



Vol. 27, No 1, 2
Enero - Junio 2019

CIENTÍFICA



An International Refereed Scientific Journal
of the Facultad Experimental de Ciencias
at the Universidad del Zulia

Esta publicación científica en
formato digital es continuidad
de la revista impresa

Depósito Legal: pp 199302ZU47

ISSN: 1315-2076

CIENCIA 27 (1,2), 5 - 13, 2019
Maracaibo, Venezuela

DOI: <https://www.doi.org/10.5281/zenodo.5592942>

Caracterización fisicoquímica y microbiológica de una fosa petrolera del estado Zulia, Venezuela

Laugeny Díaz-Borrego^{1(*)}, Beltrán Briceño¹, Roberta Mora¹, Alexandra Vera¹, Nestor Rosales¹, Lenin González², Julio Marín³, Cateryna Aiello-Mazzarri⁴, Ever Morales¹

¹Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

²Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

³Departamento de Ingeniería Sanitaria Ambiental (DISA), Facultad de Ingeniería.

⁴Laboratorio de Fermentaciones Microbianas, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia.

e-mail: laugenydiaz221172@gmail.com

* Autor para la correspondencia.

Recibido: 16-01-2019 Aceptado: 22-02-2019

Resumen

Las fosas petroleras son excavaciones de terreno con diseños deficientes que se utilizan para almacenar desechos peligrosos, los cuales se pueden filtrar al ambiente causando graves daños al ecosistema. Son consideradas un ambiente hostil para la vida por los compuestos tóxicos que poseen, aunque existen comunidades microbianas que se adaptan a este ambiente y pueden ser utilizadas para su recuperación. En este trabajo se caracterizaron fisicoquímica y microbiológicamente muestras de agua, sedimento y petróleo de una fosa petrolera del estado Zulia, Venezuela, mediante técnicas estandarizadas de laboratorio. El agua presentó las siguientes características fisicoquímicas: temperatura: $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$, pH: 5,10-5,90, alcalinidad total: 8,00 mg CaCO_3/L , Salinidad: 0 UPS, $\text{DBO}_{5,20}$: $< 0,10$ mg/L, DQO: 184,6-215,4 mg/L, oxígeno disuelto: 8,00-8,97 mg/L, SST: 61-235, SSV: 35-47 mg/L, nitritos: $< 0,0020$, nitratos: $< 0,025$ mg/L, NTK: 2,78-5,57 mg/L, ortofosfatos: $< 0,15$ mg/L, fósforo total: 0,47-0,74 mg/L, TPH: 673,4-821,7 mg/L, saturados: 86,73%, aromáticos, resinas y asfaltenos: $< 4,5\%$, Ni y V: $< 0,02$ mg/L. El sedimento presentó materia orgánica: $(4,09 \pm 0,95)\%$, NTK: $(728,33 \pm 45,25)$ mg/Kg, fósforo total: $(40,37 \pm 11,80)$ mg/Kg, crudo en sedimento: $(13,05 \pm 0,75)\%$, saturados: 48,5%, aromáticos: 33,5%, resinas: 6,5% y asfaltenos: 11,5%. En el crudo se determinaron: saturados: 48,1%, aromáticos: 23,6%, resinas: 19,4% y asfaltenos: 8,9%. Se cuantificaron las poblaciones microbianas obteniendo: $(4,15 \pm 1,43) \times 10^6$ org/mL de microorganismos fotosintéticos (microalgas y cianobacterias), $(2,71 \pm 0,49) \times 10^7$ UFC/mL de hongos en agua petrolizada y de $(2,25 \pm 0,24) \times 10^6$ UFC/g en sedimento, $(2,09 \pm 1,50) \times 10^1$ org/mL de rotíferos en el agua y una población bacteriana de $(2,45 \pm 0,34) \times 10^5$ UFC/ml en agua petrolizada y de $(2,83 \pm 0,26) \times 10^5$ UFC/g en sedimento. Se concluye que a pesar de que en la fosa petrolera se presentaron condiciones fisicoquímicas como pH ácido en el agua, baja concentración de nutrientes y de materia orgánica, y alta concentración de hidrocarburos, se encontraron poblaciones microbianas adaptadas a estas condiciones que podrían emplearse como biocatalizadores para la biorremediación de la fosa petrolera.

Palabras clave: Características fisicoquímicas, bacterias, hongos, microalgas, rotíferos, fosa petrolera.

Physicochemical and microbial characterization of an oil pit from Zulia state, Venezuela

Abstract

Oil pits are poorly designed soil excavations used to store hazardous wastes, which can leak into the environment causing serious damage to the ecosystem. They are considered a hostile environment for life due to the toxic compounds they possess, but there are microbial communities that adapt to this environment and can be used for their recovery. In this work, samples of water, sediment and oil from an oil well in the state of Zulia, Venezuela, were characterized physicochemically and microbiologically using standardized laboratory techniques. The water presented the following physicochemical characteristics: temperature: $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$, pH: 5.10-5.90, total alkalinity: 8.00 mg CaCO_3 / L, Salinity: 0 UPS, BOD_{5,20}: <0.10 mg/L, COD: 184.6-215.4 mg/L, dissolved oxygen: 8.00-8.97 mg/L, SST: 61-235 mg/L, SSV: 35-47 mg/L, nitrites: <0.0020, nitrates: <0.025 mg/L, NTK: 2.78-5.57 mg/L, orthophosphates: <0.15 mg/L, total phosphorus: 0.47-0.74 mg/L, HTP: 673.4- 821.7 mg/L, saturated: 86.73%, aromatics, resins and asphaltenes: <4.5%, Ni and V: <0.02 mg/L. The sediment presented organic matter: $(4.09 \pm 0.95)\%$, NTK: 728.33 ± 45.25 mg/Kg, total phosphorus: 40.37 ± 11.80 mg/Kg, crude in sediment: $13.05 \pm 0.75\%$, saturated: 48.5%, aromatic: 33.5%, resins: 6.5% and asphaltenes: 11.5%. In crude oil, the following were determined: saturated: 48.1%, aromatic: 23.6%, resins: 19.4%, and asphaltenes: 8.9%. Microbial populations were quantified obtaining: $(4.15 \pm 1.43) \times 10^6$ org/mL of photosynthetic microorganisms (microalgae and cyanobacteria), $(2.71 \pm 0.49) \times 10^7$ CFU/mL of fungi in petrolized water and $(2.25 \pm 0.24) \times 10^6$ CFU/g in sediment, $(2.09 \pm 1.50) \times 10^1$ org/mL of rotifers in water and a bacterial population of $(2.45 \pm 0.34) \times 10^5$ CFU/mL in petrolized water and $(2.83 \pm 0.26) \times 10^5$ CFU/g in sediment. It is concluded that despite the fact that physicochemical conditions such as acidic pH in the water, low concentration of nutrients and organic matter, and high concentration of hydrocarbons were present in the oil well, microbial populations adapted to these conditions were found that could be used as biocatalysts for the bioremediation of the oil well.

Keywords: Physicochemical characteristics, bacteria, fungi, microalgae, rotifers, oil pit.

Introducción

En la industria petrolera venezolana, al igual que en el resto del mundo, constantemente se producen desechos, cuyo destino debe ser rápidamente ubicado. Como una solución expedita para la descarga de desechos, desde hace mucho tiempo han sido creadas las fosas petroleras, que no son más que grandes excavaciones en el terreno con diseños deficientes, ocasionando que metales pesados, hidrocarburos y sales depositados en éstas, puedan filtrarse hacia el ambiente conllevando a grandes problemas por la contaminación de acuíferos (1).

Las fosas poseen unas condiciones y propiedades fisicoquímicas con características conspicuas, que permiten considerarse un ecosistema en el que ocurren interacciones muy particulares, puesto que es considerado un ambiente extremo. Por lo tanto, se presume que los organismos que allí habitan han logrado adaptarse a elevadas concentraciones de petróleo, y a otros compuestos complejos y tóxicos; constituyéndose una comunidad capaz de degradar hidrocarburos y otros contaminantes, ideal para recuperar la fosa por ser producto propio del ambiente impactado (2).

En Venezuela se han realizado varios trabajos sobre la caracterización fisicoquímica y

microbiológica de diversos ambientes contaminados por actividad petrolera, pero en el caso de las fosas petroleras estas investigaciones son escasas o poco accesibles. Por lo que el objetivo del trabajo es caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente muestras de agua, sedimento y petróleo crudo provenientes de una fosa petrolera venezolana.

Materiales y métodos

Toma de las muestras

Se realizaron dos muestreos del agua, sedimento y petróleo de una fosa petrolera ubicada en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, Venezuela, en las coordenadas N $10^\circ 17' 52''$ y W $71^\circ 20' 38''$, a una altura de 20 msnm. La fosa presentó forma rectangular y agua oscura más bien iridiscente con tonalidad verdosa por la presencia de microalgas en la superficie. Midió aproximadamente 3 m de ancho por 3 m de largo y 1, 28 m de profundidad. La columna de agua fue de 81 cm y la capa de sedimento de unos 30 cm. Estaba rodeada de una vegetación escasa representada por miembros de las Familias Poaceae, Pasifloraceae y Ciperaceae.

Durante cada muestreo se colectaron tres muestras de agua (aproximadamente 10 L), tres de

sedimento (aproximadamente 1 Kg) y petróleo crudo (aproximadamente 0,5 Kg), en tres puntos de la fosa. Las muestras de agua se colectaron manualmente en envases de vidrio estériles con capacidad de 2 L en la superficie (zona fótica) del cuerpo de agua abarcando unos 20 cm de profundidad (3). Cuando fue necesario se empleó un captador (envase plástico) previamente desinfectado con hipoclorito de sodio (5% v/v) sujetado a un cordel (3). Las muestras de sedimento y petróleo crudo se capturaron mediante un tubo de polietileno de 2,5 pulgadas, previamente desinfectado con hipoclorito de sodio (5% v/v). En cada punto se tomaron las muestras, realizando vacío en el extremo opuesto, y se colocaron en bolsas con cierre hermético (3). Posteriormente, las muestras se trasladaron en refrigeración (cava con hielo) al laboratorio para su análisis inmediato (4). Para la colecta de la flora de microorganismos fotosintéticos, se utilizaron frascos ámbar de 250 mL adicionando unas gotas de lugol acético, para preservar el fitoplancton y formol al 40% para fijar el zooplancton presente en las muestras de agua colectada (5).

Análisis fisicoquímico de las muestras

A las muestras de agua se les determinó *in situ* pH (potenciómetro Orion 3 Star, Fisher Electron Corporation), temperatura (termómetro convencional de mercurio de 0,1° C de precisión) y salinidad (salinómetro-refractómetro C-1, modelo SZJ-S) (3). Los análisis fisicoquímicos se realizaron según el Standard Methods (6) y la ASTM (7, 8, 9). Las muestras frescas se utilizaron para determinar oxígeno disuelto (método 4500 O), alcalinidad total (método 2320) concentración de nitrógeno total Kjeldahl (NTK) (método N-total 4500 N-org), nitratos (método N-NO₃- 4500-NO₃-B), nitritos (método N-NO₂- 4500-NO₂-B), ortofosfatos (método 4500-P A, C y E), fósforo total (método 4500-P-B-C), sólidos suspendidos totales (SST) (método 2540-D) y volátiles (SSV) (método 2540 E), demanda bioquímica de oxígeno (DBO_{5,20}) (método 5210-B), demanda química de oxígeno (DQO) (método 5210-B), así como los metales níquel (Ni) y Vanadio (V) (método ASTM D5863-00a) (9). Parte de las muestras de agua se fijaron con HCl concentrado y se les practicaron análisis de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) (método 5520-B) y de las fracciones de hidrocarburos: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) (método ASTM D-2007-03) (7). En sedimento se determinó materia orgánica (método ASTM D2974-00) (8), porcentaje de crudo, fósforo total (método 4500-P.E), NTK (método 4500-Norg) y SARA (método ASTM D-2007-03) (6, 7). Mientras que, en el petróleo crudo se determinaron las fracciones de hidrocarburos (SARA) que lo componen

(método ASTM D-2007-03) (7). Todos los reactivos utilizados para los análisis de laboratorio fueron de grado analítico y las soluciones fueron preparadas con agua destilada-desionizada (10).

Análisis microbiológico de las muestras

Se cuantificaron las bacterias presentes en las muestras de agua y sedimento por la técnica de recuento en placas, realizando diluciones seriadas en solución salina fisiológica y sembrando en placas de agar tripticasa de soya (TSA) (método 9215C) (6) y en agar medio mínimo mineral (MMM) con queroseno al 1% como sustrato modelo de biodegradación. El MMM contenía (g/L): NH₄Cl 1,2 g; KNO₃ 2,4 g; CaCl₂.2H₂O 0,00067 g; Na₂SO₄ 2,4 g; MgSO₄.7H₂O 2,04 g; K₂HPO₄.3H₂O 0,65 g; KH₂PO₄.3H₂O 0,5 g; FeSO₄.7H₂O 0,02 g (11). Se seleccionó aproximadamente el 10% de las colonias aisladas para realizar la caracterización macroscópica y microscópica (tinción de Gram). Las pruebas bioquímicas, se realizaron siguiendo las indicaciones de los manuales para la identificación bacteriana (4, 12) y de los programas ABIS online versión 12.8 y Microrao Online Web Server. Se realizaron las siguientes pruebas a las cepas bacterianas aisladas: tinción de Gram, tinción de esporas, fermentación de azúcares (agar TSI), prueba de oxidación-fermentación de la glucosa (OF glucosa), producción de catalasa, producción de oxidasa, crecimiento en agar McConkey, reducción de nitratos, pruebas IMVIC: producción de indol, rojo metilo, Voges Proskauer y utilización del citrato, fenilalanina desaminasa, reacción de ureasa, degradación de azúcares: manitol, lactosa, glucosa, sacarosa, xilosa, sorbitol, galactosa, maltosa, fructosa, manosa, arabinosa, rafinosa y trehalosa; decarboxilación de aminoácidos: ornitina, lisina y arginina, crecimiento en NaCl al 7,5%, hidrólisis de la esculina, crecimiento en caldo KCN, producción de pigmentos y motilidad (4, 12). Se dispuso de un stock de las cepas bacterianas en agar conservación, en tubos de agar MMM + queroseno 1,0% y congeladas a -20°C en tubos eppendorf con caldo nutritivo y glicerol al 20%, a cada cepa se le asignó un código y se depositaron en el cepario del Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, con la finalidad de tener cepas de referencia.

Se realizó el recuento de hongos, mohos y levaduras de la misma forma respecto a las bacterias, pero en placas de agar papa dextrosa (PDA) (13). Luego se hicieron repiques de las colonias aisladas en PDA y en agar extracto de malta (EMA) para observar las características macro y microscópicas de los aislados, después de tres días de incubación a (30 ± 2)° C. Para la identificación de los especímenes, se hicieron observaciones

de la apariencia de la colonia y observaciones microscópicas del micelio mediante tinción con azul de algodón, y a través de claves taxonómicas (13). Las cepas fúngicas aisladas se mantuvieron en tubos con PDA en bisel, realizando repiques cada dos meses para mantenerlos viables.

Se determinó la densidad celular (cel/mL) del fitoplancton en las muestras de agua fresca y en las muestras fijadas con lugol acético, mediante recuento directo al microscopio óptico en cámara Neubauer (5) y a través de claves taxonómicas (pictóricas y dicotómicas) se logró la identificación de las mismas (14). Las bacterias asociadas a las microalgas se aislaron en placas de agar nutritivo y se preservaron en agar conservación y congeladas a -20°C en tubos appendorf con caldo nutritivo y glicerol al 20%.

El zooplancton se cuantificó por recuento directo al microscopio en cámara Sedgwick-Rafter, estimando el número de organismos, estos especímenes fueron identificados mediante claves taxonómicas (15).

Resultados y discusión

Las muestras petrolizadas (Tablas 1 y 2) mostraron una alta carga de hidrocarburos (673,4-821,7 mg/L en agua de la fosa), baja concentración de materia orgánica biodegradable (DBO_{5,20} <0,10 mg/L), de nutrientes (nitratos <0,025 mg/L, nitritos <0,002 mg/L, fósforo total 0,47-0,74 mg/L, ortofosfatos <0,15 mg/L), y pH ácido (5,10-5,90) que pueden afectar el tratamiento biológico. Sin embargo, la temperatura en el rango mesófilo ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y la baja salinidad (0 UPS) pueden favorecer el crecimiento microbiano (16, 17). Las fracciones de hidrocarburos en el crudo (48,1% de saturados, 23,6% de aromáticos, 19,4% de resinas y 8,9% de asfaltenos) indican que se trata de un petróleo de mediano a liviano, con elevado porcentaje de hidrocarburos saturados y aromáticos (7). La Ley Venezolana establece en su Gaceta Oficial N°5.212 del año 1998 (18), sobre las normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos, en las que se establece que el efluente debe contener < 20 mg/L de TPH para que pueda ser destinado a vertedero. Por tanto, el sistema de biorremediación que se implemente en la fosa petrolera, debe tratar de reducir los hidrocarburos hasta niveles no tóxicos para la biota, permisibles por la normativa venezolana.

Tabla 1. Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua de la fosa petrolera

| Parámetro | Rango |
|--|-------------|
| Temperatura | 30±2° C |
| pH | 5,10-5,90 |
| Alcalinidad total (mgCaCO ₃ /L) | 8,00 |
| Salinidad (UPS) | 0,00 |
| DBO ₅₋₂₀ (mg/L) | <0,10 |
| DQO (mg/L) | 184,6-215,4 |
| Oxígeno Disuelto (mg/L) | 8,00-8,97 |
| SST (mg/L) | 61-235 |
| SSV (mg/L) | 35-47 |
| Nitritos (mg/L) | <0,002 |
| Nitratos (mg/L) | <0,025 |
| Nitrógeno total-Kjeldahl (mg/L) | 2,78-5,57 |
| Ortofosfatos (mg/L) | <0,15 |
| Fósforo total (mg/L) | 0,47-0,74 |
| TPH (mg/L) | 673,4-821,7 |
| SARA en agua petrolizada (%): | |
| Saturados | 86,73 |
| Aromáticos, resinas y asfaltenos | <4,5 |
| Ni y V (mg/L) | <0,02 |

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno, DQO: Demanda química de oxígeno, SST: sólidos suspendidos totales, SSV: sólidos suspendidos volátiles, TPH (siglas en inglés): Hidrocarburos Totales del Petróleo, SARA: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos.

Tabla 2. Análisis fisicoquímicos de las muestras de sedimento y crudo de la fosa petrolera

| Parámetro | Media aritmética |
|----------------------------------|------------------|
| Materia orgánica (%) | 4,09±0,95 |
| Nitrógeno total Kjeldahl (mg/Kg) | 728,33±45,25 |
| Fósforo total (mg/Kg) | 40,77±11,18 |
| Crudo en sedimento (%) | 13,05±0,75 |
| SARA en sedimento (%): | |
| Saturados | 48,5 |
| Aromáticos | 33,5 |
| Resinas | 6,5 |
| Asfaltenos | 11,5% |
| SARA del crudo (%): | |
| Saturados | 48,1 |
| Aromáticos | 23,6 |
| Resinas | 19,4 |
| Asfaltenos | 8,9 |

SARA: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos.

En el agua petrolizada se caracterizaron varios grupos microbianos heterótrofos y fotosintéticos (Tabla 3), que estuvieron presentes aun cuando los análisis de nutrientes realizados no mostraron suficiencia de los mismos, como para estimular la abundancia de estos microorganismos. Los recuentos de hongos [(2,71 ± 0,49) x 10⁷ UFC/mL en agua y (2,25 ± 0,24) x 10⁶ UFC/g en sedimento)

y de bacterias (2,45 ± 0,34) x 10⁵ UFC/ml en agua y (2,83 ± 0,26) x 10⁵ UFC/g en sedimento] (Tabla 3), se comparan a los estimados por Itah y Essien, (19) en Nigeria, en microorganismos biodegradadores de alquitrán; aunque la población bacteriana fue menor a la reportada por León *et al.* (20) en la Faja Petrolífera del Orinoco en Venezuela.

Tabla 3. Microalgas, cianobacterias, bacterias fotosintéticas, bacterias heterótrofas y hongos en sedimento*, agua y crudo del pozo petrolero.**

| Grupo | Miembros representativos | Población |
|--------------------------------|--|--|
| Microorganismos fotosintéticos | <i>Chlorella</i> sp., <i>Coenochloris</i> sp., <i>Chlorococcum</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> , <i>Trachelomonas</i> sp., <i>Lepocinclis</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Euglena</i> sp ** , <i>Leptolybys</i> sp **, <i>Anabaena</i> sp **, bacterias fotosintéticas no identificadas | 4,15±1,43x10 ⁶ org/mL |
| Hongos | Deuteromicetos (<i>Aspergillus flavus</i> y <i>Penicillium</i> sp.) | 2,71±0,49x10 ⁷ UFC/mL 2,25±0,24x10 ⁶ UFC/g* |
| Rotíferos | <i>Macrotrachela quadricornifera</i> y <i>Euchlanis dilatata</i> | 2,09±1,50x10 ¹ org/mL |
| Bacterias [£] | Bacilos Gram (+) (11 cepas) Bacilos Gram (-) (20 cepas) <i>Flavobacterium aquatile</i> ** <i>Vibrio metschnikovii</i> ** <i>Moraxella osloensis</i> ** | 2,45±0,34x10 ⁵ UFC/mL 2,83±0,26x10 ⁵ UFC/g* |

£Sólo se hace referencia a las bacterias asociadas al petróleo crudo.

La escasez de cianobacterias en las muestras de agua petrolizada puede deberse al pH ácido, puesto que estos microorganismos requieren de pH alcalino para su crecimiento (21). Se obtuvo especies de *Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp. y *Leptolybys* sp., la primera en muestras de agua petrolizada y las otras dos asociadas al crudo. Tanto *Oscillatoria* sp. como *Anabaena* sp. han sido reportadas en fosas petroleras de Venezuela (22). Varios trabajos han evaluado la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en agua y sedimento contaminados por acción de cianobacterias (23, 24). Las microalgas observadas: *Chlorella* sp., *Coenochloris* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorococcum* sp. y *Scenedesmus* sp. (División Chlorophyta), también han sido referidas por su participación en la remoción de hidrocarburos aromáticos y en estudios de fitotoxicidad a partir de diferentes fuentes (25, 26, 27). Las euglenofitas, *Euglena* sp., *Lepocinclis* sp. y *Trachelomonas* sp., se han empleado en estudios sobre fitotoxicidad con hidrocarburos aromáticos y con metales pesados (28, 29).

En la Tabla 3 puede observarse que los recuentos fúngicos superaron a los bacterianos en las muestras, lo que puede deberse al pH ácido que favorece el desarrollo de los hongos (13). Sin embargo, a pesar de la mayor abundancia, se observó un menor número

de especies. Solo se aislaron dos cepas: *Penicillium* sp. y *Aspergillus flavus* (Phylum Ascomycota, Clase Eurotiomycetidae, Familia Trichocomaceae). Varios trabajos han reportado a *Aspergillus flavus* con alto potencial biorremediador al degradar hidrocarburos aromáticos (30) y hexadecano en consorcio con *Bacillus cereus* (31). También se ha señalado a *Penicillium* CHY-2 con acción degradativa de alifáticos e hidrocarburos poliaromáticos (32). En la Bahía de Amuay (Venezuela), se logró el aislamiento de cepas de *Aspergillus flavus* y *A. niger* con capacidad de remoción de hidrocarburos poliaromáticos del 70-80% de 1 a 3 meses y del 100% en un año (33). Un estudio de meta-análisis sobre la biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudos y sus derivados, demostró que *Aspergillus* es uno de los géneros más frecuentemente aislados (17%), con capacidad de remoción de hidrocarburos del 52% (34).

En la fosa petrolera se observaron miembros del Phylum Rotifera: *Macrotrachela quadricornifera* y *Euchlanis dilatata* como parte del zooplancton, lo cual apunta al establecimiento de productividad secundaria en ese ambiente. Se ha evaluado el efecto de hidrocarburos poliaromáticos como el benzo [a] pireno en comunidades zooplanctónicas de ecosistemas acuáticos (35) y se han identificado

genes del citocromo P₄₅₀ como respuesta de *Brachionus* (modelo de rotíferos) a la exposición al benzo [a] pireno (36).

De las 31 cepas bacterianas aisladas 22, (70,96%) provinieron del agua petrolizada y 9 (29,04%) del sedimento, con predominio de bacilos Gram negativos en agua y de bacilos Gram positivos en sedimento, lo que puede relacionarse con la mayor carga de hidrocarburos en sedimento (Tabla 2). El sedimento parece condicionar el desarrollo de bacterias esporuladas capaces de resistir a condiciones ambientales adversas (17), desplazando competitivamente al resto de la microflora bacteriana Gram negativa. En tanques de almacenamiento de combustible diesel también se ha observado el predominio de bacterias Gram positivas (91,3%) sobre las Gram negativas (7,3%) (37). En Campo Moga, estado Zulia (Venezuela) se logró el aislamiento de siete cepas bacterianas (seis bacilos Gram negativos y un bacilo Gram positivo) que conformaron un cultivo mixto para la biorremediación del suelo contaminado con petróleo, obteniendo remociones de hasta el 90% de los hidrocarburos (38).

Las 15 especies bacterianas aisladas a partir de muestras de agua y sedimento de la fosa petrolera se encontraron repartidas en 10 géneros bacterianos diferentes. La presencia de enterobacterias: *Enterobacter abscuriae* y *Butiauxella agrestis* (12,90%), *Pantoea agglomerans* y *Yersinia rodheii* (3,22%) en la fosa petrolera indican contaminación fecal (17), lo que puede atribuirse a descarga de materia fecal por la avifauna o por la actividad ganadera de la zona. En la faja petrolífera del Orinoco (Venezuela) también se aislaron los géneros *Enterobacter* (50%) y *Pantoea* (14,29%), entre otros, como potenciales biorremediadores de desechos petrolizados de la zona (20). *Enterobacter abscuriae* se ha reportado como productora de biosurfactantes ramnolípidos que solubilizan el fenantreno (39). Por su parte, *Yersinia* se ha registrado como degradadora de diesel (40) y *Pantoea* como productora de surfactantes durante el crecimiento en hidrocarburos (41). *Butiauxella agrestis* estuvo presente en un 12,90% de los aislados, y también se ha recuperado de suelos contaminados con aceite de turbina (42). De la familia Vibrionaceae se aisló la especie *Vibrio metschnikovii* tanto de muestras de agua (6,45%) como asociada al crudo. Esta especie se ha reportado en un efluente proveniente de una industria fármaco-química (43), con alta capacidad de remoción de materia orgánica y de color del efluente; otras especies de *Vibrio* han realizado la degradación completa de ciertas fracciones de crudo (44) y de diesel en suelos contaminados (45). Como miembros de la Familia Moraxellaceae se obtuvieron las especies *Moraxella ovis* y *M. osloensis* (3,22%, respectivamente) a

partir del agua petrolizada, además, esta última especie también se aisló del crudo. Esta bacteria se ha encontrado como degradadora de diesel en suelos contaminados (45). Se aisló *Burkholderia mallei* a partir del agua petrolizada (6,45%). Varios trabajos señalan al género *Burkholderia* (Familia Burkholderiaceae) en la biodegradación de diversos hidrocarburos aromáticos a partir de diesel (46) y de crudo proveniente de refinerías petroleras con suelo salino (47). De las muestras de agua se obtuvo un aislamiento (3,22%) de *Pseudomonas aeruginosa*. Se han reportado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de sedimento marino como biodegradadoras de fracciones de alcanos contenidos en el petróleo crudo (48), con capacidad de decolorar el 2,6 diclorofenol indofenol y de biodegradar parafinas presentes en el petróleo crudo (49). Asimismo, se aisló una cepa de *Pseudomonas stutzeri* (3,22%) de la fosa petrolera. Esta cepa se ha aislado se suelos contaminados con petróleo y se ha reportado como biodegradadora de derivados alquilo de hidrocarburos aromáticos (ilbutilbenceno, sec-butilbenceno, ter-butilbenceno e iso-butilbenceno) en presencia de surfactantes tipo ramnolípidos (50) y también como una potente degradadora de fenantreno a elevadas concentraciones (51). De las cepas bacterianas asociadas al crudo, *Flavobacterium aquatile* (Familia Flavobacteriaceae) ha sido reportada como biodegradadora de hidrocarburos en tratamientos a gran escala de aguas subterráneas contaminadas con hidrocarburos, siendo el género dominante (41%) entre otras bacterias (52). Por su parte, la cepa de *Chromobacterium violaceum* (Familia Neisseriaceae) que se aisló a partir de muestras de agua y de sedimento del pozo petrolero (6,45%), se ha encontrado relacionada con la biodegradación de diferentes compuestos hidrocarbonados como el alquitrán (19) y también en la biolixiviación de oro a partir de desechos electrónicos (53). Las bacterias Gram positivas predominantes pertenecieron al género *Bacillus*. De las especies encontradas solo en sedimento están: *B. coagulans* con el mayor número de aislamientos (19,35%), *B. circulans*, *B. licheniformis* (6,45%) y *B. subtilis* (3,22%). Varios trabajos han indicado la participación de especies de *Bacillus* en la degradación de diversidad de contaminantes petrolizados como *n*-alcanos de cadena larga (54), hidrocarburos clorados bajo condiciones salinas (55) e hidrocarburos poliaromáticos como el acenaftileno, el acenafteno y el indeno pireno (56).

Conclusiones

Las poblaciones microbianas caracterizadas en este trabajo parecen estar adaptadas a las condiciones fisicoquímicas de la fosa petrolera

de baja concentración de nutrientes, pH ácido del agua, escasa materia orgánica y alta concentración de hidrocarburos. Se logró el aislamiento de dos especies fúngicas (*Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp.), 15 especies bacterianas (*Enterobacter absuriae*, *Pantoea agglomerans*, *Yersinia rodheii*, *Butiauxella agrestis*, *Vibrio metschnikovii*, *Moraxella ovis*, *M. osloensis*, *Burkholderia mallei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *Flavobacterium aquatile*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus coagulans*, *B. circulans* y *B. licheniformis*), tres especies de cianobacterias (*Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp. y *Leptolyngbya* sp.), ocho especies microalgales (*Chlorella* sp., *Coenochloris* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlamydomonas* sp., *Euglena* sp., *Lepocinclis* sp., y *Trachelomonas* sp.) y dos especies de rotíferos (*Macrotrachela quadricornifera* y *Euchlanis dilatata*).

Los microorganismos aislados en este trabajo, especialmente las bacterias, microalgas y los hongos, pueden emplearse potencialmente como biocatalizadores para la biorremediación de la fosa petrolera.

Referencias bibliográficas

- MADRID M., CATALDI A. **Caracterización de las fosas petroleras y sitios contaminados por crudo a través de métodos geofísicos y sensores geoquímicos en sitio.** TRX Consulting N° 16839.2002.
- ABED R., SAFID N., KÖSTER J, EL-NAHHAL Y., RULLKÖTTER, J., GARCIA-PICHEL, F. **Appl. Environ. Microb.** 68 (4):1674-1683. 2002.
- ITOPF. **Muestreo y monitorización de derrames de hidrocarburos en el medio marino.** Documento de información técnica 14. ITOF Ltd. Londres (Reino Unido). 2-12. 2012. Disponible en: https://www.itopf.org/uploads/translated/Final_TIP_14_2012_SP.pdf. Fecha de consulta: 15/10/2016.
- MC FADDIN J. **Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia Clínica.** Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires (Argentina). 451-673. 2003.
- GUILLARD R. R. L. Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurements. (Ed. Stein J. R.). Cambridge University Press, Cambridge, (USA). 1- 280. 1973.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for examination of water and wastewater. (Eds. Eaton A. D., Clesceri L. S., Franson M. H. A., Rice E. W., Greenberg, A. E.). 21th Edition. American Public Health Association. New York. (USA). 1- 1427. 2005.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard test method for characteristic groups in rubber extender and processing oils and other petroleum-derived oils by the clay-gel absorption chromatographic method. Designation: D 2007-98. Annual Book of ASTM Standards, 14.02. Philadelphia (USA). 1-4. 1998.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard test method for moisture, ash and organic matter of peat and other organic soils. Designation: D 2974-00. West Conshohocken, Pensilvania (USA). 2000.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard test method for determination of nickel, vanadium, iron and sodium in crude oil and residual fuels by flame atomic absorption spectrometry. Designation: D 5863-00a. West Conshohocken, Pensilvania (USA). 2016.
- CASTRO, J. Manual de procedimientos para la preparación de soluciones en los laboratorios de caracterización y calidad del agua y operación plantas de tratamiento de aguas. Instituto Politécnico Nacional, Secretaría Académica, Dirección de Educación Media, Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos "Miguel Othón De Mendizabal". Ciudad de México (México). 6-8. 2013.
- JOBSON A, COOK F. D., WESTLAKE D.W.S. **Appl. Microb.** 23 (6):1082-1089. 1972.
- GARRITY G., BRENNER D. J., KRIEG N. R., STALEY, JAMES R. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria.** Springer US. (USA). XXVIII, 1106. 2005.
- CAMPBELL M. C., STEWART J. L. Identification of individual fungal isolates, (Eds. Tomasso, E., Zirken M.). **The Medical Mycology Handbook.** Jhong Wiley & Sons, New York, (USA). 1-436. 1980.
- VALADEZ F., ROSILES-GONZÁLEZ G., CARMONA J. **Cryptogamie.** 31(3): 305-319. 2010.
- MYERS P. R., ESPINOSA C. S., PARR T., JONES G. S., HAMMOND H., DEWEY T. A. **The Animal Diversity Web (Online).** Phylum Rotifera (rotifers). 2006. Disponible en: <http://www.animaldiversity.org>. Fecha de consulta: 16/12/2018).
- EWEIS J. B., ERGAS S., CHANG D., SCHROEDER E. D. **Principios de Biorrecuperación**

- (Biorremediation). Mc Graw Hill. Madrid (España). 76-130.1999.
17. MADIGAN M., MARTINKO J., BENDER K., BUCKLEY D & STAHL D. Brock. *Biología de los Microorganismos* 14a Edición. Pearson Educación. Madrid (España). 77-183. 2015.
 18. GACETA OFICIAL DE LA REPÚBLICA DE VENEZUELA, Año CXXIII-Mes III N° 5.021 Extraordinario. Decreto, 883. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua o efluentes líquidos. Caracas (Venezuela).1995.
 19. ITAH, A.Y., ESSIEN, J.P. *World J. Microb. Biot.* 21: 1317-1322.2005.
 20. LEONY., DESISTOA., INOJOSAY., MALAVERN., NARANJO-BRICEÑO L. *Rev. Est. Transdisciplin.* 1(2): 12-25. 2009.
 21. ABALDE J., CID A., FIDALGO P., TORRES E., HERRERO C. *Microalgas: cultivo y aplicaciones* Primera Edición. Editorial Universidade da Coruña. Coruña. (España). 20-278.1995.
 22. SULBARÁN S. *Microalgas presentes en fosas de desechos petrolizados del estado Zulia.* (Trabajo Especial de Grado para obtener el título de Licenciada en Biología). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo (Venezuela). 34-98. 2005.
 23. PATEL J. G., KUMAR N., KUMAR R. N, KHAN S. M. *Polycycl. Arom. Comp.* 36 (1):72-87, 2016.
 24. ALBERT E., TANEE FBG, J. *Microb. Biot.* 1(3): 140-147. 2011.
 25. EL-SHEEK M. M., HAMOUDA R. A., NIZAM A. A. *Int. Biodeter. Biodegr.* 2: 67-72. 2013.
 26. AKSMANN A., POKORA W., BASCIK-REMISIEWICZ, A., DETTLAFF A. *Ecotox. Environ. Safe.* 110: 31-40. 2014.
 27. SUBASHCHANDRABOSE S. R., MEGHARAJ M., VENKATESWARLU K., NAIDU R. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22: 8876-8889. 2015.
 28. BÁCSI I., GONDA S., B-BÉRES, V. *Ecotoxicology* 24: 823-834. 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1427-7>. Fecha de consulta 14/10/2016.
 29. PENG C., WHALEE J., TEIMOURI H., NG J. C. J. *Hazard. Mater* 284 (2): 10-18. 2015.
 30. MARUTHI, Y., HOSSAIN, K., THAKRE, S. *Eur. J. Sust. Devel.* 2(1): 42-57. 2013.
 31. PERERA M., WIJAYARATHNA, D., WIJESUNDERA, S. *BMC Microb.* 19: 78-84. 2019.
 32. GOVARTHANAN M., FUZISAWA S., HOSOGAI T., CHANG Y. *RSD. Adv.* 7:20716-20723. 2017.
 33. ARAUJO J., YEGRES C. F., BARRETO C. G., ANTEQUERA A., DE POOL B., ROJAS Y. *Rev. Cubana Quím.* 28 (2): 703-735. 2016.
 34. PERNÍA B., DEMEY J. R., INOJOSA Y., NARANJO-BRICEÑO L. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 3(1):1-39. 2012.
 35. IKENAKA Y., SAKAMOTO M., NAGATA T., TAKAHASHI H., MIYABARA Y., HANAZATO T., ISHIZUKA M., ISOBE T., KIM J. W., CHANG K. H. *J. Toxicol. Sci.* (38): 131-136.2013.
 36. PARK C., HAGIWARA A., GIPARK H., LEE J. S. *Comp. Biochem. Phys. B.* 29: 185-192. 2019.
 37. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., RODRÍGUEZ-CAVALLINI E., BLANCO R. *Rev. Biol. Trop.* 57(3): 489-504. 2009.
 38. ARAUJO I., MONTILLA M., CÁRDENAS C., HERRERA L., ANGULO N., MORILLO G. *Interciencia.* 31(4): 268-275. 2006.
 39. HOŠKOVÁ M., JEŽDÍK R, SCHREIBEROVÁ O., CHUDOBA J., ŠÍR M., ČEJKOVÁ A., MASÁK J., JIRKŮ V., ŘEZANKA T. *J. Biotechnol.* 193 (10): 45-51. 2015.
 40. AHAMED F., HASIBULLAH M., ANWAR M.N. *Bangladesh J. Microbiol.* 27(1):10-13. 2010.
 41. VASILEVA-TONKOVA E., GESHEVA Y. V. *Curr. Microbiol.* 54 (2):136-41. 2007.
 42. HITOSHITO I., HOSOKAWA R., MORIKAWA M., OKUYAMA H. *Int. Biodeter. Biodegr.* 61 (3):223-232. 2008.
 43. MIJAYLOVA P., MOELLER, G., BUSTOS, C. *Water Sci. Technol.* 58(1): 29-36. 2008.
 44. HARWATI T., KASAI Y., KODAMA Y., SUSILLANINGSIH D., WATANABE K. *Microbes Environment.* 22 (4), 412-415.2007.
 45. BHASHEER S. K., UMAVATHI, S., BANUPRIYA D., THANGAVEL M., THANGAM Y. *Int.J. Curr. Microb. Appl. Sci.* 3 (11):363-369. 2014.
 46. MOHANTY S., MUKHERJI S. *Appl. Microbiol. Biot.* 94:193-204.2012.
 47. BAYOUMI R. A. *J. Appl. Sci. Res.* 5(2):197-211.2009.

-
48. PASUMARTHI R., CHANDRASEKARAN S., MUTNURI S. *Mar. Pollut. Bull.* 76 (1-2): 276-282. 2013.
49. VARJANI S. J., UPASANI V. *Bioresource Technol.* 222:195-201. 2016.
50. KACZOREK E., SAŁEK K., GUZIK U., JESIONOWSKI T., CYBULSKI Z. *Chemosphere.* 90(2): 471-478. 2013.
51. SINGH P., TIWARY B. N. *Biocatal. Agr. Biotechnol.* 10: 20-29. 2017.
52. POI G., SHAHSAVARI E., ABURTO-MEDINA A., MOK P. C., BALL A. S. *J. Environ. Manage.* 214: 157-163. 2018.
53. LIU R., LI J., GE Z. *Procedia Environ. Sci.* 31: 947-953. 2016.
54. YU J., CAI W., ZHAO S., WANG W., CHEN J. *Chinese J. Chem. Eng.* 21 (7): 781-786. 2013.
55. LU M., ZHANG Z., WEI S., SUN S. J. *Petrol. Sci. Technol.* 27: 1895-1905. 2011.
56. ESKANDARIS., HOODAIM., TAHMOURESPOUR A., ABDOLLAHLA., BAGHI T. M., ESLAMIAN S., ALI-ASKARI K. O. *J. Geograp. Environ. Eart. Sci.* 11 (2): 1-11. 2017.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

CIENCIA

Vol.27 N°1, 2

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en junio de 2019, por el **Fondo Editorial Serbiluz**, Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve