0,28
Bacterias	0,11	1,00	<b><u>0,80</u></b>	<b><u>-0,89</u></b>	0,05	0,43	<b><u>-0,56</u></b>
Fijadoras de N	0,30	<b><u>0,80</u></b>	1,00	<b><u>-0,57</u></b>	0,50	0,34	<b><u>-0,61</u></b>
% Petróleo	0,19	<b><u>-0,89</u></b>	<b><u>-0,57</u></b>	1,00	0,065	-0,539	<b><u>0,66</u></b>
pH 1:1 H <sub>2</sub> O	<b><u>0,53</u></b>	0,05	0,50	0,065	1,00	<b><u>0,56</u></b>	-0,11
Humedad relativa	0,35	0,43	0,34	-0,539	<b><u>0,56</u></b>	1,00	-0,24
%MO	0,28	<b><u>-0,56</u></b>	<b><u>-0,61</u></b>	<b><u>0,66</u></b>	-0,11	-0,24	0,38

#### 4.4 Diversidad de las colonias bacterianas, fúngicas y fijadores de nitrógeno

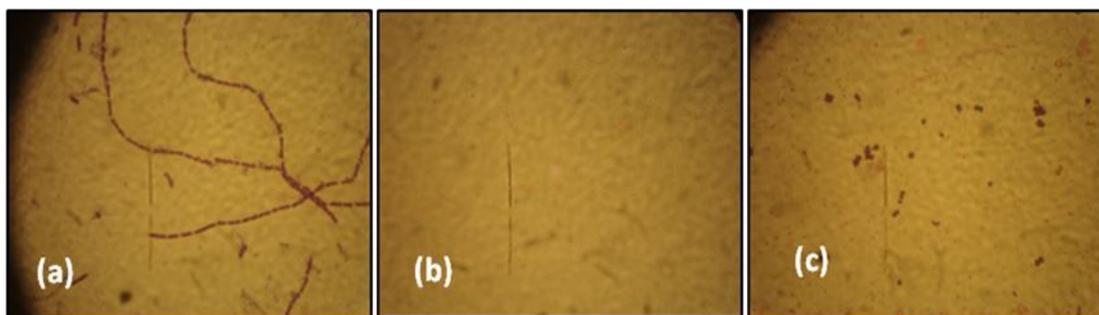
De acuerdo al procedimiento del apartado 3.7, se eligieron y aislaron 28 colonias bacterianas, 17 colonias fúngicas y 10 fijadores de nitrógeno con morfología diferente. En la Tabla N° 07 se observa la cantidad de colonias para cada muestra y en la Tabla N° 08 se encuentra la micromorfología de las bacterias que se encontraron y el porcentaje, con respecto a la cantidad total de colonias aisladas. La figura N° 04 muestra una fotografía de cada tipo de microorganismo. En los Apéndices F, G y H se encuentra la descripción de cada colonia y el Apéndice B imágenes de algunas bacterias y hongos aislados.

**Tabla N° 07.** Número de colonias aisladas por muestra

Muestra	Bacterias	Hongos	Fijadores de N
I	0	0	0
II	7	0	2
III	3	3	1
IV	4	0	6
V	1	2	0
VI	2	10	1
VII	7	0	0
VIII	4	2	0
Total	28	17	10

**Tabla N° 08.** Morfología microscópica de las colonias de bacterias aisladas

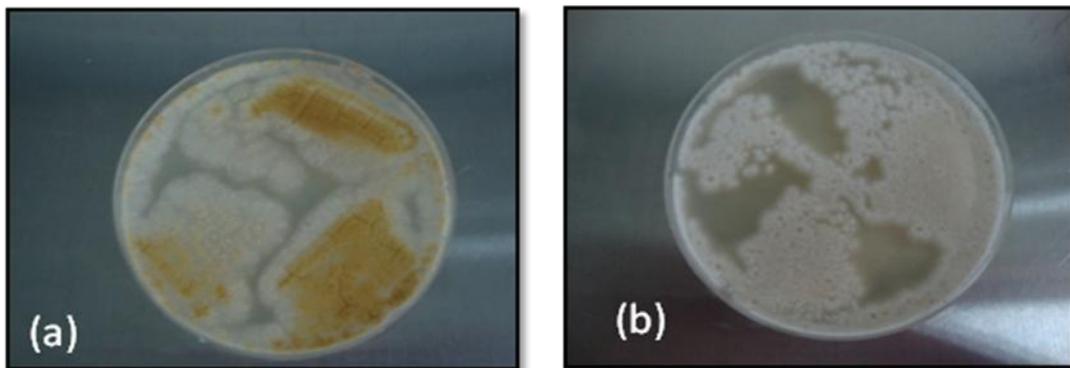
Especie	Cantidad en muestras contaminadas	Porcentaje (%)	Cantidad en muestras control	Porcentaje (%)
Bacilos Gram Positivos	9	60	11	84,62
Bacilos Gram Negativos	0	0	0	0
Coco Gram Positivos	6	40	1	7,69
Cocos Gram Negativos	0	0	1	7,69



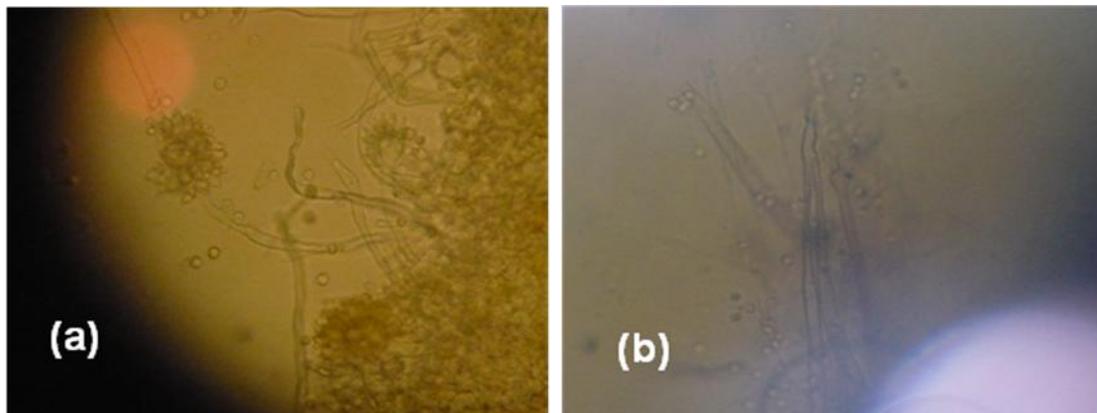
**Figura N° 05.** Micrografía de los microorganismos aislados (a) Bacilos Gram positivos, colonia MII(2).FN (b) Cocos Gram negativos, colonia MVII(3).B. (c) Cocos gran positivos, colonia MVII(8).B

Con respecto a la micromorfología de las colonias fúngicas, una vez realizado el aislamiento de las colonias se observaron al microscopio en busca de conidióforos (Apéndice C), pudiéndose identificar dos géneros de acuerdo a la estructura de estos. Los géneros identificados corresponden a *Aspergillus* proveniente de la colonia MVI (10) H, y *Penicillium* de la colonia MIII (1) H En la figura N° 06 se pueden observar fotografías de las placas donde crecieron estas colonias fúngicas identificadas, y la figura N° 07 muestra la vista microscópica de las mismas. El resto de los hongos aislados

no pudo ser identificado debido a que sería necesario realizar un proceso más exhaustivo, requiriendo en algunos casos medios selectivos con los cuales no se contaba.



**Figura 06.** (a) Placa MVI (10) H, contiene el hongo aislado de la muestra 06, identificado como perteneciente al género *Aspergillus*. (b) Placa MIII (1) H, contiene el hongo aislado de la muestra 03, identificado como perteneciente al género *Penicillium*.



**Figura N° 07.** Vista microscópica de los conidióforos de los hongos identificados (a) Colonia MVI (10) H, *Aspergillus*. (b) Colonia MIII (1) H, *Penicillium*

#### 4.5 Tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno de acuerdo a su capacidad para utilizar el oxígeno

El resultado de la observación del experimento del apartado 3.8 se puede encontrar en la tabla N° 09 donde la mayoría de los microorganismos aislados presentaron un comportamiento microaeróbico. La figura N° 08 muestra la fotografía de una de las colonias de mayor crecimiento.

**Tabla N° 09.** Clasificación de los microorganismos fijadores de N de acuerdo a el uso del oxígeno

Nombre/ Especificación	Altura del medio (cm)	Altura de Crecimiento (cm)*	Ha	Hm	Hb	U	Clasificación
MII(1)FN	6,5	0 - 6				A	Microaeróbica
MII(2)FN	6,5	0 - 6,1	A	A	P		Microaeróbica
MIII(1)FN	6,6	0 - 6,3	A	A	P		Microaeróbica
MIV(1)FN	6,6	0 - 4,5	A	A			Aeróbica
MIV(2)FN	6	0					No creció
MIV(3)FN	6,5	0 - 6,3	A	A	P		Microaeróbica
MIV(4)FN	6,5	0 - 6,5				A	Microaeróbica
MIV(5)FN	6,5	0 - 6,3	M	P	P		Aeróbica
MIV(6)FN	6,5	0 - 4,5 y 5,5 - 6,3	A	A	P		Microaeróbica
MV(1)FN	6,6	0 - 6,3				A	Microaeróbica

Observaciones: \* Se toma 0 como la parte superior del medio. **Ha**: Crecimiento alto; **Hm**: Crecimiento medio; **Hb**: Crecimiento bajo; **U**: Uniforme; **A**: abundante; **M**: Medio; **P**: Poco.

**Tabla N° 10.** Micromorfología de los microorganismos Fijadores de Nitrógeno

Especie	Cantidad en muestras contaminadas	Porcentaje (%)	Cantidad en muestras control	Porcentaje (%)
Bacilos Gram Positivos	0	0	4	44,44
Bacilos Gram Negativos	0	0	0	0
Coco Gram Positivos	0	0	3	33,33
Cocos Gram Negativos	1	100	2	22,22



**Figura N° 08.** Colonia MV(1)FN crecida en medio Burk's semilíquido



## CAPITULO V: Discusión de Resultados

En la cuantificación de la carga bacteriana, fúngica y fijadores de nitrógeno se evaluó la diversidad microbiana, tomando en cuenta la presencia y ausencia del petróleo como contaminante, encontrando que este agente perturbador del suelo provoca distintos efectos dependientes de las variables fisicoquímicas estudiadas, de la concentración de petróleo y de la naturaleza de los organismos presentes.

En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad. Además, el petróleo posee una moderada, alta o extrema salinidad, lo que se traduce en un aumento de la conductividad eléctrica del suelo, y debido a que altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos, afecta de esta forma la diversidad microbiana del suelo (Atlas y Bartha, 2002; Siva y col., 2004), sin embargo esto no sucedió en nuestro caso, descartando la posibilidad de que la baja diversidad se debiera a la salinidad proporcionada por el petróleo.

El pH obtenido en general fue ácido, variando entre 4,3 y 6,8, encontrándose algunas muestras por debajo de los límites establecidos por la normativa ambiental venezolana, la cual considera a este parámetro como un factor prioritario para controlar el crecimiento bacteriano, a los fines de garantizar la integridad biológica de los suelos, con un nivel aceptable en el



intervalo de 5 a 10. En estudios realizados con bacterias degradadoras de hidrocarburos señalan que en el intervalo de pH de 5,2 a 7,0 se produce la mineralización de estos, siendo el pH óptimo 7,0 (Kastner y col., 1998). Esto es concordante con los resultados obtenidos, ya que en este caso a medida que aumenta la concentración de hidrocarburos totales (Tabla N° 04) el pH disminuye (Tabla N° 03), lo cual puede indicar que los microorganismos estén mineralizando los HTPs a especies ácidas como  $\text{HCO}_3^-$ . La otra razón de que esto ocurra así es que el petróleo, específicamente los asfaltenos, contienen grupos polares ácidos como carboxilos, hidroxilos, sulfuros ácidos (Speight 1984), que interactúan con el suelo provocando que el pH disminuya.

La materia orgánica se correlacionó con el contenido de petróleo en el suelo (Tabla N° 06), indicando que a medida que este aumenta también lo hace la materia orgánica. Esto podría apuntar a que los microorganismos pueden estar utilizando el petróleo como fuente de carbono, es decir, lo humifican en compuestos orgánicos que forman parte del equilibrio que hay entre los organismos del suelo y las propiedades fisicoquímicas de éste, contenidas en el humus; o que simplemente hay mayor materia orgánica por haber mayor contenido de carbono orgánico. Este proceso puede afectar de distintas formas el suelo cambiando su estructura, color, pH, entre otros. El caso más marcado después del color del suelo, es el pH donde se puede evidenciar que el aumento de la materia orgánica causa una disminución considerable en los valores del mismo (Tabla N° 03).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) también se debería acrecentar con el aumento de la materia orgánica, sin embargo, en este caso no hay correlación de la CIC con la presencia del petróleo, debido a que están presentes en el suelo en mayor proporción la fracción pesada y asfaltenos, los cuales ocasionan impermeabilidad en el suelo, disminuyendo



el intercambio catiónico en éste. Lo mismo ocurre con la retención de humedad en la cual se observa una disminución significativa en función de la cantidad de petróleo presente.

Con el tratamiento estadístico (Índice de Shannon) efectuado sobre los resultados de las cargas bacterianas, fúngicas y fijadores de nitrógeno se determinó que la diversidad microbiana disminuye con la presencia del petróleo para las 4 muestras y con mayor proporción en la muestra 1 (Figura N° 04), lo que confirma que el petróleo como contaminante es perjudicial para la microbiota del suelo, acarreando variación de los parámetros bioquímicos y biológicos, que se resumen en una disminución de la salud de éste. El otro resultado evidente es que los microorganismos fijadores de nitrógeno y la carga bacteriana se correlacionaron (Tabla N° 06), indicando de esta forma que el mayor contenido de microorganismos fijadores de nitrógeno son bacterias. Por otra parte estos microorganismos se correlacionaron con la cantidad de petróleo presente en las muestras obteniendo una correlación negativa (Tabla N° 06) lo que indica que a medida que la cantidad de petróleo aumenta disminuye la carga bacteriana y por ende la de microorganismos fijadores de nitrógeno. Duarte y colaboradores (Duarte et al 2001) encontraron este mismo hecho pero por métodos moleculares, lo que afianza la idea de que no en todas las ocasiones todos los microorganismos pueden adaptarse, tal vez, sólo una pequeña parte lo haga y esto no sea lo suficientemente eficiente como para mantener la salud del suelo. Es importante acotar que la cantidad de organismos cultivables a través de métodos de siembra y conteo no es lo suficientemente representativa y que el uso de técnicas moleculares puede ayudar a mejorar estas hipótesis (Prescott y col., 2004).

En las muestras se encontraron diferentes microorganismos, muchos con características parecidas y otros totalmente distintos. A través de la



macro y micromorfología se puede observar las pequeñas diferencias y semejanzas entre los organismos (Apéndice F, G y H). Se encontró que la mayor parte de la comunidad bacteriana estudiada resultó ser del tipo Bacilos Gram positivos (60% para las muestras impactadas; 84,62% para las muestras control). En menor cantidad están los Cocos Gram positivos (40% para las muestras contaminadas; 7.69% para las muestras control), y por debajo de estos los Bacilos Gram negativos (0 % para las muestras impactadas; 7.69% para las muestras control). La figura N° 05 presenta la colonia MII(2).FN, la colonia MVII(3).B y la colonia MVII(8).B en las cuales se pueden observar la morfología microscópica que presentan. Esto concuerda con lo descrito por Prescott y col. (2004), donde se señala que las bacterias Gram positivas son parte importante del suelo y que desempeñan un papel fundamental en la degradación de hidrocarburos, materiales vegetales y humus. Un grupo importante de estos microorganismos son los actinomicetos.

El número de colonias encontradas en las muestras control o no impactadas por petróleo fue variable, pero siempre resultó ser mayor a las encontradas en las muestras impactadas, esto fue corroborado con el tratamiento estadístico en el índice de Shannon, donde se observa que el impacto del petróleo disminuye la diversidad microbiológica del suelo (Figura N° 04). A pesar de esto, la presencia de microorganismos filamentosos en una de las muestras impactadas, presuntamente actinomicetos (organismos pertenecientes a la microbiota del suelo; Figura N° B-6), induce la posibilidad de la adaptación de estos microorganismos ante la presencia del petróleo y degradación del mismo para convertirlo en compuestos orgánicos pertenecientes al metabolismo de estos organismos (Prescott et al 2004) o en materia orgánica humificada del suelo, producto de la biodegradación.



Las Hongos también presentaron menor diversidad, ya que en las placas con frecuencia se encontró las mismas colonias (17 colonias aisladas), a pesar de que su crecimiento fuese vertiginoso y abundante. Las figuras N° 06 y 07 muestran una vista macroscópica y microscópica, respectivamente, de las dos colonias fúngicas a las cuales se identificó su familia, las cuales son *Aspergillus*, y *Penicillium*. Esto se hizo comparando los conidióforos de las colonias aisladas con los reportados por Prescott y col. (2004). En el Apéndice C se encuentran los conidióforos con las cuales se compararon las Figuras N° 07.a y 07.b. Estas especies son características del suelo (Flanagan 1981), sobre todo de suelos áridos (Samaniego-Gaxiola y Chew-Madinaveitia 2007), como los que fueron estudiados. Es importante destacar que el tiempo en el cual se recolectaron las muestras existía una época de sequía prolongada, por lo que la humedad presente en los suelos era muy escasa, lo que reduce sustancialmente la materia orgánica, dificulta el crecimiento y disminuye la posibilidad de sobrevivencia de los hongos (Atlas y Bartha 2002), esto podemos tomarlo como una de las posibles razones de la baja diversidad de colonias fúngicas.

En cuanto a los microorganismos fijadores de nitrógeno se encontró como se esperaba, después de analizar la carga bacteriana y fúngica, poca diversidad, pudiéndose observar la misma colonia en todas las placas y solo algunas pocas diferentes (10). En este caso la proporción de microorganismos (clasificados según su forma) fue 44,44 % de bacilos Gram positivos, 33,33 % de cocos Gram positivos y 22,22 % de cocos Gram negativos en las muestras control, mientras que en las muestras impactadas solo una colonia, cocos Gram negativos. Se comprobó que todas las colonias aisladas eran bacterias, lo cual concuerda con lo obtenido a través del coeficiente Lineal de Pearson, donde la carga bacteriana se correlacionó positivamente con la carga de fijadores de nitrógeno (Tabla N° 04), indicando



que estas especies eran del tipo bacteriano, las cuales según el procedimiento tomado de Argandoña y col. (2005), apartado 3.9, son en su mayoría microaeróbicas, estableciendo que las especies fijadoras de nitrógeno de los suelos estudiados pueden sobrevivir a condiciones bajas de aireación. Esto tiene sentido ya que tras la cantidad de tiempo que tiene el petróleo en los suelos estudiados la impermeabilidad que este causa, origina que haya menos entrada de oxígeno al suelo y de esta manera los microorganismos están en condiciones de baja cantidad de oxígeno o microaerofilia.

En general, la carga microbiana de todas las especies fue siempre mayor en las muestras no impactadas, y la micromorfología demostró que las bacterias Gram negativas son más sensibles a la presencia del contaminante que las bacterias Gram positivas, concordando con lo encontrado por Yang y col. (2007), pudiéndose decir que los microorganismos Gram positivos pueden degradar hidrocarburos, aunque esto sólo se puede afirmar concretamente tras estudios donde se utilicen hidrocarburos como fuente de carbono para microorganismos aislados de los suelos estudiados. El hecho de que los microorganismos Gram negativos sean más sensibles a la presencia del petróleo, es que estos organismos poseen una capa muy fina de péptidoglicanos en comparación con los Gram positivos, y su membrana está provista de poros (Prescott y col., 2004) lo que facilita la entrada de compuestos orgánicos con características lipídicas que causen perturbación a la célula en sí.

Los resultados obtenidos demostraron que los microorganismos presentes en las muestras impactadas, se podrían utilizar en un eventual biotratamiento con microorganismos autóctonos ya que algunos de ellos se adaptaron a la presencia del petróleo en su ambiente, infiriéndose la posibilidad de que hayan degradado los hidrocarburos provenientes de este



en compuestos que formen parte de su metabolismo o parte del suelo en cualquiera de sus formas (humus, ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, entre otros). Sin embargo es necesario realizar una investigación más exhaustiva, con métodos moleculares.



## CAPITULO VI: Conclusiones y Recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

- Se cuantificó la carga bacteriana ( $9,77 \cdot 10^6 - 3,32 \cdot 10^4$ ), fúngica ( $1,46 \cdot 10^6 - 1,33 \cdot 10^4$ ) y fijadores de nitrógeno ( $4,07 \cdot 10^6 - 2,58 \cdot 10^4$ ) encontrando valores mayores en las muestras no impactadas que en las impactadas.
- Se aislaron y caracterizaron macromorfológicamente 28 colonias bacterianas; 20 colonias fúngicas y 10 colonias fijadoras de nitrógeno.
- La identificación micromorfológica permitió obtener 71,43 % de bacilos Gram positivos, 25 % de cocos Gram positivos, y 3,57 % de cocos Gram negativos en las bacterias.
- Se obtuvieron, tras la observación microscópica, dos generos de hongos *Aspergillus* y *Penicillium*.
- Para las fijadoras de nitrógeno, la micromorfología arrojó 40 % de bacilos Gram positivos, 30 % de cocos Gram positivos y 30 % de cocos Gram negativos.
- Las bacterias se correlacionaron positivamente con los microorganismos fijadores de nitrógeno.
- Los microorganismos fijadores de nitrógeno presentaron en su mayoría características microaeróbicas.
- El índice de Shannon y el estudio macromorfológico demostraron que la diversidad microbiológica disminuyó con la presencia del petróleo.



- La observación de organismos que se hayan adaptado a la presencia del petróleo, sugiere una posible biotratamiento con microorganismos autóctonos.

## 6.2 Recomendaciones

- Realizar el análisis de la diversidad a través de métodos moleculares para tener una mejor perspectiva de los organismos presentes y de esta manera, también, identificar por completo las especies aisladas.
- Realizar una siembra de las bacterias aisladas con distintos hidrocarburos provenientes del petróleo (antraceno, fenantreno, dibenzotiofeno, entre otros) y verificar si estos compuestos son degradados por las bacterias presentes en los suelos, de esta manera se podría asegurar con toda certeza que los microorganismos encontrados degradan hidrocarburos.
- Complementar este estudio con: (a) Análisis de la actividad microbiológica y biomasa microbiana; (b) Estudio de las actividades enzimáticas características del suelo y (c) Análisis del efecto de los metales provenientes del petróleo, sobre la salud del suelo.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed, R., Safi, N., Köster, j., De Beer, D., El-Nanhal, Y., Rullkötter, J. y García-Pichel, F.** (2002). Microbial diversity of heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (4): 1674-1683.
- Acuña, O., Peña, W., Serrano, E., Pocasangre, L., Rosales, F., Delgado, E., Trejos, J. y Segura, A.** (2006, Octubre). La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de los suelos. Trabajo expuesto en ACORBAT. Joinville-Santa Catrina. Brasil. Extraído el 14 de Mayo de 2010 de [http://musalit.inibap.org/pdf/IN060651\\_es.pdf](http://musalit.inibap.org/pdf/IN060651_es.pdf).
- Alexander, M.** (1980). Microbiología del Suelo. AGT Editores. Mexico.
- Argandoña, M., Fernandez-Carazo, R., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Caba, J.M., Quesada, E., Del Moral, A.** (2005) The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free living diazotroph. *FEMS Microbiology* **244**: 69-74.
- Atlas, R. M. y Bartha, R.** (2002). Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4ta Edición. Pearson Educación. Madrid. Págs. 366-368, 522.
- Bautista, Z. F., Delfín G. H., Palacio J. L. y Delgado C.** (2004). Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. 1era Edición. D. R. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. Mexico, D. F. Págs. 188.
- Bear, F. E.** (1964). Chemistry of the soil. Rheinhold, Nueva York.
- Cheung, P. and Kinkle, B.** (2001) Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum contaminated soils. *Appl Environ. Microbiol.* **67** (5): 2222-2229



- Commission of the European Communities, COM (2002).** Towards a thematic strategy for soil protection. Commission of the European communities. Bruselas.
- Contreras A., P. A.** (2005). Suelos contaminados con hidrocarburos: RNA 16S como indicador de impacto. Trabajo de pregrado no publicado. Universidad de Chile. Chile.
- Duarte, G., Soares, A., Seldin, L., Araujo, W. and Van Elsas, J.** (2001) Analysis of bacterial community structure and sulfur-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67 (3)**: 1052-1062
- EA-UK.** (2002) Environmental Agency United Kingdom: Dealing with contaminated land in England. England.
- EPA. (2003).** El programa de Brownfields. Movilizando el cambio. Numero de publicación 500-F-03-247. USA, Octubre.
- Fernández, C., Llobregat, M., Jiménez, B., Altomare, V., y Labrador, H.** (2008). Biodegradación de asfaltenos y resinas por microorganismos presentes en suelo contaminado con hidrocarburo. *Rev. Fac. Ing. UCV.* **23 (4)**: 7-15
- Frostergård, Å.; Bååth, E. and Tunlid, A.** (1993) Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 723-730.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi, I. G. A. C.** (1979). Métodos Analíticos del laboratorio de suelos. Instituto Geográfico "Agustín Codazzi" 4ª Ed. Olarte, L. I. Editor. Bogotá, Colombia. P. p. 664.
- Instituto Geográfico Venezolano Simón Bolívar (I.G.V.S.B.)** (2003) Taxonomía de los suelos Documento en línea, disponible en [http://www.mipunto.com/venezuelavirtual/mapas/mapa\\_taxonomía\\_suelos.html](http://www.mipunto.com/venezuelavirtual/mapas/mapa_taxonomía_suelos.html) Consultado el 15 de mayo de 2010.



- Jackson, M. L.** (1970) Análisis químico de suelos. 2ª Ed. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. P. p. 662.
- Jaramillo, D.** (2002) Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias P. p 202-205
- Kastner M., M. Breuer-Jammali y B. Marro** (1998). Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAHs-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 359-462.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J.** (1999) Brock Biología de los microorganismos. 8va Edición. Madrid. Prentice Hall. Pág. 1064.
- Matsushita, M.; Ito, S.; Meguro, S. and Kawachi, S.** (2007) Structure of soil microbial communities in sugi plantations and seminatural broad-leaved forests with different land-use history. *Can. J. For. Res.* 37: 236-246.
- Metting, F. B., Jr.** (1993). Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management. Marcel ceker, Nueva York.
- Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., Fouts D. E., Gill S. R, Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., T. DeBoy R., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R, Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K. N., Düsterhöft A., Tümmeler B., M. Fraser C.** (2002). Complete genome sequence and comparative análisis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida*. KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.
- Nogales, B.** (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14 (2): 41-51.



- Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A.** (2004). Microbiología. Quinta Edición. McGraw-Hill Interamericana de España, S. A. U. España. Págs. 28, 62, 64, 67, 112, 113, 114, 457, 458, 604, 663, 722.
- Samaniego-Gaxiola J. A. y Chew-Madinaveitia Y.** (2007) Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 383- 390.
- Schollenberger, C. J. and Simon, R. H.** (1945) Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil- Amonium acetate method. *Soil Sci.*, **59**: 13-24.
- Siva S.; Brett R.; Tessa M.; Vogeler I.; Clothier B.; Grant L. Northcott and Don McNaughton.** Bioremediation of soils contaminated with organic compounds. 2004. Disponible en: [http://www.regional.org/ou/au/asssi/supersoil2004/pdf/1455\\_sivakumarans.pdf](http://www.regional.org/ou/au/asssi/supersoil2004/pdf/1455_sivakumarans.pdf).
- Speight J.** (1984) Characterization of Heavy Crude Oils and Petroleum Residues. Symposium International, , *Éditions Technip*, Paris pp. 32 – 41.
- Srivastava, R., Roseta, D., and Sharma, A.K.** (2007). The evaluation of microbial diversity in a vegetable based cropping system Under organic farming practices. *Appl. Soil Ecol.* **36**: 116-123.
- Van Beelen, P., y Doelman, P.** (1997) Significance and application of microbial toxicity test in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere.* **4**: 455-499.
- Vasudevan, N. y Rajaram, P.** (2001). Bioremediation of oil sludge contaminated soil. *Environ. Internat.* **26**: 409-411.
- Walinga, I., Kithome, M., Novozamsky, I., Houba, V.J.G., and Van der Lee, J.J.** (1992) Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. *Commun. Soil.Sci. Plant Anal.* **23 (15&16)**: 1935-1944.



**Yu, Z., Stuart, G. and Mohn, W.** (2000). Apparent contradiction: psychrotolerant bacteria from hydrocarbon-contaminated artic tundra soils that degrade diterpenoids synthesized by trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5148-5154.

## APÉNDICES

### Apéndice A. Macro y Micromorfología Microbiana

#### Apéndice A.1 Metodología para realizar la Morfología de las colonias microbianas

El desarrollo de colonias sobre la superficie de agar permite identificar las colonias por que las especies forman a menudo colonias de una forma y aspecto característico. La Figura N° A.1 muestra la diferentes características utilizadas para describir la morfología de colonias bacterianas reportadas por Prescott y col. (2004).

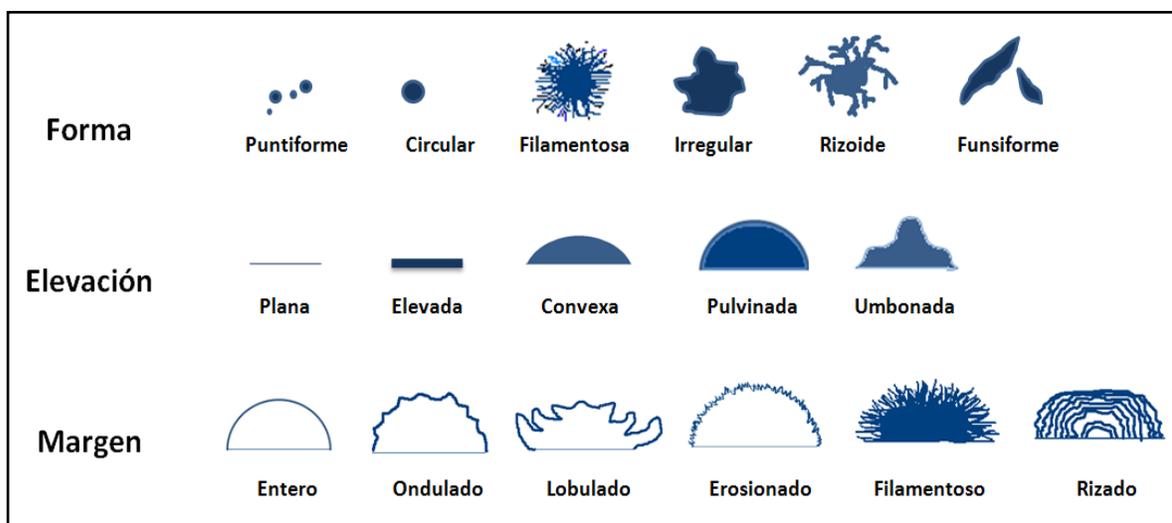


Figura A.1. Morfología de colonias bacterianas. Tomado de Prescott y col., 2004

## Apéndice A.2 Descripción del método de tinción de Gram

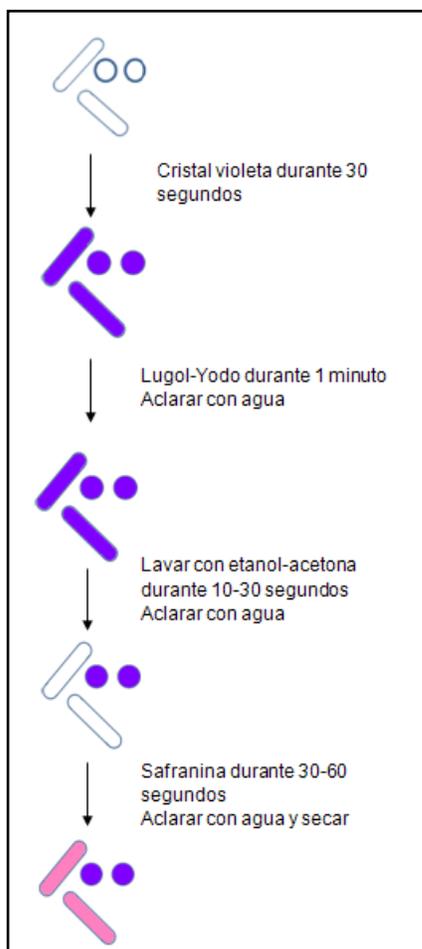


Figura N° A-2. Resumen de la Tinción de Gram.

La caracterización micromorfológica de las bacterias se realizó mediante la tinción de Gram, de acuerdo al procedimiento descrito por Prescott et al 2004 (Figura N° A-2) como sigue:

1. Se incubaron todos los microorganismos a los cuales se les iba a realizar la tinción en 5 mL de medio LB Broth, por 24 horas.
2. Se tomó una asada de cultivo y se colocó en un porta objeto, haciendo movimientos circulares de manera de expandirlo por la mayor cantidad de la superficie del porta objeto. Se dejó evaporar la solución y se fijaron las células flameando los portaobjetos.
3. Se agregó una solución de cristal violeta (Apéndice A.3), sobre las células y se dejó actuar por 45 segundos. Se eliminó el cristal violeta mediante lavado con agua.
4. Se añadió lugol (Apéndice A.3) y se dejó actuar por 45 segundos. Se lavó con agua. Después se agregó la solución de etanol (Apéndice A.3) hasta la desaparición del color azul. Inmediatamente se lavó con agua.
5. Se agregó una solución de safranina (Apéndice A.3) y se dejó actuar por 45 segundos y se lavó con agua.
6. Una vez lista la tinción se observaron las células por el microscopio en aceite de inmersión.



### **Apéndice A.3 Soluciones empleadas para la tinción de Gram**

Solución de Cristal violeta: 2 gramos de cristal violeta en 30 mL de alcohol etílico.

Solución de Lugol: 1 gramo de Yodo, 2 gramos de yoduro de potasio en 200 mL de agua destilada.

Solución alcohol: Alcohol Etílico 97 %

Solución de Safranina: 0.10 gramos de fucsina básica en 100 mL de agua destilada

## Apéndice B. Fotos tomadas de algunas de las colonias aisladas.

### Apéndice B.1 Fotos bacterias aisladas



Figura B-1. Colonia MII(5).B



Figura B-2. Colonia MII(7).B



Figura B-3. Colonia MII(2).B



Figura B-4. Colonia MVIII(4).B



Figura B-5. Colonia MVII(8).B



Figura B-6. Colonia

## Apéndice B.2 Fotos de algunos de los hongos aislados



**Figura B-7.** Colonia MVI(5).H



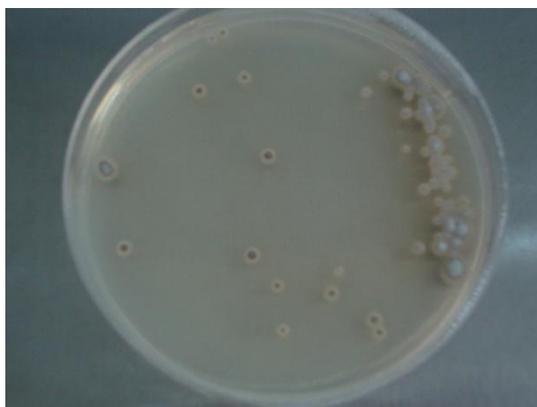
**Figura B-6.** Colonia MVII(3).H



**Figura B-8.** Colonia MVI(2).H



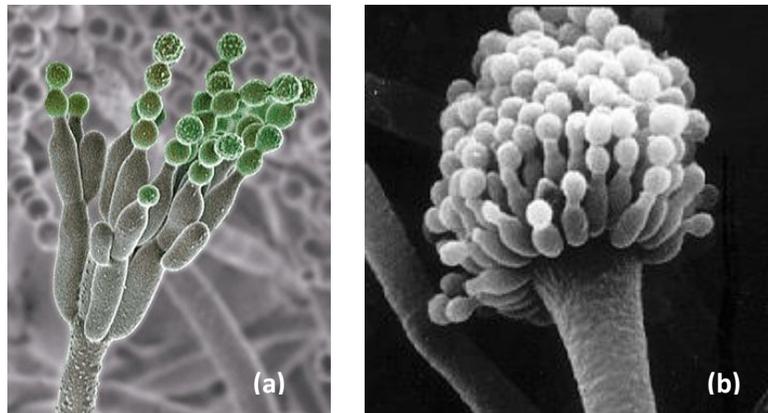
**Figura B-9.** Colonia MV(3).H



**Figura B-10.** Colonia MIII(3).H

### Apéndice C. Conidióforos

En ciertos hongos, la **conidiófora** o **conidióforo** es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidias. Se localizan al extremo de hifas las cuales levantan la conidiofora en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia (Prescott y col., 2004).



**Figura N° C-1.** Conidióforos de los hongos (a) Penicillium y (b) Aspergillus (Prescott y col., 2004)

## Apéndice D. Índice de Shannon

El Índice de Shannon (Sirvastava y col., 2007) es un parámetro de diversidad utilizado para relacionar la existencia individual de individuos de acuerdo a una población existente. Este índice se calcula de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Primero se calcula el número total de muestras de acuerdo a cada especie en estudio, y se suman, obteniendo un  $N_{total}$ .

$$N_{total} = N_{bacterias} + N_{hongos}$$

Luego se calcula  $P_i$  que es la abundancia relativa o proporción de cada especie en la población, de acuerdo a:

$$P_i = \frac{n_i}{N_{total}} \quad \text{donde } n_i \text{ es el valor de cada muestra.}$$

Por último se determina el  $\text{Log}_{10}$  de  $P_i$  y este valor se le multiplica a  $P_i$  y se suman todos los valores (donde esto es igual a  $Q$ ), en este caso para las bacterias y para los hongos.

El índice Shannon,  $H$ , se calcula con el inverso negativo de  $Q$ .

$$Q = \sum P_i * \text{Log}P_i \quad H = -\frac{1}{Q}$$

Con  $H$  se realizó el grafico del índice de diversidad de acuerdo a cada muestra.



## Apéndice E. Coeficiente de Correlación de Pearson

El coeficiente de Pearson se obtiene a través de las ecuaciones de Microsoft Excel. Una vez hecho esto, se determina la desviación estándar a través de la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{1-r^2}{n}}$$

Donde  $r$  es el coeficiente de Pearson y  $n$  el número de muestras.

Después se determina el error del  $r$  a un determinado intervalo de confianza, en este caso se hizo para un 95 % de confianza y por tanto la  $S$  se multiplicó por 1.746 obteniendo así el error del coeficiente. Comparando los valores de  $r$  con su error se determina si hay o no correlación. Si el error es mayor que el  $r$  no hay significancia, pero si  $r$  es mayor al error entonces si hay significancia, es decir, correlación.

## Apéndice F. Morfología de las colonias bacterianas

Tabla Nº F.1 Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MII

Nombre	MII(1).B	MII(2).B	MII(3).B
Origen	MII(3)1.B	MII(3)1.B	MII(3)1.B
Forma	Circular	Circular	Circular
Elevación	convexa	Elevada con undidura	Pulvinada
Margen	Entero	Entero	Ondulado
Color	Naranja	Amarillo oscuro en el borde y crema en el centro	Blanco
Tono	Brillante	Brillante	Brillante
Tamaño, d = mm	2	6	2
Micromorfología	Cocos gram positivos	Cocos gram positivos	Bacilos gram positivos
Continuación			
MII(4).B	MII(5).B	MII(6).B	MII(7).B
MII(3)2.B	MII(3)2.B	MII(3)2.B	MII(3)2.B
Circular	Irregular	Filamentosa	Filamentosa
Pulvinada	Umbonada	convexa	Pulvinada
Entero	lobulado	Erosionado	Filamentoso
Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Brillante	Opaco	Opaco	Opaco
2	1,5	5	≤1
Cocos gram positivos	Cocos gram positivos	Cocos gram positivos	Cocos gram positivos

Tabla Nº F.2 Macromorfología y Micromorfología de las colonias Bacterianas de la MIII

Nombre	MIII(1).B	MIII(2).B	MIII(3).B
Origen	MIII(2)1.B	MIII(2)2.B	MII(3)1.B
Forma	Irregular	Circular	Fusiforme
Elevación	Plana	convexa	convexa
Margen	Filamentoso	Entero	Entero
Color	Blanco	Amarillo	Amarillo
Tono	Opaco	Brillante	Opaco
Tamaño, d = mm	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos

Tabla Nº F.3 Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MIV

Nombre	MIV(1).B	MIV(2).B	MIV(3).B	MIV(5).B
Origen	MIV(2)1.B	MIV(2)1.B	MIV(2)1.B	MIV(2)1.B
Forma	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular
Elevación	Umbonada	Elevada	Plana	Umbonada
Margen	Ondulado	Ondulado	Erosionado	Ondulado
Color	crema	Amarillo	Blanco	Blanco
Tono	Brillante	Brillante	Opaco	Opaco
Tamaño, d = mm	3	4	12	≤1
Micromorfología	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos

Tabla Nº F.4 Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MV

<b>Nombre</b>	<b>MV(1).B</b>
<b>Origen</b>	MV(2)1.B
<b>Forma</b>	Circular
<b>Elevación</b>	Pulvinada
<b>Margen</b>	Entero
<b>Color</b>	Blanco con mas contraste en el centro
<b>Tono</b>	Opaco
<b>Tamaño, d = mm</b>	≤4
<b>Micromorfología</b>	Bacilos gram positivos

Tabla Nº F.5 Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MVI

<b>Nombre</b>	<b>MVI(2).B</b>	<b>MVI(3).B</b>
<b>Origen</b>	MVI(2)2.B	MVI(4)2.B
<b>Forma</b>	Irregular	Irregular
<b>Elevación</b>	Plana	Elevada
<b>Margen</b>	rizado	Ondulado
<b>Color</b>	Blanco con centro más claro	Amarillo blancusco
<b>Tono</b>	Opaco	Opaco
<b>Tamaño, d = mm</b>	3	3
<b>Micromorfología</b>	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos

Tabla Nº F.6 Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MVII

<b>Nombre</b>	<b>MVII(2).B</b>	<b>MVII(3).B</b>	<b>MVII(4).B</b>
<b>Origen</b>	MVII(2)1.B	MVII(2)1.B	MVII(2)1.B
<b>Forma</b>	Irregular	Circular	Circular
<b>Elevación</b>	Umbonada	Elevada	convexa
<b>Margen</b>	lobulado	lobulado	Entero
<b>Color</b>	Amarillo	Amarillo	Blanco con centro amarillo
<b>Tono</b>	Opaco	Opaco	Brillante
<b>Tamaño, d = mm</b>	3	5	≥2
<b>Micromorfología</b>	Bacilos gram positivos	Cocos gram negativos	Bacilos gram positivos

Continuación

<b>MVII(5).B</b>	<b>MVII(6).B</b>	<b>MVII(7).B</b>	<b>MVII(8).B</b>
MVII(2)1.B	MVII(2)2.B	MVII(2)2.B	MVII(3)2.B
Circular	Rizoide	Circular	Irregular
convexa	Plana	Elevada	Umbonada
Entero	Filamentoso	Entero	Entero
Amarillo con borde blanco	Blanco	Crema con centro amarillo	Amarillo blancusco
Brillante	Opaco	Brillante	Brillante
5	1,4	4	2
Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Cocos gram positivos



Tabla N° F.7 Macromorfología y Micromorfología de las colonias bacterianas de la MVIII

<b>Nombre</b>	<b>MVIII(1).B</b>	<b>MVIII(2).B</b>	<b>MVIII(3).B</b>	<b>MVIII(4).B</b>
<b>Origen</b>	MVIII(2)2.B	MVIII(2)2.B	MVIII(3)2.B	MVIII(3)1.B
<b>Forma</b>	Circular	Circular	Circular	Circular
<b>Elevación</b>	Elevada	Pulvinada	Plana	convexa
<b>Margen</b>	Ondulado	Entero	Entero	Entero
<b>Color</b>	Blanco	Naranja	Blanco	Blanco con centro crema
<b>Tono</b>	Brillante	Brillante	Opaco	Brillante
<b>Tamaño, d = mm</b>	10	≤1	5	5
<b>Micromorfología</b>	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos

## Apéndice G. Macromorfología de las colonias fúngicas

Tabla N° G.1 Macromorfología de las colonias fúngicas de la MIII

Nombre	<u>MIII(1).H</u>	<u>MIII(2).H</u>	<u>MIII(3).H</u>	<u>MIII(4).H</u>
Origen	MIII(2)1.H	MIII(2)1.H	MIII(2)2.H	MIII(2)1.H
Forma	Circular	Fusiforme	Circular	Circular
Elevación	convexa	convexa	convexa	Elevada
Margen	Entero	Entero	Filamentoso	Ondulado
Color	Borde rosado con centro blanco	Rosado claro	Negro con centro blancusco	Naranja
Tamaño, d = mm	1	>1	5	3

### Continuación

<u>MIII(5).H</u>	<u>MIII(6).H</u>	<u>MIII(7).H</u>
MIII(2)1.H	MIII(4)1.H	MIII(4)1.H
Circular	Irregular	Irregular
convexa	Plana	Umbonada
Entero	Ondulado	lobulado
Blanco	Rosado blancusco	Rosado claro
2	3	≤1

Tabla N° G.2 Macromorfología de las colonias fúngicas de la MV

Nombre	<u>MV(1).H</u>	<u>MV(2).H</u>	<u>MV(3).H</u>
Origen	MV(2)1.H	MV(2)1.H	MV(2)2.H
Forma	Circular	Irregular	Circular
Elevación	convexa	Umbonada	Umbonada, undida en el centro
Margen	Entero	Ondulado	Entero
Color	Naranja oscuro	Crema oscuro	marfil
Tamaño, d = mm	5	>2	14

**Tabla N° G.3** Macromorfología de las colonias fúngicas de la MVI

Nombre	MVI(1).H	MVI(2).H	MVI(3).H	MVI(4).H	MVI(5).H
Origen	MVI(2)1.H	MVI(2)1.H	MVI(2)2.H	MVI(2)2.H	MVI(2)2.H
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Irregular
Elevación	convexa	Umbonada con endaduras en el centro	convexa	Convexa con endaduras	Umbonada
Margen	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Ondulado
Color	blanco	marfil	Blanco	Blanco con trazas amarillas	Blanco papel
Tamaño, d = mm	>5	1,1	2	13	<5

Continuación

MVI(6).H	MVI(7).H	MVI(8).H	MVI(9).H	MVI(10).H
MVI(2)2.H	MVI(3)1.H	MVI(3)2.H	MVI(4)1.H	MVI(4)1.H
Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
convexa	Plana	Elevada	Elevada	Convexa
Entero	Entero	Erosionado	Entero	Entero
Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Cetro marrón, borde interno ocre y borde externo blanco
2	10	21	29	39

**Tabla N° G.4** Macromorfología de colonias fúngica de la MVII

Nombre	MVII(1).H
Origen	MVII(2)1.H
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Margen	Entero
Color	Crema claro
Tamaño, d = mm	>5

**Tabla N° G.5** Macromorfología de las colonias fúngicas de la MVIII

Nombre	MVIII(1).H	MVIII(2).H
Origen	MVIII(2)2.H	MVIII(2)2.H
Forma	Circular	Circular
Elevación	Umbonada	Plana
Margen	Entero	Ondulado
Color	blanco	Blanco
Tamaño, d = mm	15	29

**Observación:** Las muestras subrayadas no son colonias fúngicas.

## Apéndice H. Macromorfología y Micromorfología de las colonias de microorganismos fijadores de nitrógeno

**Tabla N° H.1** Macromorfología y micromorfología de colonias fijadoras de N de la MII

Nombre	MII(1).FN	MII(2).FN
Origen	MII(2)1.FN	MII(2)1.FN
Forma	Circular	Circular
Elevación	Plana	Plana
Margen	Entero	Entero
Color	Blanco	Blanco
Tamaño, d = mm	1,5	≤1
Micromorfología	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos

**Tabla N° H.2** Macromorfología y micromorfología de colonias fijadoras de N de la MIII

Nombre	MIII(1).FN
Origen	MIII(2)1.FN
Forma	Circular
Elevación	Plana
Margen	Entero
Color	Blanco
Tamaño, d = mm	1,5
Micromorfología	Cocos gram negativos

**Tabla N° H.3** Macromorfología y micromorfología de las colonias fijadoras de N de la MIV

Nombre	MIV(1).FN	MIV(2).FN	MIV(3).FN
Origen	MIV(2)1.FN	MIV(2)1.FN	MIV(2)1.FN
Forma	Circular	Circular	Circular
Elevación	convexa	Plana	Plana
Margen	Filamentoso	Entero	Entero
Color	Blanco	marrón con centro oscuro	Amarillo
Tamaño, d = mm	<1	2,5	≤0,5
Micromorfología	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Cocos gram positivos

### Continuación

MIV(4).FN	MIV(5).FN	MIV(6).FN
MIV(2)1.FN	MIV(2)1.FN	MIV(2)2.FN
Irregular	Irregular	Circular
Plana	Umbonada	Umbonada
Ondulado	Entero	Entero
Blanco, borde y centro negro	Blanco	Blanco con centro rojo
<1	2	<0,5
Cocos gram positivos	Cocos gram negativos	Cocos gram negativos



**Tabla N° H.4** Macromorfología y micromorfología de las colonias fijadoras de N de la MVI

<b>Nombre</b>	<b>MVI(1).FN</b>
<b>Origen</b>	MVI(3)1.FN
<b>Forma</b>	Circular
<b>Elevación</b>	convexa
<b>Margen</b>	Filamentoso
<b>Color</b>	Blanco
<b>Tamaño, d = mm</b>	1
<b>Micromorfología</b>	Cocos gram positivos